

**ZAKLJUČNO POROČILO**  
**O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA**  
**NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA**  
**PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«**

**I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta**

1. Naziv težišča v okviru CRP:

Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja

2. Šifra projekta:

V4-0529

3. Naslov projekta:

Tipizacija salmonel in kampilobakterjev za zagotavljanje varne hrane

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Tipizacija salmonel in kampilobakterjev za zagotavljanje varne hrane

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Typing of Salmonella and Campylobacter for safe food assurance

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

zoonoze, kampilobakterioza, salmoneloza, genotipizacija, molekularna epidemiologija, PFGE, odpornost proti protimikrobnim zdravilom

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

zoonoses, campylobacteriosis, salmonellosis, genotyping, molecular epidemiology, PFGE, antibiotic resistance

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Univerza v Ljubljani (0406 Veterinarska fakulteta)

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

Splošna bolnišnica Celje - Zavod za zdravstveno varstvo Celje  
Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije

6. Sofinancer/sofinancerji:

MKGP

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

11133

Dr. Matjaž Ocepek

Datum: \_\_\_\_\_

Podpis vodje projekta:

Dr. Matjaž Ocepek

Podpis in žig izvajalca:

Rektor: Prof. dr. Radovan Stanislav  
Pejovnik  
Po pooblastilu  
Dekan: Prof. dr. Marjan Kosec

## II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

### 1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti  
 b) delno  
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da  
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

## 2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela<sup>1</sup>:

Skrb za zdravje ljudi je med prednostnimi cilji Evropske unije in ena od razvojnih prioritiet Strategije razvoja Slovenije. Zagotavljanje zdravja ljudi je tesno povezano s skrbjo za varno hrano in zdravje živali. Ta zajema predvsem nadzor in zatiranje alimentarnih zoonoz - bolezni, ki se preko hrane prenašajo z živali na človeka. Zoonoze te vrste so najpogostejše ne samo v državah v razvoju, ampak tudi v razvitem svetu. Za načrtovanje preventivnih ukrepov in ukrepov za nadzor okužb moramo poznati vire, poti in pogoje širjenja okužb. To pa nam omogočajo epidemiološke raziskave.

Namen projekta je bil epidemiološka raziskava okužb s sevi bakterij *S. Enteritidis* in *C. jejuni*, ki so posledica uživanja živil živalskega izvora. S standardizirano genotipizacijsko metodo (metoda pulzne elektroforeze, angl. PFGE) smo želeli ugotoviti lastnosti sevov omenjenih bakterij, izoliranih iz ljudi, živali in živil živalskega izvora. Poleg tega smo želeli preveriti odpornost izolatov omenjenih bakterij proti protimikrobnim zdravilom. Ob pomoči omenjenih metod smo nameravali dobiti vpogled v epidemiološko situacijo glede obeh bolezni v Sloveniji in s primerjavo genotipov izolatov iz različnih virov odkriti povezave med njimi ter določiti kritične točke za širjenje okužb.

### Nabor izolatov

V raziskavi smo analizirali 395 izolatov *S. Enteritidis* in 506 izolatov *C. jejuni*. Število analiziranih sevov salmonel je nekoliko nižje od planiranega (450), ker nam ni uspelo pridobiti zadosti izolatov salmonel iz živil v prometu, smo pa zato za enako število povečali planiran nabor izolatov *C. jejuni*.

### Izolati *S. Enteritidis*

Preiskali smo 148 izolatov iz kliničnih vzorcev odvzetih pri ljudeh, 149 izolatov iz živali in 106 iz živil v prometu.

Ker se je med raziskavo pokazalo, da imamo v načrtovanem časovnem obdobju (2007-2010) na voljo premalo izolatov *S. Enteritidis* iz živil, smo ga razširili še za nekaj let nazaj in tako v raziskavo vključili vse razpoložljive izolate iz vzorcev živil. 106 izolatov *S. Enteritidis* izvira iz obdobja od leta 2002 do 2006, 83 iz leta 2007, 122 iz leta 2008 in 84 iz let 2009 in 2010. Da bi pri naboru kliničnih izolatov iz ljudi izključili izolate iz posamezne epidemije in zajeli čim več različnih izolatov, smo v raziskavo vključili vsak prvi izolat v posameznem mesecu, ki so ga dobili v analizo v sodelujočih laboratorijih.

Pri izolatih iz živali smo v raziskavo vključili naslednje izolate:

- a) iz vzorcev odvzetih zdravim živalim v okviru programov monitoringa: (i) največ tri izolate v eni jati perutnine; (ii) 2-15 izolatov v čredi plemenskih prašičev glede na število ograd v gospodarstvu; (iii) vse izolate pridobljene v okviru monitoringa zoonoz pri drobnici in iz raziskave »Mestni golob«;
- b) iz vzorcev odvzetih bolnim živalim (perutnina) in iz preventivnih pregledov eksotičnih živali.

Med izolate iz živil v prometu smo uvrstili vse razpoložljive izolate, s katerimi so razpolagali laboratoriji delujoči v okviru Zavodov za zdravstveno varstvo in Inštituta za varovanje zdravja. Poleg tega smo v raziskavo vključili izolate iz vzorcev živil, ki so bili

<sup>1</sup> Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

odvzeti v okviru uradnega nadzora nad proizvajalci (največ 2 izolata na serijo) in izolate iz vzorcev odvzetih v okviru temeljnih raziskav med klavnimi prašiči.

#### Izolati C. jejuni

Preiskali smo 158 izolatov iz kliničnih vzorcev odvzetih pri ljudeh, v okviru monitoringa zoonoz in temeljne študije je bilo pridobljenih 133 izolatov iz fecesa piščancev in 114 izolatov iz živil (meso, koža ali trup piščancev), 56 izolatov iz živil pa je bilo pridobljenih v okviru uradnega nadzora nad proizvajalci. 97 izolatov izvira iz leta 2007, 176 iz leta 2008, 185 iz leta 2009 in 48 iz leta 2010.

Na prisotnost S. Enteritidis in C. jejuni smo pregledali tudi 100 naključno izbranih živil perutninskega izvora iz prometa v različnih krajih Slovenije. Iz njih smo izolirali 45 sevov C. jejuni, ki smo jih vključili v raziskavo, medtem, ko so bila vsa živila negativna na S. Enteritidis.

#### Metode

##### Določanje občutljivosti za protimikrobna zdravila

Pri vseh izolatih smo določili občutljivost za protimikrobna zdravila z metodo difuzije z diski po Kirby Bauerju po navodilih CLSI (Clinical laboratory standards institute). Določili smo občutljivost za ampicilin (A), cefotaksim (X), gentamicin (G), ciprofloksacin (P), kloramfenikol (H), nalidiksično kislino (N), kanamicin (K), trimetoprim/sulfametoksazol (T), trimetoprim (R), sulfonamide (L), streptomycin (S) in tetracikline (Y). Uporabili smo Mueller-Hinton agar. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 35°C. Glede na velikost zaviralnih pasov smo izolate opredelili kot občutljive (S), zmerno odporne (I) oziroma odporne (R).

Za opredelitev rezistotipa smo testirali tisti nabor protimikrobnih zdravil, ki se poroča pri rutinskem delu oziroma v evropski informacijski sistem TESSy pri Evropskem centru za nalezljive bolezni (ECDC).

Kot pripadajoča različnima tipoma vzorcev odpornosti proti protimikrobnim zdravilom smo izolata opredelili takrat, ko sta se razlikovala najmanj v odpornosti proti enemu protimikrobnemu zdravilu. Rezistotipe smo označili s skupkom kratic protimikrobnih zdravil proti katerim je izolat odporen.

Pri paralelnih izolatih salmonel smo izbrali seve za določitev občutljivosti glede na PFGE profil.

##### Določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) z uporabo mikrodilucijske metode (Sensititre, Trek)

Uporabili smo mikrotitrne plošče (Sensititre, Trek), ki so mikroverzija klasične metode z uporabo bujona. Rezultat so kvantitativni (minimalna inhibitorna koncentracija - MIK) in kvalitativni (občutljiv ali odporen). Nabor sensititre EUCAMP plošč: gentamicin (GEN), ciprofloksacin (CIP), tetraciklin (TET), eritromicin (ERY), nalidiksinska kislina (NAL), kloramfenikol (CHL), streptomycin (STR). Za pripravo suspenzije za inokluacijo na plošče smo uporabili komercialno pripravljene Mueller-Hinton bujon z dodatkom lizirane konjske krvi CAMHBT + LHB, (Sensititre, Trek). Plošče smo inkubirali 24 ur pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi. Rezulate smo odčitali po priloženem protokolu in kvalitativno ovrednotili po priporočilih CRL za kampilobakte.

## Analiza kromosomske DNA s pulzno elektroforezo

Pri delu smo kot osnovo uporabili protokola, ki ju navajata mreži Pulse-Net Europe (za salmonele) in Pulse-Net USA (za kampilobaktrije), ki sta standardizirana in omogočata primerljivost rezultatov med laboratoriji.

### Salmonele:

Čisto bakterijsko kulturo smo inkubirali preko noči in naslednji dan spektrofotometrično umerili gostoto bakterijske suspenzije. 400  $\mu$ l bakterijske suspenzije z dodatkom 20  $\mu$ l proteinaze K smo vklopili v 400  $\mu$ l 1 % agaroze z nizkim tališčem, da se pri nadaljnji obdelavi DNA ne bi razlomila. Mešanico smo odpipetirali v satovje za pripravo agaroznih ploščic. Strjene agarozne ploščice smo nato dve uri inkubirali v pufru CLB z dodatkom 25  $\mu$ l proteinaze K v stresalniku pri 54°C. Po inkubaciji smo agarozne ploščice štirikrat po 15 minut izpirali s TE pufrom pri 45°C. Sledila je cepitev DNA z encimom XbaI. Tretjini agarozne ploščice smo dodali 200  $\mu$ l restriksijskega encima v zanj specifičnem pufru. Nato smo pripravili 1 % agarozni gel za elektroforezo in vanj vstavili agarozne ploščice z bakterijsko DNA. Poleg vzorcev, ki smo jih testirali, smo na gel vsakič nanesti tudi standardni sev Salmonella Braenderup. Ločevanje fragmentov je potekalo v elektroforeznem aparatu CHEF-DR III ali CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, ZDA). Pri tem smo uporabili pufer 1 $\times$ TBE. Elektroforeza je potekala 19 ur pri 14°C in pri napetosti 6V/cm ter kotu spreminjanja smeri toka 120°. Začetni in končni pulzni čas sta bila 2,2 oziroma 63,8 sekund.

### Kampilobaktri:

Bakterijske celice *C. jejuni* smo suspendirali v pufru PBS do optične gostote med 0,570 in 0,820 (OD 610). K 400  $\mu$ l suspenzije bakterijskih celic smo dodali enako količino 1 % agaroze in 20  $\mu$ l proteinaze K. S tako pripravljeno mešanico smo napolnili modelčke za agarozne ploščice in jih inkubirali 10 – 15 minut pri sobni temperaturi. Ko so se ploščice strdile, smo jih prenesli v centrifugirke in jih inkubirali 15 – 30 minut v mešanici pufra CLB in proteinaze K v vodni kopeli s stresanjem pri temperaturi 50 - 54°C. Ploščice smo nato najprej sprali z 10 – 15 ml ogrete sterilne destilirane vode, nato pa še enkrat 10 – 15 minut z 10 - 15 ml sterilne destilirane vode pri 50 - 54 °C. Ploščice smo nato še trikrat spirali v pufru TE, prav tako v vodni kopeli s stresanjem pri temperaturi 50 - 54 °C. Nato smo odrezali približno 2 mm širok košček posamezne ploščice in ga sprali v pufru, specifičnem za restriksijski encim SmaI. Temu smo po odstranitvi pufra dodali 200  $\mu$ l cepitvene mešanice, ki je vsebovala 179  $\mu$ l sterilne destilirane vode, 20  $\mu$ l pufra in 1  $\mu$ l encima SmaI (40 U/ $\mu$ l). Po ceptivi, ki je potekala 4 ure pri 25°C, smo odstranili cepitveno mešanico in ploščicam dodali 200  $\mu$ l pufra 0,5 $\times$ TBE. Pripravili smo 1 % agarozni gel v pufru TBE. Ploščice smo s kapljico agaroze pritrdili na konico glavnika in ga umestili v odprtino agaroznega gela, glavnika pa odstranili. Poleg vzorcev, ki smo jih testirali, smo na gel vsakič nanesti tudi standardni sev Salmonella Braenderup, ki je bil cepljen z restriksijskim encimom XbaI. Gel s ploščicami smo nato namestili v elektroforetsko kad s pufrom TBE. Elektroforeza je potekala 18 ur pri temperaturi 14 °C in pri napetosti 6V/cm. Začetni in končni pulzni čas sta bila 6,7 oziroma 35,4 sekund.

Po končani elektroforezi smo gel obarvali z etidijevim bromidom (1  $\mu$ g/ml) in sliko zajeli s pomočjo digitalnega dokumentacijskega sistema Gel Doc (Bio-Rad Laboratories, ZDA), oziroma GeneGenius (Syngene, VB).

## Določanje stopnje genetske sorodnosti med izolati

### a) Vizualna analiza profilov PFGE

Uporabljena je bila samo pri izolatih *S. Enteritidis*, kjer je stopnja genetske raznolikosti bistveno manjša kot pri izolatih *C. jejuni*. Restriksijske profile prevladujočih tipov smo analizirali v skladu s kriteriji po Tenoverju. Kriterije smo uporabili le pri prevladujočih tipih, saj so namenjeni analizi izolatov, za katere se sumi, da so del epidemije, v naši raziskavi pa gre za analizo epidemiološko nepovezanih izolatov. Z interpretacijo po Tenoverju smo dejansko preverili, ali smo v dendrogramu pridobili smiselne rezultate.

#### Kriteriji za določanje stopnje sorodnosti

1. Kot genetsko neločljive oziroma identične smo izolate označili takrat, ko so imeli njihovi profili PFGE enako število fragmentov in ko so bili fragmenti enake velikosti.
2. Če so se izolati razlikovali v do treh fragmentih, smo jih označili kot genetsko tesno povezane.
3. Če so se izolati razlikovali v 4 do 6 fragmentih, smo jih označili kot verjetno genetsko povezane.
4. Če so se izolati razlikovali v 7 ali več fragmentih, smo jih označili kot genetsko nepovezane oziroma nesorodne.

#### Označevanje profilov PFGE

Označili smo le prevladujoče profile, to je tiste, ki smo jih našli pri več kot treh izolatih. Označili smo jih z velikimi tiskanimi črkami A, B, C itn.

### b) Analiza profilov PFGE z računalniškim programom

Analizo z računalniškim programom smo naredili tako pri izolatih *S. Enteritidis* kot pri izolatih *C. jejuni*. Stopnjo podobnosti sevov smo ugotavljali s programoma Gel Compar II (verzija 3.0, Applied Maths, Belgija) in BioNumerics (verzija 5.0, Applied Maths, Belgija), ki izračunavata stopnjo sorodnosti in oblikujeta dendrogram na podlagi algoritma UPGMA (angl. unweighted pair group method using arithmetic averages).

Gre za najpogosteje uporabljano metodo analize gruč (klastrov, angl. clusters), zlasti pri analizi elektroforetskih profilov dobljenih po različnih restriksijskih metodah, pri primerjanju nukleotidnih zaporedij in analizi hibridizacijskih vzorcev. UPGMA vsako operativno taksonomsko enoto (OTE, angl. operational taxonomic unit), ki predstavlja skupek opazovanih lastnosti, v našem primeru je to skupek fragmentov ali skupino (klastro) OTE, poveže z znanim klastrom na podlagi povprečja distanc med vsemi kombinacijami parov OTE. Pri tem je vsaki OTE dan enak pomen – teža. Distanco ( $D$ ) oziroma oddaljenost izračunamo kot  $D = 1-s$ , pri čemer je  $s$  vrednost koeficienta podobnosti in ima vrednost od 0 do 1. Največkrat se uporablja Dicov koeficient podobnosti, ki izraža razmerje med številom skupnih fragmentov in številom vseh fragmentov. Za razliko od nekaterih drugih koeficientov podobnosti (navadni koeficient ujemanja, Sneath in Sokalov koeficient) pri izračunu stopnje podobnosti ne upošteva števila primerov, ko je opazovana lastnost odsotna pri obeh primerjanih OTE (v našem primeru števila primerov, ko je določen fragment odsoten pri obeh primerjanih profilih), temveč le število primerov, ko je opazovana lastnost prisotna pri obeh ali pri vsaj eni OTE. Ta lastnost koeficienta je v primeru analize restriksijskih profilov ugodna, saj pri restriksijskih profilih vnaprej ne poznamo števila fragmentov in njihovih pozicij. V

takšnem primeru lahko vrednost števila primerov, ko sta fragmenta odsotna pri obeh primerjanih profilih tako naraste, da popači izračunani koeficient. S pomočjo dendrograma poskušamo poiskati vzorce razvrščanja znotraj zbirke podatkov, v našem primeru profilov. Pri vnosu slik gelov v računalniški program smo slednje normalizirali s pomočja standardnega seva in pri določanju položajev fragmentov dopustili 1 % odstopanje. Primerjave med opredelitvijo stopnje epidemiološke povezanosti s pomočjo vizualne analize profilov po Tenoverju in izračunom Dicovega koeficienta podobnosti so pokazale, da imajo izolati, ki jih po Tenoverju opredelimo kot identične Dicov koeficient večji od 95 %, tesno povezani izolati pa koeficient med 85 in 95 %.

Pri analizi izolatov C. jejuni, ki so pokazali precej večjo genetsko pestrost kot izolati S. Enteritidis, smo naredili poleg skupnega dendrograma vseh izolatov še dendrograme po posameznih skupinah (človek, živali, živila...). Rezistotipi pri izolatih C. jejuni so narejeni glede na klastre, ki smo jih definirali na podlagi posameznih dendrogramov, da bi ugotovili, ali se rezistotipi znotraj klastra razlikujejo.

## Rezultati

Vsi rezultati, pridobljeni v raziskavi, so prikazani v dveh dendrogramih, ki sta prilogi tega poročila. Podatki, s katerimi sta dendrograma opremljena, vsebujejo profil PFGE, ustanovo, ki je prispevala izolat, leto izolacije, identifikacijsko številko izolata in rezistotip.

### 1. Analiza sorodnosti izolatov

#### 1.1 Izolati S. Enteritidis

Analiza je pokazala, da ima med 395 izolati 123 izolatov enak profil A (31,1 %), 56 izolatov profil B (14,2 %), 120 izolatov profil C (30,4 %), po 13 izolatov profila D in E (po 3,3 %), 5 izolatov profil F (1,3 %) in 4 izolati profil G (1,0 %). Profila A in B se razlikujeta le v enem pasu, profila A in C v treh pasovih, A in E v dveh pasovih in A in G le v enem pasu. Profili A, B, C, E in G pripadajo skupini izolatov, za katero je Dicov koeficient manjši od 85 %, kar kaže na tesno genetsko sorodnost oziroma na skupno klonalno poreklo. Profila F in G se razlikujeta v enem pasu in pripadata skupini izolatov, ki je genetsko bolj oddaljena, pripada drugemu klonalnemu kompleksu kot skupina s profili A, B, C, E in G.

Profilom A, B in C tako pripada kar 299 izolatov, kar je 75,7 % vseh analiziranih izolatov. 123 izolatov s profilom A je bilo pridobljenih med letoma 2003 in vključno 2009 iz vseh kategorij vzorcev in v vseh sodelujočih ustanovah. Izolati s profilom A so v Sloveniji prisotni vsaj 7 let v vsej prehranski verigi.

56 izolatov profila B je bilo prav tako pridobljenih v obdobju sedmih let iz vseh kategorij vzorcev in v vseh sodelujočih ustanovah. Med temi izolati sta tudi dva, ki izhajata iz živali iz uvoza, kar pomeni, da je ta profil prisoten tudi zunaj meja Slovenije.

Izolati s profilom C so v Sloveniji prisotni vsaj 9 let, saj so bili pridobljeni med letoma 2002 do vključno 2010. Verjetno je ta profil navzoč še dlje, saj sta bila prva dva izolata iz leta 2002 pridobljena iz vzorcev živil v prometu.

Skupina 13 izolatov s profilom D vključuje 10 izolatov živalskega porekla, dva sta humanega izvora, prvi iz leta 2005 pa je bil osamljen iz živila. Profil D je v Sloveniji tako prisoten 5 let, verjetno pa še dlje.

Med 13 izolati s profilom E je 12 izolatov iz živali iz leta 2008 in eden iz živila iz leta 2004. Kaže, da je bil ta tip S. Enteritidis epidemičen med živalmi v letu 2008, sicer pa



prav tako prisoten daljše obdobje.

Kot epidemičnega med živalmi lahko opredelimo tudi profil F, saj je vseh 5 izolatov iz vzorcev živalskega porekla iz let 2008 in 2009. Gre za edini pogostejši tip, ki je glede na rezultate te raziskave ostal omejen le na živali.

Čeprav je skupina izolatov, ki pripadajo profilu G s štirimi izolati najmanjša, pa vključuje izolate vseh izvorov (en izolat iz 2003 iz živila iz območja Nove Gorice, 2 izolata iz humanega izvora iz leta 2007 iz območja Celja in Ljubljane ter en izolat živalskega porekla iz leta 2010) skozi dolgo časovno obdobje. Primer kaže, da lahko že manjši nabor izolatov zazna seve z večjim potencialom širjenja.

## 1.2. Izolati C. jejuni

Izolati C. jejuni so se razvrstili v 64 klastrov. Vseh 8 večjih klastrov (ki so združevali 10 ali več izolatov) je vsebovalo seve izolirane iz živali, živil in ljudi. Le dva manjša klastra sta vsebovala seve izolirane samo iz ljudi.

Glede na dobre epidemiološke podatke, pridobljene v okviru temeljne študije in monitoringa zoonoz, smo izolate C. jejuni analizirali z več vidikov ter tudi po posameznih kategorijah vzorcev. Zanimalo nas je, kakšni profili PFGE se pojavljajo pri izolatih, ki so izvirali iz živali istega rejca. V isti reji brojlerjev so se v daljšem časovnem obdobju samo izjemoma pojavljali isti profili, kar kaže na veliko pestrost sevov C. jejuni v rejnem okolju. Nadalje nas je zanimalo, kakšni profili se pojavljajo v posameznih klavnicih. Ugotovili smo, da se je v eni klavnici, od koder je izviralo 16 izolatov iz let 2007-2010, pojavilo 15 različnih PFGE profilov, 2 izolata, ki sta bila odvzeta v časovnem razmaku 3 tednov od 2 različnih rejcev, pa sta izražala enak profil. V drugi klavnici, od koder je izviralo 25 izolatov iz let 2007-2010, se je pojavilo več kot 10 različnih profilov ter 2 klastra: prvi je vseboval 2 izolata, ki sta bila odvzeta v časovnem razmaku 11 dni od 2 različnih rejcev, drugi pa 9 izolatov, ki so bili odvzeti v razmaku dveh let od 9 različnih rejcev. Zaradi širokega časovnega razpona klanja in različnosti rejcev, t.j. izvora izolatov v omenjeni klavnici, lahko sklepamo, da obstaja možnost perzistence določenih tipov izolatov v klavnicih oziroma v naravi. V tretji klavnici, od koder je izhajalo največje število izolatov, t.j. 85 izolatov iz let 2007-2010, se je pojavilo več kot 35 različnih profilov ter 14 klastrov, od katerih je bil en večji (vseboval je 17 izolatov, ki so bili odvzeti v razmaku treh let od 16 različnih rejcev). Klaster iz te klavnice, ki je vseboval 8 izolatov, je izražal profil, ki je bil enak kot v drugem, t.j. večjem klastru iz druge klavnice. Ugotovili smo, da so se v nekaj primerih pojavljali isti profili pri sevih izoliranih iz trupov piščancev, ki so bili klani v isti klavnici na isti dan in so prihajali iz različnih rej.

Na podlagi načrtne preiskave vzorcev fecesa in trupa iste živali (podatki iz temeljne študije za leto 2008) smo ugotovili, da imajo sevi, izolirani iz fecesa in trupa iste živali pogosto enak profil.

## 2. Analiza občutljivosti izolatov za protimikrobna sredstva

### 2.1 Izolati S. Enteritidis

Od 395 izolatov je bilo 340 izolatov občutljivih na vsa protimikrobna sredstva. Od 55 izolatov, pri katerih smo zaznali odpornost proti protimikrobnim sredstvom, je bilo 43 izolatov odpornih le proti enemu protimikrobnemu sredstvu (eden proti gentamicinu, 2 proti tetraciklinom, 1 proti ciprofloksacinu, 5 proti ampicilinu, 6 proti streptomycinu, 13 proti sulfonamidom in 15 proti nalidiksični kislini. 5 izolatov je bilo odpornih proti dvema protimikrobnima sredstvom, trije proti trem, eden proti petim in trije izolati proti sedmim različnim protimikrobnim sredstvom. Večkratno odpornih izolatov je bilo le 8. Izstopa

odpornost proti kinolonom, saj smo jo zaznali pri 20 izolatih. 29 od 55 odpornih izolatov (52,7 %) je bilo pripadalo živalim, 13 ljudem (23,6 %) in 13 živilom (23,6 %).

## 2.2 Izolati C. jejuni

Od 346 izolatov jih je bilo 74 občutljivih za vsa protimikrobna sredstva. 12 jih je bilo odpornih samo proti ciprofloksacinu, 5 samo proti tetraciklinom, 118 proti nalidiksični kislini in ciprofloksacinu, 53 proti tetraciklinom in ciprofloksacinu, 71 proti tetraciklinom, nalidiksični kislini in ciprofloksacinu, 3 proti eritromicinu, nalidiksični kislini in ciprofloksacinu, 2 proti eritromicinu, tetraciklinom in ciprofloksacinu, 1 proti eritromicinu, tetraciklinom, nalidiksični kislini in ciprofloksacinu ter 2 proti gentamicinu, tetraciklinom in nalidiksični kislini. Sevi, ki so bili odporni proti gentamicinu ali eritromicinu, so bili izolirani le iz ljudi.

## 3. Analiza povezav med rezistotipi in profili PFGE

V raziskavi pri obeh vrstah preiskovanih bakterij ni bilo mogoče vzpostaviti pomembnih povezav med profili PFGE in rezistotipi. Izolati z enakim profilom PFGE pripadajo različnim rezistotipom in nasprotno, izolati z istim rezistotipom imajo različne profile PFGE.

Pri salmonelah smo med 123 izolati s profilom A našli le 15 odpornih izolatov, ki pripadajo 8 različnim rezistotipom. Med 56 izolati s profilom B in 120 izolati skupine C smo našli po 10 odpornih izolatov pripadajočih po trem različnim rezistotipom. Med izolati s profilom D smo našli le en odporen izolat, v skupini s profilom E pa 3 odporne izolate istega rezistotipa. V skupini F in G ni bilo odpornih izolatov.

Najbolj odporni izolati (proti sedmim različnim protimikrobnim sredstvom) so bili omejeni le na izolate s profilom E, izolati z izolirano odpornostjo proti ampicilinu pa so le med izolati s profilom A.

Pri kampilobaktrih smo med 64 klastri po eni strani našli 38 manjših klastrov (ki so združevali od 2 do 9 izolatov), kjer so izolati izražali enak rezistotip, po drugi strani pa smo izolate v 26 preostalih klastrih lahko še dodatno razvrstili po rezistotipu, ki se je znotraj klastra razlikoval. V vseh osmih večjih klastrih je 10 ali več izolatov klastra pripadalo 2 do 6 različnim rezistotipom. Med njimi je bila zastopana večina rezistotipov od ugotovljenih.

## Zaključki:

1. Z raziskavo smo v Sloveniji opredelili tri močno prevladujoče tipe S. Enteritidis (A, B in C), ki so navzoči v prehranski verigi vsaj 7 do 9 let.
2. Tudi drugi pogostejši tipi (C, D, E, F in G) so v Sloveniji prisotni več kot tri leta; razen enega so vsi prisotni v prehranski verigi.
3. Širjenje S. Enteritidis v Sloveniji je izrazito klonalno.
4. Ker so bili izolati s prevladujočimi profili pridobljeni iz živali domače vzreje, lahko trdimo, da je večina primerov okužb pri človeku v Sloveniji posledica uživanja hrane domače pridelave.
5. PFGE profil S. Enteritidis je skozi leta stabilen označevalec, kar omogoča dolgoročne raziskave širjenja izolatov in ob dobri epidemiološki raziskavi tudi potrjevanje

epidemij. Je torej primerna metoda, s katero je mogoče graditi nacionalno bazo profilov, namenjeno epidemiološkim raziskavam.

6. Odpornost in še posebej večkratna odpornost med izolati *S. Enteritidis* se v tej raziskavi zaenkrat ni izkazala kot problematična, saj je 86,1 % izolatov občutljivih za vsa testirana protimikrobna sredstva. Z 21 od 55 odpornih izolatov izstopa le odpornost proti kinolonom, kar pa je pomembno pri zdravljenju okužb pri človeku.

7. Rezistotip pri preučevanju klonalne narave širjenja *S. Enteritidis* ni koristno orodje, je pa neprecenljive vrednosti pri zgodnjem odkrivanju in omejevanju širjenja odpornosti proti protimikrobnim sredstvom.

8. Smiselna bi bila sprotna tipizacija vseh izolatov *S. Enteritidis* iz rutine, kar bi med drugim omogočilo odkrivanje hitrosti širjenja pomembnih tipov v prehranski verigi, odkrivanje tipov z večjim potencialom širjenja, odkrivanje epidemij večjih razsežnosti in sledenje izvora epidemičnih sevov.

9. Izolati *C. jejuni* so izjemno genetsko raznoliki. Med 506 izolati smo ugotovili kar 64 klastrov, med katerimi je le eden združeval več kot trideset sevov.

10. Enaki profili PFGE so se pri izolatih *C. jejuni* pojavljali pri vseh kategorijah preiskovanih vzorcev (iz živali, živil in ljudi), skozi vse štiriletno obdobje, kar nakazuje, da so živali neposreden vir okužb za ljudi.

11. Sevi *C. jejuni*, izolirani iz živali istih rejcev, imajo v različnih obdobjih praviloma različne profile, kar pomeni, da sevi v reji ne perzistirajo, temveč se na novo vhlevljene živali okužujejo z drugimi sevi.

12. Sevi *C. jejuni*, izolirani iz trupov živali, imajo pogosto isti profil kot sevi, izolirani iz fecesa iste živali, kar kaže na neposredno kontaminacijo v klavnicah.

13. Sevi *C. jejuni*, izolirani iz trupov živali različnih rej, ki so bile klane istočasno v isti klavnici, imajo lahko enak profil. Potrebno bi bilo pripraviti ukrepe, ki bi preprečevali ali vsaj omejevali navzkrižno kontaminacijo piščancev v klavnicah.

14. Pri preiskavi 100 živil perutninskega porekla iz prometa smo kar iz 45 izolirali *C. jejuni*, kar kaže na veliko stopnjo kontaminiranosti živil s kampilobaktri.

15. Za razliko od profilov PFGE se rezistotipi, ki vsebujejo odpornost na gentamicin ali eritromicin, pojavljajo samo pri sevih izoliranih iz ljudi.

16. Samo 21,4 % sevov kampilobaktrov je bilo občutljivih na vsa protimikrobna sredstva. Problematična je predvsem rezistenca na kinolone, ki se pojavlja pri večini izolatov.

17. Isti rezistotipi se pojavljajo pri različnih profilih in nasprotno, kar nakazuje majhno uporabno vrednost rezistotipov pri nadaljni tipizaciji sevov.

18. Za pravilno vrednotenje epidemioloških analiz in za hitro in učinkovito ukrepanje pri izbruhih epidemij so ključnega pomena dobri epidemiološki podatki. Le-te pa lahko pridobimo le z dobrim sodelovanjem vseh vpletenih inštitucij. Prav tako je za dobro delo na področju zoonoz in varne hrane, nujno nenehno medsebojno strokovno in znanstveno sodelovanje strokovnjakov iz različnih področij.

### 3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen<sup>2</sup> rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvom, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
  - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
  - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

---

<sup>2</sup> Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

V okviru raziskovalnega projekta smo prvič tipizirali veliko število sevov različnega porekla (živali, živila, ljudje) in tako dobili vpogled v genetsko raznolikost sevov *S. Enteritidis* in *C. jejuni* v Sloveniji, kar bo bistveno pripomoglo k vrednotenju rezultatov tipizacij, saj je predpogoj za to poznavanje pestrosti izolatov na določenem področju. Ugotovili smo, da so sevi salmonel relativno občutljivi proti antibiotikom, medtem ko so sevi kampilobaktrov bolj odporni proti antibiotikom, še posebej proti kinolonom. Rezultati kažejo, da so živali vir okužbe s salmonelami in kampilobaktromi za ljudi, vendar pa rezultati pri testiranju odpornosti kampilobaktrov nakazujejo, da so multiplorezistentni sevi pri ljudeh verjetno posledica napačnega zdravljenja ljudi in ne primarne rezistence.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Na osnovi rezultatov projekta, se bodo lahko izdelali ukrepi za izboljšanje postopkov med klanjem živali in za ravnanje z živili živalskega porekla, saj je trenutna stopnja kontaminiranosti živil zaskrbljujoča. Tako bomo lahko dolgoročno izboljšali varnost živil in s tem zdravje ljudi, ter nenazadnje tudi ekonomičnost živilsko predelovalne industrije. Prav tako moramo na osnovi rezultatov raziskave posvetiti posebno pozornost naraščanju odpornosti kampilobaktrov proti antibiotikom in preprečiti morebiten velik zdravstveni problem v bodočnosti.

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

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Epidemiologi, mikrobiologi, živilsko predelovalna industrija, rejci živali in potrošniki.

3.7. Število diplomantov, magistrstov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

V okviru projekta je v zaključni fazi izdelave doktorska naloga z odobrenim naslovom "Epidemiološka raziskava okužb živali z bakterijo *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*."

#### 4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

PulseNet Europe  
Bilateralni projekt med Republiko Slovenijo in Republiko BiH v letih 2010-2011. Perutnina kot izvor nevarnih zoonoz salmoneloze in kampilobakterioze, BI-BA/10-11-001, nosilec v Sloveniji-M. Ocepek,  
Bilateralni projekt med Republiko Slovenijo in Republiko Hrvaško v letih 2010-2011. Izpopolnjevanje sodobne diagnostike povzročiteljev zoonoz, BI-HR/10-11-018, nosilec v Sloveniji-M. Pate,  
Bilateralni projekt med Republiko Slovenijo in Republiko Srbijo v letih 2010-2011. Analiza mikrobiološkega tveganja (*Campylobacter*) v proizvodnji perutninskega mesa, BI-SR/10-11-002, sodeluje-M. Ocepek,  
Sodelovanje s Centralnim referenčnim laboratorijem (CRL) EU za salmonele,  
Sodelovanje s CRL za kampilobaktre,  
Sodelovanje s CRL za odpornost bakterij proti protimikrobnim zdravilom  
Sodelovanje z ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) v skupini za bolezni, ki se prenašajo s hrano in vodo ter zoonoze  
Sodelovanje z European Food Safety Authority (EFSA)  
Sodelovanje z Global Foodborne Infections Network pri Svetovni zdravstveni organizaciji (WHO GFN)  
Sodelovanje v EU komisiji za mikrobiološke kriterije (European Commission, SANCO E2)  
Sodelovanje v evropski mreži EU-IBIS (European Invasive Bacterial Infections Surveillance Network)

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

S pomočjo sodelovanja s PulseNet Europe smo vpeljali sistem tipizacije povzročiteljev zoonoz povzročenih s kontaminirano hrano in sistema mednarodne primerljivosti rezultatov.  
Bilateralni projekti še potekajo, v vseh primerih pa gre v prvi fazi za izmenjavo izkušenj in znanj ter medsebojno izpopolnjevanje in usklajevanje metod dela, v drugi fazi pa skupne raziskave na področju epidemiološkega proučevanja zoonoz, ki so posledica uživanja perutninskega mesa.  
Pomen sodelovanja s CRL-ji se odraža predvsem v usklajevanju metod znotraj EU, rednega letnega preverjanja usposobljenosti laboratorijev v okviru medlaboratorijskih kontrol in navezovanja stikov z drugimi laboratoriji v EU.

## 5. Bibliografski rezultati<sup>3</sup> :

*Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.*

<sup>3</sup> Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani:<http://www.izum.si/>

## 6. Druge reference<sup>4</sup> vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

Vpeljava in medsebojna uskladitev metod za tipizacijo salmonel in kampilobaktrov v vseh vpletenih laboratorijih (IVZ, ZZV Celje, IMP-VF), ki se sedaj uporabljajo v rutinski diagnostiki.

Medsebojna uskladitev metod za ugotavljanje odpornosti salmonel in kampilobaktrov proti protimikrobnim zdravilom.

Člani projektne skupine med drugim vodijo:

Nacionalni referenčni laboratorij za salmonele

Nacionalni referenčni laboratorij za kampilobakte

Oddelek za medicinsko mikrobiologijo z referenčnim laboratorijem, CNB, IVZ.

Zavod za zdravstveno varstvo Celje

in koordinirajo zbiranje podatkov o serotipih in odpornosti izolatov vseh salmonel humanega izvora.

Delni rezultati projekta so bili predstavljeni na 4. kongresu Slovenskega mikrobiološkega društva v Portorožu, november 2008, na Evropskem veterinarskem tednu, Ljubljana 2010 in na seminarju "Salmonele - zdravstveni problem ljudi in živali?", ki ga je organiziral Center za podiplomski študij in permanentno izobraževanje VF v aprilu 2010.

Končni rezultati projekta bodo predstavljeni v okviru mikrobiološke delavnice, ki jo bo predvidoma v oktobru 2010 v sodelovanju s člani projektne skupine organiziralo Slovensko mikrobiološko društvo.

---

<sup>4</sup> Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije.

Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.