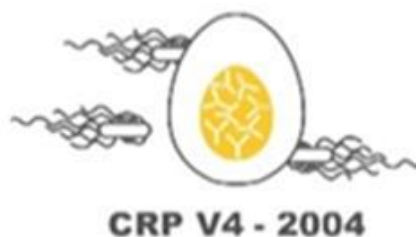


Ciljni raziskovani projekt V4-2004

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije
Javna agencija za znanstveno raziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije

Obvladovanje okužb z bakterijo *Salmonella* Infantis v rejah piščancev brojlerjev

Zaključno poročilo



Ljubljana, november 2023

Poročilo smo pripravili na Veterinarski fakulteti, Univerza v Ljubljani (VF UL), v sodelovanju s Fakulteto za vede o zdravju, Univerza na Primorskem (FVZ UP) in Kemijskim inštitutom (KI). Projekt sta financirala Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in Javna agencija za znanstveno raziskovalno in inovacijsko dejavnost.

V projektu sta sodelovali podjetji Pivka perutninarstvo d.d. in VETAM Jata d.o.o..

Avtorji:

Olga Zorman Rojs (VF UL)
Jana Avberšek (VF UL)
Brigita Slavec (VF UL)
Uroš Krapež (VF UL)
Katja Kranjc (FVZ UP)
Darja Barlič Maganja (FVZ UP)
Jasna Mićunović (VF UL)
Bojan Papić (VF UL)
Simon Caserman (KI)
Štefan Pintarič (VF UL)
Alenka Dovč (VF UL)
Matjaž Ocepek (VF UL)
Petra Zrimšek (VF UL)
Maja Kavalič (VF UL)
Darja Kušar (VF UL)
Igor Gruntar (VF UL)
Tina Pirš (VF UL)

POVZETEK

Salmonella Infantis je v Evropi najpogostejše izoliran serotip salmonel pri pitovnih piščancih in predstavlja več kot polovico izolatov vseh salmonel iz jat in mesa pitovnih piščancev. Omenjeni serotip tudi v Sloveniji prevladuje v jatah, svežem mesu in mesnih pripravkih pitovnih piščancev. *Salmonella* lahko na različne načine vstopi v katerokoli fazo procesa reje perutnine, zato je poznavanje kritičnih točk vnosa in mehanizmov perzistence te bakterije v okolju izjemno pomembno za učinkovito preprečevanje ponavljajočih se okužb. Dosedanji podatki kažejo, da je *S. Infantis* pogosto ponovno potrjena na istih gospodarstvih in v istih objektih, kar kaže na izjemno obstojnost tega serotipa v okolju in na veliko sposobnost širjenja v rejah pitovnih piščancev.

Eden od glavnih ciljev tega projekta je bil ugotoviti, kakšna je pojavnost in katere so kritične točke vnosa *S. Infantis* v farme pitovnih piščancev. V ta del raziskave smo vključili farmo pitovnih piščancev z osmimi objekti, ki jih oskrbujejo trije rejci. Shema vzorčenj v letu 2021 je zajemala različna mesta v vzrejnih prostorih in predprostorih objektov, okolico objektov, vključno s transportnimi sredstvi, oblačili/obutvijo zaposlenih na farmi, ter klavnico. Rezultati so pokazali, da so kritična mesta kontaminacije s *S. Infantis* v vzrejnih prostorih hlevov napajalniki, tla in prezračevalni sistemi. V predprostorih objektov so bila najpogostejše kontaminirana tla, pozitivne so bile tudi delovne površine in različni predmeti, ki se uporabljajo za čiščenje objektov. Izmed vzorcev, ki smo jih odvzeli v okolici hlevov, smo *S. Infantis* najpogostejše potrdili v vzorcih tal pred in med objekti. Ugotovili smo tudi, da veliko možnost vnosa na farmo predstavljajo prevozna sredstva – tako vozila rejcev kot tudi vozila za prevoz piščancev v klavnico.

Pred razkužbo objektov smo preverili učinkovitost čiščenja, saj je to eden od pomembnih ukrepov, ki omogoča uspešno razkužbo. Skupaj z rejci smo pregledali stanje objektov po čiščenju in identificirali pomanjkljivosti, ki vodijo do zaostalih nečistoč in posledično slabšega delovanja razkužil. Na osnovi identificiranih kritičnih točk smo dopolnili proces razkužbe. Rezultati bakterioloških preiskav pred vhlevitvijo novih jat so pokazali, da so bili tako objekti kot tudi okolica farme dobro očiščeni in razkuženi. Izmed 164 vzorcev je bil pozitiven le vzorec, odvzet iz talne površine predprostora hleva (1/164). Po končanem pitanju smo *S. Infantis* potrdili v vzorcih iz istega hleva kot pred pričetkom pitanja in v predprostoru še enega hleva, ki ga oskrbuje isti rejec. Vsi vzorci iz drugih šestih objektov so bili negativni. Pred naslednjo vhlevitvijo v tem objektu so bili negativni vsi vzorci (0/27). Na podlagi opredeljenih kritičnih točk, smo v letu 2022 na farmi izvedli ponovno testiranje na prisotnost *S. Infantis*. Ugotovili smo, da so bili objekti pred pričetkom proizvodnega ciklusa dobro očiščeni in razkuženi, saj z mikrobiološkimi preiskavami nismo potrdili prisotnosti *S. Infantis* (0/64). Po končanem pitanju smo *S. Infantis* potrdili v štirih objektih, med njimi tudi v enem, kjer kontaminacije s *S. Infantis* v letu 2021 nismo potrdili.

S sekvenciranjem celotnih genomov (WGS) izolatov *S. Infantis* ($n = 69$), ki smo jih pridobili v okviru vseh vzorčenj na farmi, smo ugotovili, da vsi izolati pripadajo sekvenčnemu tipu ST32 in imajo plazmid pESI. Na osnovi analize zaporedij lokusov osrednjega genoma (cgMLST) smo izolate lahko razvrstili v pet gruč (*angl.* cluster); v posamezno gručo so se razvrščali predvsem izolati iz objektov istega rejca, vendar pa so bili v treh gručah (1, 3 in 4) tudi posamezni izolati iz objektov drugih rejcev. V gručah 1, 2 in 5 so bili samo izolati iz leta 2021, medtem ko so bili v gručah 3 izolati iz let 2021 in 2022, v gručah 4 pa samo izolati iz leta 2022. Rezultati nakazujejo stalno perzistenco istih klonov *S. Infantis* v hlevih istega rejca (ali stalen vnos istih klonov iz okolja v objekt) in občasne prenose klonov *S. Infantis* med hlevi posameznih rejcev, vendar pa prihaja tudi do vnosov novih sevov na farmo. S presejalnim testiranjem izolatov na selektivnih gojiščih nismo odkrili izolatov *S. Infantis* z determinantami ESBL. Izbrane izolate *S. Infantis* z ali brez plazmida pESI, ki so izvirali iz perutnine, perutninskih izdelkov in ljudi, smo presejalno testirali na sposobnost tvorbe biofilma in *in vitro* učinkovitost izbranih razkužil (Ecocid S, etanol in vodikov peroksid). Sposobnost tvorbe biofilma sevov *S. Infantis* s plazmidom pESI pri temperaturi 20 °C in 28 °C pri inkubacijskem času 168 ur je bila večja v primerjavi z izolati brez plazmida pESI. Rezultati testiranja učinkovitosti razkužil na izolat *S. Infantis* z visoko sposobnostjo tvorbe biofilma so pokazali, da sta tako 1 % Ecocid kot 70 % etanol v laboratorijskih razmerah učinkovita pri odstranjevanju 72 in 168 ur starega biofilma *S. Infantis* pri kontaktnem času 15 min, kar pa ne velja za vodikov peroksid. Dodatno smo preverili tudi protimikrobno in antiadhezivno učinkovitost biocidov Virocid, Sterizid P12 DES, Dioksilek, Interkokask in ionizirane/aktivne vode, ki

se pogosteje uporabljajo v terenskih pogojih. Kot najuspešnejša v preprečevanju adhezije po 24 urah sta se izkazala Dioksilek in Interkokask.

V okviru možnosti preprečevanja okužb s specifičnimi protitelesi IgY, pridobljenimi iz jajčnega rumenjaka, smo uspešno imunizirali kokoši z izbranim izolatom *S. Infantis* ter z uporabo netoksičnih reagentov izolirali IgY iz jajčnega rumenjaka. V povprečju smo pridobili 7,75 mg IgY/mL rumenjaka. Specifično in učinkovito prepoznavo *S. Infantis* s serumi kokoši in z izolati njihovih jajčnih IgY smo najprej potrdili in kvantificirali s testom ELISA. Naknadno pa smo opsonizacijo *S. Infantis* z IgY cepljenih kokoši in s tem povezano tvorbo bakterijskih aglutinacij pokazali s konfokalno mikroskopskimi posnetki. Učinkovitost izoliranih protiteles pri omejevanju vdora *S. Infantis* v celice smo preverjali na humani črevesni epitelijski celični liniji Caco-2. Pokazali smo koncentracijsko odvisno zmanjšanje vdora bakterij v celice, izmerjene vrednosti adhezivnosti na celice pa niso dale konsistentnih odgovorov. Na celičnem modelu črevesne sluznice smo potrdili izgubo preko epitelijske električne upornosti v odvisnosti od velikosti inokuluma in trajanja izpostavitve *S. Infantis*. Preverili smo vpliv IgY na proliferacijo in migracijo *S. Infantis* v kulturi, vendar rezultati kvantitativnega PCR in sledenja rasti kolonijam ter migracije na čvrstem gojišču niso potrdile verjetnosti teh dveh mehanizmov pri zamejitvi delovanja bakterij z uporabo IgY. Interakcijo *S. Infantis* z epitelijskim modelom smo demonstrirali tudi s konfokalno mikroskopijo. Ugotovili smo zgostitve bakterij na apikalni celični membrani in posamezne bakterije v oziroma pod epitelom. Zgostitve so korelirale s časom kokulture bakterij s celicami in jih ocenjujemo kot izrazitejše v odsotnosti zašitnih IgY.

Z metodo WGS smo tipizirali izolate *S. Infantis* iz pitovnih piščancev različnih nosilcev dejavnosti, živil in ljudi, ki so bili pridobljeni v letih 2019–2022 ($n = 162$) in jih primerjali s celotno bazo slovenskega NRL za salmonele, v kateri je skupno 357 genomskih zaporedij *S. Infantis* (pridobljenih v letih 2007–2022). Večina izolatov *S. Infantis* ($n = 354$) je pripadala MLST ST32, ki je najbolj razširjen tip *S. Infantis* pri nas in v Evropi. Plazmid pESI smo ugotovili pri 340/357 (95,2 %) izolatov, kar kaže, da so sevi brez plazmida pESI v nacionalnem in globalnem merilu vse redkejši. Pri naših izolatih smo ugotovili štiri različice okrnjenega plazmida pESI, kar še dodatno potrjuje veliko genomsko plastičnost plazmida pESI, ki omogoča evolucijsko prilagoditev *S. Infantis* na različne okoljske razmere. Tovrstni izolati z okrnjenim plazmidom pESI niso imeli genov *sul1*, *tet(A)* in/ali *aadA1* oz. so imeli nepopoln gen *tet(A)*. Nekateri izolati z okrnjenimi različicami pESI so imeli dodatne gene za odpornost proti penicilinom ali trimetoprimu, zato okrnjena različica pESI ne pomeni nujno tudi odpornosti proti manjšim skupinam antibiotikov.

Vsi izolati *S. Infantis* iz naše baze so se razvrščali v 20 različnih rezistotipov, med katerimi ni nobeden vključeval determinant ESBL, prav tako pa pri nobenem izolatu nismo našli genov za odpornost proti kolistinu. Ugotovili smo 30 različnih genov in mutacij za odpornost, ki so bili povezani z odpornostjo proti šestim skupinam protimikrobnih zdravil (aminoglikozidi, fluorokinoloni, penicilini, tetraciklini, antagonisti folne kisline in fenikoli) in nitrofurantoinu. Večkratno odpornih (odpornih proti trem ali več skupinam protimikrobnih zdravil) izolatov *S. Infantis* je bilo 337/357 (94,4 %). Večina pESI-pozitivnih izolatov *S. Infantis* (333/357; 93,3 %) je imela tudi gene za odpornost proti kvarternim amonijevim spojinam (*qacE11*) in živemu srebru (*mer*). Medsebojna primerjava sorodnosti sevov iz vseh treh virov nakazuje, da so bili v nekaterih primerih slovenski pitovni piščanci in meso vir okužbe za ljudi, saj smo ugotovili enake klone *S. Infantis* pri ljudeh, živalih in živilih. Vendarle vir okužbe za večino humanih primerov ostaja neznan.

SUMMARY

Salmonella Infantis is the most frequently isolated *Salmonella* serotype in broilers in Europe and accounts for more than half of all *Salmonella* isolates from broiler flocks and broiler meat. This serotype is also the most prevalent serotype in broiler flocks, fresh broiler meat, and meat products in Slovenia. Because *Salmonella* can enter any stage of the poultry farming process through different pathways, understanding the critical points of introduction and the mechanisms of persistence of this bacterium in the environment is very important for the effective prevention of recurrent infections. *S. Infantis* is often reconfirmed on the same farms and houses, indicating the exceptional persistence of this serotype in the environment and its high ability to spread in broiler production.

One of the main objectives of this project was to determine the incidence as well as critical points for the introduction of *S. Infantis* into broiler flocks. In this part of the project, we included a broiler farm with eight houses maintained by three breeders/farmers. The 2021 sampling plan included various sites of broiler houses: broiler sheds and anterooms, surroundings of the facilities, including transport vehicles, clothing/footwear of farmers and slaughterhouse. The results showed that critical sites of contamination with *S. Infantis* in the broiler shed/rearing place are feeders, floors and ventilation systems. In the anterooms, floors were most often contaminated, and work surfaces and various objects used for cleaning were also positive. In the surrounding area of the houses, *S. Infantis* was most frequently detected in ground samples collected in front of and between the buildings. Another possibility of *S. Infantis* introduction into the farm was to a large extent by transport vehicles, both by personnel vehicles and trucks used to transport chickens to the slaughterhouse.

Before disinfecting the facilities, cleaning efficiency was checked as one of the most important measures for successful disinfection. Together with the farmers, we assessed the condition of the poultry houses after cleaning and identified shortcomings that may lead to residual impurities and, as a result, poor disinfectant effectiveness. Based on the identified critical points, we improved the disinfection process. The results of bacteriological tests obtained before the new flock's arrival showed that the facilities as well as the surroundings of the farm were sufficiently cleaned and disinfected. Of the 164 samples, only one sample taken from the floor of the anteroom of one barn was positive (1/164). After the removal of the broilers for slaughter, *S. Infantis* was confirmed in samples from the same poultry house that was positive before the pre-breeding phase, and in the anteroom of another house maintained by the same farmer. All samples from the other six houses were negative. Before the new flock's arrival at this contaminated house, all samples were negative (0/27). Based on the identified critical points, the same farm was retested in 2022 for the presence of *S. Infantis*. The results showed that the facilities were well cleaned and disinfected before the start of the productive cycle, as bacteriological analyses were negative for *S. Infantis* (0/64). After completion of the fattening cycle, *S. Infantis* was confirmed in four houses, including one in which the contamination with *S. Infantis* was not confirmed in 2021.

Whole-genome sequencing (WGS) of *S. Infantis* isolates ($n = 69$) from all farm samples revealed that all isolates belonged to sequence type 32 (ST32) and had pESI plasmid. Based on the core genome multilocus sequence typing (cgMLST), isolates were grouped into five clusters: individual clusters mainly grouped isolates from facilities of the same breeder, but in three clusters (1, 3 and 4), there were also individual isolates obtained from other breeders' facilities. In clusters 1, 2 and 5, there were only isolates obtained in 2021, whereas cluster 3 encompassed isolates from 2021 and 2022, and cluster 4 encompassed only isolates from 2022. The results indicate true persistence of the same *S. Infantis* clones in the houses maintained by the same breeder (or constant re-introduction of the same clone from the environment into the facility) and the occasional introduction of the *S. Infantis* clones between the houses of different breeders. New strains are also occasionally introduced into the farm. Screening of isolates on selective media did not identify any *S. Infantis* isolates with ESBL determinants.

Selected *S. Infantis* isolates with or without plasmid pESI, originating from poultry, poultry products and humans, were included in the screening of the biofilm formation ability and *in vitro* testing of the effectiveness of selected disinfectants (Ecocid S, ethanol and hydrogen peroxide). Within 168 hours of incubation time at 20 °C and 28 °C, the biofilm formation potential of *S. Infantis* strains with pESI plasmid was higher compared to that of isolates without pESI plasmid. The results of testing the effectiveness of disinfectants on *S. Infantis* isolates with high biofilm production capability showed that both 1 % Ecocide and 70 % ethanol, under laboratory conditions at a contact time of 15 minutes, effectively removed the 72- and 168-hour-old biofilm of *S. Infantis*, which is not the case with hydrogen

peroxide. In addition, we also tested the ability of the biocides Virocid, Sterizid P12 DES, Dioksilek, Interkokask and ionized/active water, which are frequently used in field conditions. Dioksilek and Interkokask proved to be the most successful in preventing adhesion after 24 hours incubation time.

In the context of investigating the possibility of preventing animal colonization with *S. Infantis* with specific IgY antibodies from egg yolk, we successfully immunized hens with a selected isolate of *S. Infantis* and isolated IgY from the egg yolk using non-toxic reagents. On average, we obtained 7.75 mg IgY/mL egg yolk. The specificity and efficiency of anti-*S. Infantis* IgY isolated from the egg yolk of immunized hens was first confirmed and quantified by ELISA. Subsequently, the opsonization of *S. Infantis* with IgY of immunized hens and the associated formation of bacterial agglutinations (clumps) were confirmed by confocal microscopy. The efficacy of the isolated antibodies in limiting the invasion of *S. Infantis* into host cells was tested on human intestinal epithelial cell line Caco-2. We optimized the conditions for performing the measurements and determined the most appropriate inoculum size, incubation time, concentration of sera and isolated IgY used, and type of medium. We found a concentration-dependent decrease in the penetration of bacteria into the cells. The measured values of adhesion to the cells did not provide consistent answers, which is probably due to experimental artifacts. In a cellular model, we confirmed the loss of transepithelial electrical resistance of the epithelium depending on the size of the inoculum and the duration of exposure to *S. Infantis*. We also tested the effect of IgY on the proliferation and migration of *S. Infantis* in culture. Quantitative PCR-based proliferation measurements and tracking of colony growth and migration on solid media did not confirm the likelihood of these two mechanisms in limiting the bacterial effect by IgY. The interaction of *S. Infantis* with the epithelial model was also demonstrated by confocal microscopy. We found concentrated bacteria on the apical cell membrane and individual bacteria in or under the epithelium. Bacterial abundance correlated with the time of co-culture of the bacteria with the cells and was estimated to be more pronounced in the absence of protective IgY.

Using WGS typing, *S. Infantis* isolates from broilers of various poultry food business operators as well as food and humans, all obtained between 2019 and 2022 ($n = 162$), were typed and compared with a national database of 357 genomic sequences of *S. Infantis* (obtained in 2007–2022). Most of the *S. Infantis* isolates ($n = 354$) belonged to ST32, the most widespread ST of *S. Infantis* in Slovenia and in Europe. pESI plasmid was detected in 340/357 (95.2 %) isolates, indicating that pESI-negative strains are decreasing nationally and globally. Additionally, four variants of truncated pESI were identified, further confirming the high genomic plasticity of pESI and enabling evolutionary adaptation of *S. Infantis* to different environmental conditions. Such isolates with truncated pESI did not harbour *sul1*, *tet(A)* and/or *aadA1* genes or harboured an incomplete *tet(A)* gene. Some isolates with truncated pESI possess additional genes conferring resistance to penicillins or trimethoprim; therefore, the truncated pESI does not necessarily mean resistance to fewer antimicrobial groups.

S. Infantis isolates from the national database exhibited 20 different resistotypes, none of which included ESBL or colistin resistance genes. A total of 30 different acquired ARGs and chromosomal mutations conferring resistance to six antimicrobial groups (aminoglycosides, fluoroquinolones, penicillins, tetracyclines, folic acid antagonists and phenicols) and nitrofurantoin were observed. 337/357 (94.4 %) *S. Infantis* isolates were multidrug resistant (resistant to three or more antimicrobial groups). Most of the pESI-positive *S. Infantis* isolates (333/357; 93.3 %) also harboured genes conferring resistance to quaternary ammonium compounds (*qacEAI*) and mercury (*mer*). Comparison of *S. Infantis* isolates from all three sources suggests that Slovenian broilers and meat were a source of infection for humans in some cases since the same clones of *S. Infantis* were found in humans, animals and foodstuffs. However, the source of infection for most human cases remains unknown.

OPIS PROBLEMA IN CILJEV PROJEKTA

Salmoneloza je druga najpogostejša črevesna okužba, ki se prenaša z živili živalskega izvora. Najpogostejši vir okužbe so jajčni izdelki in kontaminirano perutninsko meso. *S. Infantis* je v Evropi in tudi v Sloveniji najpogostejše izoliran serotip salmonel pri pitovnih piščancih in predstavlja več kot polovico izolatov vseh salmonel iz jat in mesa pitovnih piščancev. V zadnjih letih se je na mednarodni ravni razširil sev s plazmidom pESI, ki je izrinil ostale seve *S. Infantis* brez omenjenega plazmida. Plazmid omogoča boljšo prilagoditev serotipa *Infantis* na preživetje v skrajnih razmerah v okolju in gostitelju. Dokazana je tudi možnost konjugativnega prenosa plazmida pESI v druge vrste, kar predstavlja nevarnost za širjenje genov za odpornost, zlasti ob prisotnosti selekcijskega pritiska. Tudi slovenski izolati *S. Infantis* iz perutninskih farm imajo plazmid pESI, vendar še brez ESBL-determinant, ki so jih že dokazali pri izolatih v nekaterih evropskih državah in ZDA.

Kljub poostrenemu čiščenju in razkuževanju okuženih objektov ostanki nečistoč predstavljajo dodatno tveganje za mikrobo kontaminacijo in okužbo živali po vselitvi nove jate. *S. Infantis* je pogosto ponovno potrjena na istih gospodarstvih in v istih objektih, kar kaže na izjemno obstojnost tega serotipa v okolju. To nakazuje, da ima ta serotip veliko sposobnost širjenja v rejah pitovnih piščancev in sposobnost perzistiranja v farmskem okolju. K obstoju salmonel v okolju prispeva sposobnost filmotvornosti, kar bakteriji omogoča preživetje po postopkih čiščenja in razkuževanja. Zaradi omenjenih oteževalnih dejavnikov je treba dopolniti postopke sanitacije, ki bi bili učinkoviti v terenskih razmerah. Standardiziranih postopkov za preverjanje učinkovitosti biocidov na filmotvorne oblike mikroorganizmov zaenkrat ni. Prav tako na tržišču ni cepiva proti *S. Infantis*, ki bi se lahko uporabljal v preventivi pitovnih piščancev. Produkcija in uporaba protiteles, pridobljenih iz kokošjih jajc, ki ni povezana z rekombinantno tehnologijo oz. genetskim inženiringom, predstavlja alternativo konvencionalnim možnostim preventive. Raziskave so pokazale učinkovito delovanje imunoglobulinov IgY, pridobljenih iz rumenjaka kokošjih jajc, na bakterijske okužbe pri živalih in ljudeh.

V okviru tega projekta smo si zastavili sledeče cilje:

- ugotoviti poti širjenja bakterije *S. Infantis* znotraj istih rej in med različnimi rejami ter določiti kritične točke za vnos *S. Infantis* na farmo;
- izolate *S. Infantis* primerjati z že tipiziranimi izolati iz zbirke slovenskega NRL za salmonele in tipizirati izolate iz perutninskega mesa in ljudi z metodo WGS in jih primerjati z izolati iz jat pitovnih piščancev z namenom ocene tveganja za prenos *S. Infantis* preko mesa na ljudi;
- določiti biocide, ki delujejo na biofilme genetsko različnih izolatov *S. Infantis* ter na osnovi rezultatov, pridobljenih s testiranjem *in vitro*, v praksi preizkusiti postopke in sredstva za učinkovito obvladovanje okužb s *S. Infantis* v perutninskih hlevih;
- preizkusiti peroralno uporabo inkapsuliranih protiteles IgY pri piščancih z namenom zmanjšanja dovzetnosti piščancev na okužbo s *S. Infantis*, pri čemer so protitelesa IgY pridobljena iz jajčnega rumenjaka kokoši, predhodno imuniziranih proti *S. Infantis*; razviti *in vitro* metode za ugotavljanje učinkovitosti in specifičnosti protiteles IgY na tkivnih kulturah črevesa piščancev;
- v primeru pojava *S. Infantis* z ESBL-determinantami predlagati dodatne biovarnostne ukrepe za preprečevanje širjenja sevov;
- na osnovi pridobljenih rezultatov izdelati smernice za čim učinkovitejše obvladovanje kontaminacije hlevov pred, med in po vselitvi brojlerskih jat;
- organizirati izobraževanja za rejce in veterinarje o načinih obvladovanja kontaminacije hlevov s *S. Infantis*.

POVZETEK KLJUČNIH UGOTOVITEV IZ LITERATURE

Salmoneloza je poleg kampilobakterioze najpogostejša črevesna okužba, ki se prenaša z živili živalskega izvora, zlasti z nezadostno toplotno obdelanimi jajčnimi izdelki in perutninskim mesom. Po zadnjih uradnih podatkih je v letu 2021 v državah EU obolelo 60,050 oseb, kar je 14,3 % več kot v letu 2020. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotip Infantis (S. Infantis) je četrti najpogostejše izolirani serotip salmonel pri ljudeh v Evropski uniji, ob tem je najpogostejši izolirani serotip v jatah brojlerjev. S. Infantis je tudi prevladujoč serotip v piščančjem mesu in mesnih pripravkih v EU (EFSA, 2022).

S. Infantis se pogosto večkrat pojavlja v istih rejah, kljub ukrepom, ki jih izvajajo nosilci dejavnosti v primeru ugotovitve salmonel v jati, saj se nove jate ponovno kolonizirajo s salmonelami iz okolja (Pate in sod. 2019; Sever in Akan, 2019; Newton in sod., 2020). Salmonеле se lahko prenašajo tudi preko insektov, glodavcev in drugih domačih in prostoživečih živali. Najpogostejše so pozitivni insekti, sledijo jim glodavci in nato prostoživeče ptice (Wales in sod., 2010; Umali in sod., 2012). Ukrepi vključujejo zlasti usmerjeno temeljito čiščenje in razkuževanje hleva ter daljši interval pred ponovno naselitvijo živali (Marin in sod., 2009). K obstoju salmonel v okolju prispeva tudi sposobnost tvorbe biofilma (Latasa in sod., 2005; Vestby in sod., 2009). Dokazano je, da so biofilmi S. Infantis manj občutljivi na razkužila (Drauch in sod., 2020) in antibiotike (Tezel in sod., 2016) kot planktonske celice. Biocidi imajo bistveno vlogo pri omejevanju širjenja okužb, vendar je učinkovito dezinfekcijo mogoče doseči le, če se uporabi ustrezno razkužilo v pravilni koncentraciji (Corcoran in sod., 2014; Drauch in sod., 2020).

Leta 2014 so v Izraelu odkrili porajajočo klonalno linijo S. Infantis s konjugativnim megaplazmidom pESI (angl. *plasmid of emerging S. Infantis*), ki vpliva na povečano sposobnost preživetja salmonel v okolju. Poleg tega plazmid pESI kodira tudi determinante, ki povečajo sposobnost preživetja v gostitelju (Aviv in sod., 2014). Zdi se, da so sevi s plazmidom pESI z evolucijskega vidika bolj uspešni (imajo večji fitness) kot sevi brez omenjenega plazmida, in so v zadnjih letih pri perutnini uspeli izriniti seve brez plazmida pESI (Alba in sod., 2020). Kasneje so seve s plazmidom pESI opisali tudi v Italiji, na Madžarskem, v Švici, v ZDA in Sloveniji (Franco in sod., 2015; Szmolka in sod., 2017; Tate in sod., 2017; Papič in sod., 2022). Pri izolatih S. Infantis je pogosto ugotovljena večkratna odpornost proti protimikrobnim zdravilom (MDR), kar ob dejstvu, da se taki sevi lahko širijo vzdolž prehranske verige, predstavlja nevarnost za zdravje ljudi. Isti MDR klon S. Infantis so ugotovili v objektih za vzrejo pitovnih piščancev, klavnicah, mesu v prodaji in pri ljudeh (Nogrady in sod., 2008). Po podatkih EFSA je takšnih izolatov salmonel v Sloveniji več kot 90 %, ob tem, da gre v večini primerov za serovar S. Infantis (EFSA, 2021). Že sama prisotnost plazmida pESI v gostitelju S. Infantis povzroči večkratno odpornost bakterije proti vsaj trem skupinam antibiotikov (sulfonamidi, tetraciklini, aminoglikozidi in/ali trimetoprim), zato ga lahko označimo kot MDR-plazmid. V plazmidu pESI so ugotovili tudi ESBL-determinante (Franco in sod., 2015; Tate in sod., 2017; Carfora in sod., 2018), ki se lahko že z enkratnim genetskim dogodkom (homologna rekombinacija) vstavijo v plazmid in se nadalje širijo s konjugacijo.

Produkcija in uporaba protiteles pridobljenih iz kokošjih jajc v zadnjih letih močno pridobiva na pomenu. Razviti so že številni postopki za preprečevanje oziroma zdravljenje različnih bakterijskih in virusnih bolezni prebavil domačih živali. Pri živalih je specifične IgY pridobljene iz rumenjaka kokošjih jajc mogoče uporabiti proti nekaterim sevom *E. coli*, rotavirusu, salmonelam in kampilobaktrom. Glavna stopnja v izolaciji IgY je odstranitev v vodi netopnih sestavin jajčnega rumenjaka, ki jih predstavljajo lipidi in lipoproteini (Schade in sod., 2005; Grzywa in sod., 2023).

MATERIAL IN METODE

Farma pitovnih piščancev

V raziskavo smo vključili farmo pitovnih piščancev, kjer smo v preteklosti že potrdili prisotnost *S. Infantis*. Farma ima osem hlevov, ki so v lasti treh rejcev; rejca A in B imata vsak po tri objekte (rejec A: 1, 2 in 3; rejec B: 4, 5 in 6), rejec C pa dva objekta (7 in 8) (slika 1). Hlevi imajo kapaciteto vselitve po 20,500 pitovnih piščancev. Vse jate piščancev so izvirale iz iste valilnice, dobavitelj krme je bil isti, piščanci so bili po končanem pitanju zaklani v isti klavnici.

Piščanci se vzrejajo v talnem sistemu v eni etaži na globokem nastilu, objekti so opremljeni z avtomatskimi ventilacijskimi sistemi, avtomatskimi sistemi za krmljenje in napajanje. Vsak objekt ima dva silosa. Farma je ograjena z žično ograjo, pred vhodom v farmo je dezobarijera, prav tako so dezobariere pred posameznimi hlevi in pred vstopom iz predprostora v vzrejni prostor. Običajen postopek po zaključeni reji in pred vselitvijo piščancev na farmi zajema mehanično čiščenje, pranje in razkuževanje. Odmor med vselitvami je bil 2 do 3 tedne.



Slika 1. Farma pitovnih piščancev: hlevi so označeni z barvo in številko: rejec A rumena oznaka (hlev 1, 2 in 3), rejec B modra oznaka (hlev 4, 5 in 6), rejec C zelena oznaka (7 in 8).

Vzorčenje

Vzorčenja na prisotnost *S. Infantis* smo izvedli v obdobju med februarjem 2021 in junijem 2022. Ker se farma ne polni naenkrat, smo vzorčenja opravili glede na dan vselitve v posamezne hleve. Na farmi smo izvedli sedem vzorčenj, shema vzorčenj pa se je nekoliko razlikovala glede na namen.

Prvo vzorčenje (I): v vseh osmih objektih smo vzorčili po končanem pitanju, na dan izlova piščancev. Vzorca smo vzrejni prostor, predprostor hleva in okolico posameznih objektov. V vzrejnem prostoru posameznega hleva smo vzorčili steljo z iztrebki, istočasno smo odvzeli brise površine ventilatorjev, zračnih loput, luči, krmilnikov, vsipnikov za krmo, napajalnega sistema – posodice pod kapljičnimi napajalniki, cevi za dovod vode in dva vzorca vode. V predprostorih hlevov smo vzorčili površino tal in z gobico odvzeli brise opreme (vodna pipa, lijak, police, skrinja za shranjevanje kadavrov, metla in samokolnica). V okolici posameznih hlevov smo vzorčili tla pred hlevi, travo, silose, iztrebke drugih živali, vozila na farmi (kamioni za prevoz piščancev na klavnico, vozila za prevoz delavcev, ki so

pomagali pri izlovi). S privolitvijo vseh treh rejcev smo vzorčili njihova vozila (kolesa vozil in notranjost), brise obutve, delovne obleke, brise las in rok. **Drugo vzorčenje (II)** smo izvedli po čiščenju in pranju hlevov, vendar pred razkuževanjem prostorov. Vzorčili smo vzrejne prostore – tla (dva para vpojnih prevlek), površine zračnih loput, posodic pod kapljičnimi napajalniki in površino pip. **Tretje vzorčenje (III)** smo izvedli pred vselitvijo novih jat v posameznih hlevih in pri tem uporabili enak protokol kot pri prvem vzorčenju.

Četrto vzorčenje (IV) smo izvedli takoj po odlovu piščancev v zakol; protokol vzorčenja smo prilagodili rezultatom tretjega vzorčenja: v sedmih objektih (1, 2, 4, 5, 6, 7 in 8), kjer *S. Infantis* ob vselitvi nismo potrdili, smo v vzrejnih prostorih odvzeli vzorce stelje. Vzorčili smo površine zračnih loput, ventilatorjev, skodelic pod kapljičnimi napajalniki in vodovodnih cevi. V vsakem predprostoru hleva smo vzorčili tla. V hlevu, kjer je bila pred vselitvijo piščancev potrjena *S. Infantis* (hlev 3), smo za vzorčenje uporabili enak protokol kot pri prvem vzorčenju. Na enak način smo v hlevu 3 vzorčili tudi pred ponovno vhlevitvijo – po čiščenju in razkuževanju (**peto vzorčenje, V**).

Po enem letu (maj–julij 2022) smo vzorčenje ponovili v vseh osmih objektih. Vzorce smo odvzeli pred vhlevitvijo (**šesto vzorčenje, VI**) in po odlovu piščancev za zakol (**sedmo vzorčenje, VII**). Protokol obeh vzorčenj je bil podoben kot pri četrtem vzorčenju.

Ob vsakem zakolu (3×) smo na **klavni liniji** vzorčili vratne kožice trupov. Iz vsake jate smo odvzeli po pet vzorcev vratnih kožic.

Vse vzorce tal smo vzorčili s sterilnimi vpojnimi prevlekami, ki se uporabljajo za rutinsko vzorčenje na salmonele, vzorce površin opreme, silosov in predmetov pa s sterilnimi vpojnimi gobicami.

Bakteriološke preiskave, sekvenciranje celotnih genomov (WGS) in bioinformacijska analiza podatkov

Izolacija salmonel

Salmonele smo izolirali s standardno metodo ISO 6579-1:2017 (Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti *Salmonella* spp.). Serotip *S. Infantis* smo identificirali s klasično serotipizacijo po Kauffmann-White-Le Minorjevi shemi (WHO). Izolate *S. Infantis* smo shranili pri –80 °C in vzdrževali na krvnem agarju.

Ugotavljanje determinant ESBL

Presejalno smo testirali vse izolate *S. Infantis*, pridobljene med rednim delom, na ESBL z nasajanjem na trdni selektivni agar MacConkey agar (Biolife) z dodatkom 1 µg/L cefotaksima (Sigma) za izolacijo ESBL enterobakterij, ki ga priporoča EURL-AR.

Izbor izolatov, tipizacija WGS in bioinformacijska analiza podatkov

Skupno smo sekvencirali in analizirali genomska zaporedja 231 izolatov *S. Infantis*. Sekvencirali smo vse izolate *S. Infantis* ($n = 69$), ki smo jih pridobili v okviru vseh vzorčenj na farmi ter 89 izolatov *S. Infantis* iz pitovnih piščancev, 63 izolatov *S. Infantis* iz živil in 10 humanih izolatov *S. Infantis*, ki so bili pridobljeni v letih 2019–2022.

DNA iz izolatov *S. Infantis* smo izolirali s komercialnim kompletom DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Koncentracijo DNA smo izmerili s fluorometrom Qubit 3.0 (Thermo Scientific). Pripravo knjižnic DNA in sekvenciranje so izvedli v enem od komercialnih centrov za sekvenciranje s tehnologijo Illumina. Odčitke smo sestavili v soseske s programom SPAdes. Nadzor kakovosti odčitkov smo izvedli s programom FastQC, nadzor kakovosti sestavljenih genomov pa s programom Quast. Izolate *S. Infantis* smo tipizirali s pristopom cgMLST (orodje chewBBACA). Determinante odpornosti smo ugotavljali z orodjem ResFinder. MLST-tip smo določili z orodjem PubMLST. *In silico* serotipizacijo smo izvedli s programoma SISTR in SeqSeroV2. Prisotnost plazmida pESI smo ugotavljali z algoritmom BLAST in poravnavo odčitkov na referenco v programu Geneious.

Opredelitev protibakterijske aktivnosti biocidov na biofilme bakterije *S. Infantis*

Priprava delovnih kultur bakterije *S. Infantis*

Pred posameznim poskusom so bili sevi bakterije *S. Infantis* podkultivirani na TSA agarju aerobno pri 37 °C. Za pripravo inokuluma smo 5 mL gojišča TSB inokulirali z eno bakterijsko kolonijo in čez noč inkubirali pri 37 °C na stresalniku (60 obr/min). Za pripravo delovne kulture je bila prekonočna kultura redčena do končne koncentracije, približno 1×10^7 CFU/mL.

Določanje tvorbe biofilma na polistirenu s kristal vijoličnim (KV)

Za oceno tvorbe biofilma pri različnih pogojih rasti smo uporabili metodo barvanja s kristal vijoličnim (KV). Osem vdolbin na polistirenski mikrotitrski ploščici z 96-vdolbinami smo inokulirali z 200 µl pripravljene bakterijske suspenzije. Sledila je inkubacija pri različnih temperaturah (8 °C, 20 °C in 28 °C) ter časih inkubacije (72 h in 168 h). Po inkubaciji smo suspenzijo odstranili, vdolbine pa dvakrat sprali s sterilno puferirano fosfatno raztopino. Ploščice smo nato sušili pri 60 °C 10 minut in po dodatku 200 µL 1 % raztopine KV ploščice inkubirali 15 minut. Po odstranitvi barvila smo vdolbine sprali pod tekočo vodo in nato ploščice ponovno sušili pri 60 °C 10 minut. Vezano barvilo KV smo sprostili z dodatkom 200 µL 96 % etanola. Optično gostoto raztopine barvila smo merili pri 595 nm z uporabo mikrotitrskega čitalca ploščic. Nastali biofilm smo prikazali kot razliko vrednosti vezanega barvila in povprečne vrednosti negativnih kontrol (ΔOD_{595}).

Za primerjavo sposobnosti tvorbe biofilma pri 20 °C in 28 °C po 72 h in 168 h so bili izolati *S. Infantis* razvrščeni kot sledi: (a) $OD \leq OD_c =$ ni biofilma; (b) $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c =$ šibek biofilm; (c) $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c =$ zmeren biofilm; in (d) $4 \times OD_c < OD =$ močan biofilm. Mejna vrednost optične gostote (OD_c) je bila tri standardne deviacije nad povprečjem OD negativnih kontrol.

Določanje števila adheriranih bakterij S. Infantis na različnih površinah

Sposobnost adhezije izolata *S. Infantis* 323/19 smo določali na treh površinah, ki se pogosto uporabljajo v reji in klavnici (plastika, jeklo AISI 304 in AISI 316). Zaradi lastnosti materialov smo poskus izvedli tako, da smo na površino posamezne ploščice s površino 1 cm² nanесли 20 µL suspenzije bakterij ter inkubirali 24 in 48 ur pri temperaturi 20 °C. Po inkubaciji smo neadherirane celice sprali, pritrjene celice pa ločili od površine z uporabo ultrasonične kopeli in z nacepljanjem redčitvene vrste določali število kolonijских enot (CFU/cm²).

Določanje protimikrobne učinkovitosti izbranih biocidov

Za določitev protimikrobne učinkovitosti biocidov *in vitro* smo uporabili metodo mikrodilucije v hranilnem mediju. Testirali smo Ecocid S (mešanica kalijevega peroksisulfata, površinsko aktivne snovi, organskih kislin in anorganskega pufra), etanol in vodikov peroksid. Testiranje smo opravili na petih humanih in petih živalskih izolatih *S. Infantis*.

Kasneje smo na sevu z najboljšo sposobnostjo tvorbe biofilma (*S. Infantis* 323/19) testirali še: Virocid (kvarterne amonijeve spojine, glutaraldehid, izopropanol), Sterizid P12 DES (glutaraldehid, kvarterne amonijeve spojine), Dioksilek (raztopina klorovega dioksida), Interkokask (klorokrezol) in aktivno/ionizirano vodo.

Za testiranje z mikrodilucijsko metodo smo uporabili mikrotitrskie ploščice z 96-vdolbinami in ravnim dnom. Najprej smo v vse stolpce, z izjemo prvega dodali 100 µL medija TSB. V prvi stolpec smo dodali 200 µL preizkuševalnega sredstva in po ploščici naredili dvakratno serijsko razredčitev. Vsako vdolbino smo nato inokulirali z 20 µL delovne bakterijske kulture. Plošče so bile inkubirane aerobno pri 37 °C 24 ur. Po inkubaciji smo živost bakterij določili s pomočjo uporabe reagenta PrestoBlue™ Cell Viability skladno s protokolom proizvajalca. Po 90 minutah inkubacije z reagentom smo fluorescentni signal izmerili s čitalcem mikrotitrskih ploščic. MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) je bila določena kot najnižja koncentracija biocida, pri kateri ni bilo zaznane metabolne aktivnosti *S. Infantis*. Vse meritve MIC so bile izvedene v treh tehničnih in dveh bioloških ponovitvah. Kontrolne vdolbine so bile pripravljene z gojiščem, le z bakterijsko suspenzijo ali pa z razredčitvami dezinfekcijskega sredstva.

Določanje antiadhezivnega učinka biocidov

Za določanje antiadhezivnega učinka biocidov smo slednje uporabili v subinhibitorni koncentraciji (1/8 MIC). Najprej smo pripravili razredčine biocidov skupaj z bakterijsko kulturo seva *S. Infantis* 323/19. Osem vdolbin polistirenske mikrotitrskie plošče z 96-vdolbinami (TPP Techno Plastic Products AG,

Trasadingen, Švica) smo inokulirali z 200 µL pripravljene raztopine in inkubirali 24, 72 in 168 ur pri 20 °C v aerobnih pogojih. Pozitivna kontrola je bila enako redčena bakterijska kultura, negativne kontrole pa so vsebovale razredčitve biocidov brez kulture bakterij. Po inkubaciji je bil postopek enak kot pri opisu določanja tvorbe biofilma s KV.

Tretiranje biofilma *S. Infantis* z biocidi

Z biocidi smo tretirali biofilm *S. Infantis* 323/19, po 72 in 168 urni inkubaciji pri 20 °C. Uporabili smo koncentracije biocidov kot se uporabljajo za dezinfekcijo površine: 1 % Ecocid S, 70 % etanol in 1 % vodikov peroksid. Po nastanku biofilma smo bakterijsko suspenzijo odstranili in vdolbine trikrat sprali s sterilnim PBS. Nato smo dodali biocide v pripravljenih koncentracijah. Kontaktna časa sta bila 15 minut in 30 minut. Pri pogojih kontaktnega časa 15 min in pa MIK vrednosti smo testirali tudi Virocid, Sterizid P12 DES, Dioksilek, Interkokask in aktivno/ionizirano vodo. Po inkubaciji z biocidi smo vsako vdolbino ponovno trikrat sprali, dodali 200 µL PBS in pritjene bakterije odstranili s pomočjo ultrazvočne kopeli (sobna temperatura, 10 minut, frekvenca 37 kHz, moč 80 W). Število živih bakterijskih celic smo določili z nacepljanjem razredčin na površino trdnega gojišča TSA.

Presoja ustreznosti postopkov sanitacije na farmi in priporočila

Za presojo ustreznosti sanitacije hlevov/farme smo najprej od rejcev pridobili podatke o standardnih postopkih čiščenja in razkuževanja. Prvo oceno izvajanja sanitacijskih postopkov smo opravili po postopku čiščenja in pred razkuževanjem (pred drugim vzorčenjem) in jo predstavili rejcem in lastnikom živali na skupnem sestanku. Na osnovi rezultatov pridobljenih tekom študije smo pripravili priporočila za doseganje učinkovite sanitacije perutninskih hlevov.

Pridobivanje imunoglobulinov IgY proti *S. Infantis* iz rumenjakov kokošjih jajc in ugotavljanje njihove učinkovitosti in specifičnosti na modelu črevesne sluznice

Priprava cepiva in cepljenje eksperimentalnih živali

Za imunizacijo smo uporabili kokoši nesnice lahkega pasemskega tipa stare 18 tednov brez protiteles proti salmoneli. Kokoši smo razdelili v dve poskusni skupini s štirimi kokošmi v posamezni skupini. Nameščene so bile v ločenih boksih v talni reji z dvignjenimi gnezdi. Na voljo so imele krmo, ki je bila ustrezna kategoriji živali, in vodo, oboje *ad libitum*. Pogoji okolja so ustrezali kategoriji živali. Zdravstveno stanje kokoši, nesnost in pogoje v okolju smo dnevno nadzorovali. Za imunizacijo smo uporabili celotni inaktiviran antigen *S. Infantis*. Poskusno skupino smo prvi dan poskusa imunizirali z antigenom z dodanim popolnim Freundovim adjuvansom. Antigen smo aplicirali v podkožje (s/c aplikacija z 21G x 3/8" sterilno iglo) na šestih mestih na vratu. Volumen posamezne aplikacije je bil 100 µl. Po štirinajstih dnevih smo imunizacijo ponovili. Antigenu smo tokrat dodali nepopolni Freundov adjuvans. Antigen smo aplicirali v podkožje (s/c aplikacija) na vratu. Izvedli smo šest aplikacij, po tri na vsaki strani vratu. Volumen posamezne aplikacije je bil 100 µl.

Za ugotavljanje protiteles v serumih smo živalim odvzeli 2 ml krvi iz krilne vene (*vena ulnaris*) (2 ml brizge in 21G x 1/2" sterilne igle) pred vsako imunizacijo in določili titre protiteles. Kri smo odvzeli tudi štiri tedne po primarni imunizaciji. Postopki so bili izvedeni skladno z dovoljenjem U34401-29/2019/14.

Za ugotavljanje protiteles v jajčnih rumenjaki smo jajca ves čas poskusa zbirali, označevali in hranili v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8 °C.

Izolacija IgY iz jajčnega rumenjaka

IgY proti *S. Infantis* smo iz jajčnega rumenjaka izolirali z netoksičnimi reagenti, kar omogoča uporabo IgY v prehranske in medicinske namene. Ključne faze izolacije IgY so bile odstranitev netopnih lipidov in lipoproteinov z delipidacijsko raztopino, ki vsebuje pektin in več ciklov obarjanja IgY z amonijevim sulfatom. Na koncu smo izolirana protitelesa dializirali in jih shranili v alikvotih pri -20 °C. Izoliranim protitelesom smo določili proteinsko koncentracijo. Z metodo SDS-PAGE smo določili molske mase

reduciranih in nereduciranih vzorcev ter primerjali molske mase s standardom komercialnih piščančjih IgY. Z metodo imunoblota smo potrdili ujemanje izoliranih IgY s standardom IgY, pri čemer smo uporabili konjugat IgG proti kokošjim IgY konjugiranim s HRP ter substrat AEC.

Kvalitativno ovrednotenje specifičnosti IgY proti S. Infantis

IgY smo izolirali iz rumenjakov kokoši pred oziroma po cepljenju proti izbranemu agensu. Specifično reaktivnost IgY proti *S. Infantis* smo preverili s testom ELISA, kjer smo preverili reaktivnost proti imobiliziranim bakterijskim antigenom.

Dodatno smo izvedli funkcijske aglutinacijske teste. Kulturo *S. Infantis* smo inkubirali v prisotnosti različnih IgY in opazovali pod mikroskopom nastanek skupkov bakterij. Oponizacijo bakterij smo dodatno potrdili s fluorescentno označenimi sekundarnimi protitelesi, z reaktivnostjo proti IgY.

Priprava delovnih kultur bakterije S. Infantis

S. Infantis, ki smo jo uporabljali v večini eksperimentalnih postopkov, smo gojili na standardiziran način v tekočem gojišču. Tekoče gojišče se je izkazalo za primernejše od čvrstega zaradi aktivnejšega plavanja bakterij in večje podobnosti črevesnemu okolju. Aktivnost in številčnost bakterij smo ocenili z opazovanjem pod mikroskopom v temnem polju, ki je omogočilo hitro rutinsko spremljanje stanja kulture tudi med eksperimentalnim delom.

Preverjanje modela črevesne sluznice kot pokazatelja odziva na okužbo s S. Infantis

Celice Caco-2 (izolat kolorektalnega karcinoma) smo nasadili na polistirenske porozne membrane velikosti por 0,4 mikrona. Celice smo gojili 21 dni s tremi menjavami gojišča tedensko. Po tem času smo preverili dosego pričakovane izhodiščne prekoepitelijske upornosti. Ta je znašala med 2 in 3 kOhm. Celice smo izpostavili različnim inokulumom *S. Infantis* v razponu od 10^2 do 10^8 bakterij na mL ter spremljali upornosti z meritvami upornosti vsakih 60 minut.

Na modelu smo nato preverjali učinek specifičnih in nespecifičnih imunoglobulinov tipa Y, izoliranih iz jajčnih rumenjakov pred oziroma po izbranem cepljenju. Imunoglobuline Y smo uporabili kot dejavnike za modulacijo invazivnosti *S. Infantis*.

Kvantifikacija invazivnosti S. Infantis na modelu črevesne sluznice

Celice Caco-2 smo sadili na mikrotiterske plošče in jih inkubirali 2 dni za zagotovitev stabilne kulture. Celice smo izpostavili *S. Infantis* pri optimirani velikosti inokuluma po predhodni 30 minutni inkubaciji z IgY oziroma serumov (ne) cepljenih živali v brezserumskem gojišču. Po 60 minutni inkubaciji bakterij z epitelijskim modelom smo sprali bakterije s celic in celice raztopili z 0,1 % detergentom triton X-100. Tako izolirane bakterije smo nato nasadili kot razmaz na petrijevkah s čvrstim gojiščem po različnih predhodnih razredčitvenih stopnjah. Uspešnost adhezije smo ocenili na osnovi števila izraščenih kolonij *S. Infantis* po 24 urah. Alternativno smo z dodatkom gentamicina odstranili površinske bakterije na celicah. Detergentski izolat *S. Infantis* smo v tem primeru uporabili kot merilo znotrajceličnih bakterij, t.j. bakterijske invazije v epitelijski model.

Kvalitativno ovrednotenje invazivnosti S. Infantis na modelu črevesne sluznice

Celice Caco-2 smo sadili na mikroskopske preparate in jih po 2 dneh izpostavili *S. Infantis* v prisotnosti (ne)specifičnih imunoglobulinov Y oziroma serumov kokoši. Inkubirali smo jih od 30 do 90 minut. Po spiranju smo epitelne celice fiksirali s paraformaldehidom in fluorescentno označili nukleinske kisline bakterij in celic z barvilom Hoechst 33342, celične membrane s fluorescentnim lektinom WGA-alexa488 in *S. Infantis* opsonizirano z IgY s sekundarnimi protitelesi proti IgY. Napravili smo konfokalne posnetke epitelijskih kultur in iz njih tridimenzionalne projekcije interakcije bakterije z epitelijskim modelom v prisotnosti različnih imunoglobulinov Y in po različnih časih inkubacije.

REZULTATI

Širjenja bakterije *S. Infantis* znotraj istih rej in med različnimi rejami ter določitev kritičnih točk za vnos *S. Infantis* v perutninske hleve

V okviru študije smo odvzeli 698 vzorcev, z bakteriološkimi preiskavami je bilo preiskanih 649 vzorcev, ker smo vzorce vpojnih prevlek, ki smo jih odvzeli v vzrejnih prostorih posameznih hlevov, združili v en skupni vzorec.

V vzorcih, ki smo jih odvzeli ob prvem vzorčenju (**I**) v vzrejnih prostorih vseh osmih hlevov, je bila *S. Infantis* potrjena v štirih hlevih, ki sta jih oskrbovala dva rejca (2, 3, 4 in 6). Pozitivni so bili vzorci tal, napajalniki, površine luči, ventilatorji, zračne lopute, vsipnik za krmo in površina cevi. Od 75 odvzetih je bilo pozitivno na *S. Infantis* 11 vzorcev (14,7 %). V predprostorih hlevov smo salmonelo potrdili v šestih hlevih, ki so jih oskrbovali trije rejci (1, 2 in 3 – rejec A, 4 in 5 – rejec B in 7 – rejec C). *S. Infantis* je bila najpogostejše potrjena v vzorcih tal, pozitivni pa so bili tudi brisi površin opreme v predprostorih. Izmed vzorcev, ki so bili odvzeti v okolici hlevov, iz prevoznih sredstev in pri rejcih je bila *S. Infantis* potrjena v vzorcih tal pred objekti (2, 3), trave med objekti, čevljev rejcev (A, B) in notranjosti njihovih vozil, gum ter notranjosti kamionov za izlov in v vzorcu mačke. Na klavnici je bila *S. Infantis* potrjena v vzorcih trupov piščancev iz hlevov 3 (rejec A) ter 5 in 6 (rejec B).

Rezultati so pokazali, da so kritična mesta kontaminacije s *S. Infantis* v vzrejnem prostoru hlevov napajalniki (50 %), sledijo tla (25 %) in ventilacijski sistemi (25 %). V predprostorih objektov so bila najpogostejše kontaminirana tla (75 %), pozitivne so bile tudi delovne površine in predmeti, ki se uporabljajo za čiščenje. Izmed vzorcev, ki so bili odvzeti v okolici hlevov, je bila *S. Infantis* najpogostejše potrjena v vzorcih tal pred in med objekti (80 %), veliko možnost vnosa na farmo predstavljajo različna prevozna sredstva, tako vozila rejcev kot tudi vozila za prevoz piščancev na klavnico.

Da bi preverili uspešnost čiščenja (pred razkužbo), smo v vseh vzrejnih prostorih odvzeli vzorce tal, zračnih loput in napajalnikov (**II**). *S. Infantis* smo potrdili le v hlevu 4 (rejec B). Pred vselitvijo novih jat (**III**) so bili vsi vzorci vzrejnih prostorov in okolijskih vzorcev negativni, le na odlagalnih površinah v predprostoru hleva 3 (rejec A) je bila potrjena *S. Infantis*. Po končanem proizvodnem ciklusu (**IV**) smo intenzivneje vzorčili hlev 3. *S. Infantis* smo potrdili v vzrejnem prostoru iz brisov talnih površin in iz vzorcev vode odvzete iz kapljičnih napajalnikov, prav tako je bil pozitiven tudi bris notranjosti kamiona za prevoz piščancev v klavnico in vratne kožice odvzete po zakolu. V vzorcih odvzetih iz drugih sedmih hlevov smo *S. Infantis* potrdili v brisu tal predprostora hleva 1, ki ga oskrbuje isti rejec kot hlev 3 (rejec A). Pred začetkom novega proizvodnega cikla smo ponovno intenzivneje vzorčili hlev 3 (**V**); rezultati teh preiskav so bili negativni.

Rezultati usmerjenih bakterioloških preiskav v letu 2021 so prikazani v tabeli 1.

Tabela 1: Rezultati usmerjene bakteriološke preiskave na *S. Infantis* na farmi v letu 2021

		VZORČENJE				
		I (po izlovu, 8. – 16. februar)	II (pred razkužbo, 3. – 15. marec)	III (pred vselitvijo, 24. marec – 7. april)	IV (po izlovu, 4. – 19. maj)	V (pred vselitvijo, hlev A3, 7. junij)
Prostori/mesta vzorčenja						
Vzrejni prostor hleva	tla [∞]	2/8	1/8	0/8	1/8	0/1
	luč*	1/8		0/8	0/1 ¹	0/1
	ventilatorji*	2/8		0/1	0/1 ¹	
	zračne lopute*	2/8	0/8	0/8	0/1 ¹	0/1
	vsipniki za krmo*	1/8		0/8	0/1 ¹	0/1
	površina cevi*	1/8		0/8	0/1 ¹	0/1
	krmilniki*	0/8		0/7	0/1 ¹	0/1
	napajalniki *	4/8	0/16	0/16	0/8	0/2
	voda iz napajalnikov ◇	0/8		0/8	1/1 ¹	0/1
	drugo	0/3			0/2	
Skupaj		11/75	1/32	0/60	2/25	0/9
Pred - prostor hleva	tla [∞]	6/8		0/8	2/8	0/1
	dezobarijera*	1/8		0/8	0/1 ¹	0/1
	skrinja za kadavre*	1/3		0/3	0/1 ¹	0/1
	odlagalne površine*	1/8		1/8	0/1 ¹	0/1
	pipa za vodo/lijak*	0/8		0/8	0/1 ¹	0/1
	metla*	2/8		0/8	0/1 ¹	0/1
	samokolnica*	0/3		0/3		
Skupaj		11/46		1/46	2/13	0/6
Farma/ vozila	dezobarijera*	0/1		0/2	0/1 ¹	0/1
	silos*	0/8		0/7	0/1 ¹	0/1
	tla pred vhodom [∞]	2/2		0/2	0/1 ¹	0/1
	trava ob objektu [∞]	2/3		0/3	0/2 ¹	0/1
	mačke ○	1/5				
	rejci**	2/12		0/12	0/4 ¹	0/4
	vozila rejcev***	1/6		0/8	0/2 ¹	0/2
	kamion/DSP, †, ‡			0/6		0/2
	kamion/krma, †, ‡	0/4		0/6		
	kamion/izlov, †, ‡	2/6			1/2 ¹	
drugo		0/3				
Skupaj		10/50		0/46	1/13	0/12
Klavnica	vratne kožice	8/40			1/40	
	drugo				0/5	
Št. pozitivnih vzorcev/št. vseh vzorcev		42/211	1/32	1/164	6/96	0/27

Legenda: ¹ hlev 3; [∞] – eden ali dva para obujkov; * – gobica; ◇ – 2 x 0,5 litra; ○ – rektalni bris; ** – rejci (čevlji, lasje, roke, obleka); *** – vozila rejcev (gume, notranjost); †, ‡ – kamion/dan stari piščanci (DSP) (gume, notranjost); †, ‡ – kamion/krma (gume, notranjost); †, ‡ – kamion/izlov (gume, notranjost)

Da bi preverili stanje kontaminacije s *S. Infantis* na farmi, smo po letu dni odvzeli vzorce v vseh hlevih pred vselitvijo piščancev in po končanem pitanju. Pred vselitvijo piščancev (VI) *S. Infantis* na farmi nismo potrdili (0/40) (VI). Po zaključenem pitanju (VII) pa smo *S. Infantis* potrdili v vzorcih v štirih hlevih: 1 (rejec A), 6 (rejec B), 7 in 8 (rejec C), pozitivne so bile tudi vratne kožice odvzete piščancem, ki so izvirali iz hlevov 1, 6 in 7 (tabela 2).

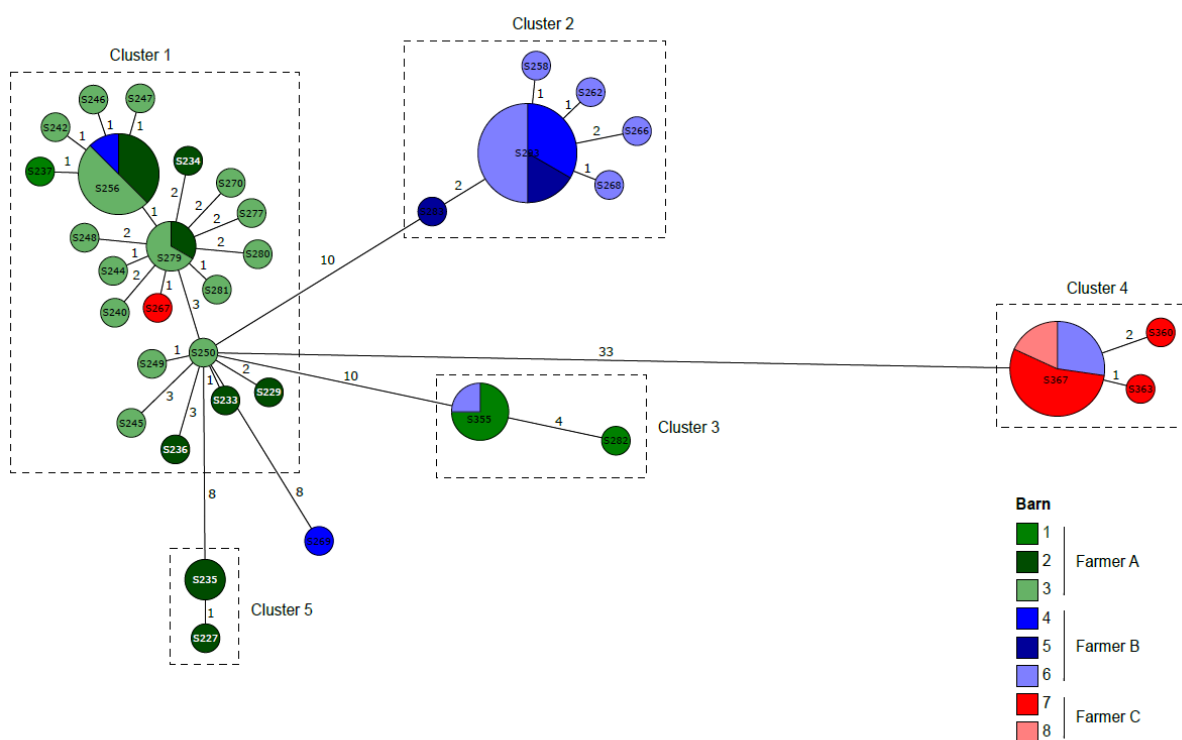
Tabela 2: Rezultati usmerjene bakteriološke preiskave na *S. Infantis* po končanem pitanju v letu 2022

		VII							
		(po izlovu 27. junij – 7. julij 2022)							
Prostor in mesta vzorčenja		Rejec/hlev							
		A		B		C			
		1	2	3	4	5	6	7	8
Hlev - vzrejni prostor	tla ∞	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1
	zračne lopute*	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
	napajalniki*	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Predprostor hleva	tla ∞	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	0/1
Okolica	tla pred vhodom ∞	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1
Klavnica	vratne kožice [#]	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5	5/5	0/5

Legenda: ∞ – eden ali dva para vpojnih obuval; * sterilna gobica, [#] 5 vzorcev

Molekularna tipizacija sevov *S. Infantis* s poudarkom na determinantah odpornosti

Vsi izolati *S. Infantis* ($n = 69$), ki smo jih pridobili v okviru vseh vzorčenj na farmi, so pripadali sekvenčnemu tipu (ST) 32 in so imeli plazmid pESI. Na osnovi analize zaporedij lokusov osrednjega genoma (cgMLST) smo izolate razvrstili v pet gruč (*angl.* cluster) (≤ 7 razlik v alelih). En izolat iz objekta 4 se ni razvrščal v nobeno izmed petih ugotovljenih gruč (slika 2).



Slika 2. Minimalno vpeto drevo cgMLST za 69 preučevanih izolatov *Salmonella* Infantis.

V posamezno grupo so se razvrščali predvsem izolati iz objektov enega rejca, vendar pa so bili v treh grupah (1, 3 in 4) tudi posamezni izolati iz objektov drugih rejcev, kar nakazuje na občasen prenos sevov *S. Infantis* med hlevi različnih rejcev. Zanimivo je, da so bili v grupah 1, 2 in 5 samo izolati iz leta 2021, medtem ko so bili v grupi 3 izolati iz let 2021 in 2022, v grupi 4 pa samo izolati iz leta 2022. Vsi izolati, razen izolati iz grupe 4, so imeli enak profil genov za odpornost proti protimikrobnim spojinam (*tet(A)*)-

sul1-aadA1) ter dve kromosomski mutaciji v genih *parC* (T57S) in *gyrA* (S83Y). Omenjeni geni oz. mutacije so povezani z odpornostjo proti aminoglikozidom (streptomycinu), tetraciklinom, sulfonamidom in fluorokinolonom. Izolati iz gruč 4 so imeli dodaten gen *bla*_{TEM-1C}, ki kodira odpornost proti penicilinom. Glede na epidemiološke podatke lahko zaključimo, da smo nov sev *S. Infantis* prvič dokazali v hlevu 8 (rejec C) in se je nato ta sev razširil še v hlev 7. Enak sev smo ugotovili tudi v vzorcu vratnih kož iz klavnice pri brojlerjih iz hleva 6 (rejec B), vendar tega seva v samem hlevu 6 nismo dokazali. Rezultati nakazujejo stalno perzistenco istih klonov *S. Infantis* v objektih posameznega rejca (ali stalen vnos istih klonov iz okolja v objekt) in občasne prenose klonov *S. Infantis* med hlevi posameznih rejcev, vendar pa prihaja tudi do vnosov novih sevov na farmo.

Ugotavljanje determinant ESBL

Vse izolate *S. Infantis*, pridobljene med rednim delom, smo prospektivno presejalno testirali na ESBL z nasajanjem na trdna selektivna gojišča za izolacijo ESBL enterobakterij. Izolatov *S. Infantis* z determinantami ESBL nismo ugotovili, kar smo na izbranih izolatih *S. Infantis* potrdili tudi z analizo genomskih zaporedij.

Tipizacija WGS izbranih izolatov *S. Infantis* in bioinformacijska analiza podatkov

Sekvencirali smo izolate *S. Infantis* iz brojlerjev od različnih nosilcev dejavnosti, živil in ljudi, ki so bili pridobljeni v letih 2019–2022 ($n = 162$) in jih primerjali s celotno bazo VF, v kateri je skupno 357 genomskih zaporedij *S. Infantis* (pridobljenih v letih 2007–2022).

Večina izolatov *S. Infantis* ($n = 354$) je pripadala MLST ST32, ki je najbolj razširjen tip *S. Infantis* pri nas in v Evropi. En izolat iz mesne moke (krma) je pripadal ST1032, pri dveh izolatih (človek, pitovni piščanec) pa smo ugotovili nov sekvenčni tip. Plazmid pESI smo ugotovili pri 340/357 (95,2 %) izolatov. Pri ljudeh smo ugotovili značilno ($p = 0.0001$) večje število pESI-negativnih izolatov v primerjavi z izolati iz pitovnih piščancev. Pri pitonih piščancih smo zadnje izolate brez plazmida pESI pridobili v letu 2008, medtem ko so se pri ljudeh pojavljali tudi v zadnjih letih (do leta 2020). Izolate brez plazmida pESI smo ugotovili tudi v živilih (gosje meso–uvoz, goveje/svinjsko mleto mešano meso–uvoz in svinjski vrat s kostjo) in krmi (mesna moka), vendar so taki sevi *S. Infantis* v nacionalnem in globalnem merilu vse redkejši. Pri sedmih izolatih *S. Infantis* iz pitovnih piščancev in živil smo ugotovili štiri okrnjene različice plazmida pESI, kar še dodatno potrjuje veliko genomsko plastičnost plazmida pESI, ki omogoča evolucijsko prilagoditev *S. Infantis* na različne okoljske dejavnike. Tovrstni izolati z okrnjenim plazmidom pESI niso imeli genov *sul1*, *tet(A)* in/ali *aadA1* oz. so imeli nepopoln gen *tet(A)*. Nekateri izolati z okrnjenimi različicami pESI so imeli dodatne gene za odpornost proti penicilinom ali trimetoprimu, zato okrnjena različica pESI ne pomeni nujno tudi odpornosti proti manj skupinam antibiotikov.

Vse analizirane izolate smo lahko na osnovi genov in mutacij, povezanih z odpornostjo proti protimikrobnim zdravilom, razvrstili v 20 rezistotipov. Determinant ESBL in genov za odpornost proti kolistinu nismo ugotovili pri nobenem izolatu. Ugotovili smo 30 različnih genov in mutacij za odpornost; ti so bili povezani z odpornostjo proti šestim skupinam protimikrobnih zdravil (aminoglikozidi, fluorokinoloni, penicilini, tetraciklini, antagonist folne kisline in fenikoli) in nitrofurantoinu. Večkratno odpornih (odpornih proti trem ali več skupinam protimikrobnih zdravil) izolatov *S. Infantis* je bilo 337/357 (94,4 %). Večina pESI-pozitivnih izolatov *S. Infantis* (333/357; 93,3 %) je imela tudi gene za odpornost proti kvarternim amonijevim spojinam (*qacEΔ1*) in živem srebru (*mer*).

S tipizacijo cgMLST smo ugotovili 32 gruč genetsko ozko sorodnih (klonalnih) izolatov, med katerimi sta dve gručki vsebovali tako perutninske kot humane izolate (gručki 7 in 13), dve gručki pa poleg izolatov iz pitovnih piščancev in ljudi še izolate iz živil (gručki 5 in 12). Izolati v teh štirih gručah so bili pridobljeni v daljšem časovnem obdobju (5–13 let), kar nakazuje na to, da gre za razširjene seve, ki lahko povzročajo okužbe ljudi. V gručki 7 je bilo devet izolatov pitovnih piščancev enega rejca (pridobljenih v letih 2013–2018) in en humani izolat iz leta 2019, medtem ko so bili v gručki 13 perutninski izolati treh rejcev iz let 2016–2020 ter humani izolat iz leta 2017. V gručki 5 je bilo poleg

petih humanih izolatov še več izolatov pitovnih piščancev in izolatov piščančjega in puranjega mesa različnih nosilcev dejavnosti in proizvajalcev. En izolat je bil iz uvoženega puranjega mesa. V gruči 12 so bili poleg dveh humanih izolatov še izolati pitovnih piščancev in izolati iz piščančjega mesa istega proizvajalca pridobljeni v letih 2015–2019. Vsi humani izolati so bili pridobljeni iz blata bolnikov, dva izolata iz gruč 5 pa iz urina in krvi bolnikov. Ti rezultati nakazujejo, da so bili v nekaterih primerih slovenski pitovni piščanci in meso vir okužbe za ljudi oz. da gre v nekaterih primerih za skupni vir okužbe ljudi. Kljub temu se 21/30 humanih izolatov ni razvrščalo skupaj z izolati iz pitovnih piščancev ali živil, kar nakazuje na drug vir okužbe ljudi (npr. uvožena živila in potovanja v tujino). V splošnem smo z eno izjemo ugotovili razvrščanje izolatov pitovnih piščancev po nosilcih dejavnosti v posamezne gruč. Primerjava izolatov istega rejca iz različnih let je pokazala, da gre pri posameznem rejcu za perzistenco ozko sorodnih izolatov tudi skozi daljše časovno obdobje (tudi do osem let), vendar vmes prihaja v posameznih rejah tudi do vnosa novih sevov *S. Infantis*, ki niso nujno perzistentni. V štirih gručah z izolati pitovnih piščancev istega nosilca dejavnosti so bili izolati različnih rejcev iz istega kraja, kar nakazuje na prenos sevov med različnimi rejci v neposredni bližini (npr. prenos z osebami ali orodjem, preko muh ali glodavcev). Izolati iz pitovnih piščancev in živil oz. živil, ki so bili v istih gručah, so v večini primerov pripadali istemu proizvajalcu. V eni gruči sta bila dva izolata iz piščančjega mesa, vendar je bil eden od slovenskega proizvajalca, drugi pa iz piščančjega mesa iz uvoza.

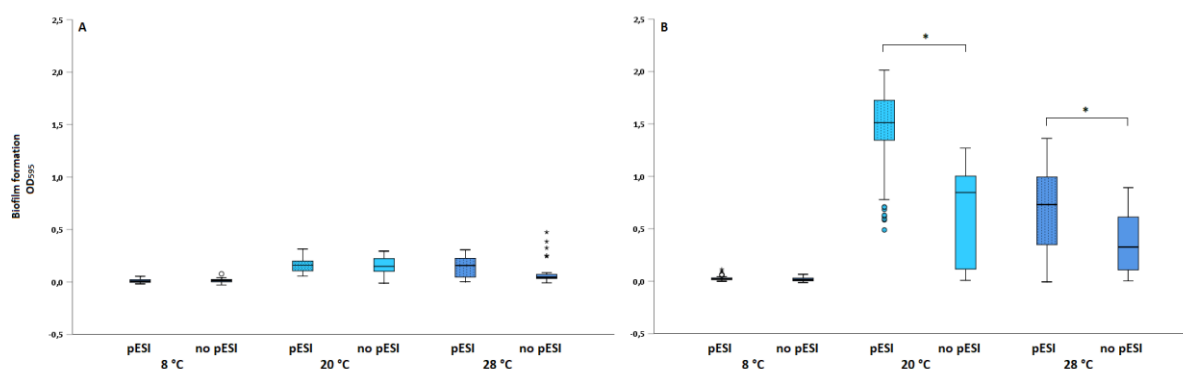
Opredelitev protibakterijske aktivnosti biocidov na biofilme bakterije *S. Infantis*

Določanje tvorbe biofilma na polistirenu s kristal vijoličnim (KV) in opredelitev sposobnosti tvorbe biofilma

Opravili smo testiranje na sposobnost tvorbe biofilma predhodno okarakteriziranih sevov *S. Infantis*. Testirali smo deset izolatov iz piščančje reje/predelave in pet humanih izolatov (tabela 3). Sposobnost tvorbe biofilma je bila testirana pri različnih temperaturah (8 °C, 20 °C in 28 °C) in časih inkubacije (24 ur, 72 ur in 168 ur).

Rezultati testiranja so pokazali, da je tvorba biofilma sevno specifična z vidnim trendom naraščajoče količine biofilma s časom. Vsi testirani izolati so tvorili biofilm na polistirenu pri 20 °C in 28 °C po 72 in po 168 urah. Količina biofilma je bila značilno višja ($p < 0,001$) pri 20 °C in daljšem inkubacijskem času (168 ur). Prav tako je viden trend boljše tvorbe pri sevih s plazmidom pESI.

Tvorba biofilma izolatov s plazmidom pESI je bila po 168 urah inkubacije značilno večja pri 20 °C ($p < 0,001$) in 28 °C ($p = 0,003$). Vendar pa ni bilo statistično značilnih razlik v tvorbi biofilma med sevi po 72 urah inkubacije, ne glede na temperaturo inkubacije (slika 3).



Slika 3. Tvorba biofilma *S. Infantis* ($n = 15$) z in brez prisotnosti plazmida pESI pri različnih temperaturnih pogojih in časih inkubacije: (A) 72 ur in (B) 168 ur.

Na osnovi sposobnosti tvorbe biofilma pri 20 °C in 28 °C po 72 h in 168 h smo izolate *S. Infantis* razvrstili v štiri skupine (tabela 3).

Tabela 3: Sposobnost tvorbe biofilma izolatov *S. Infantis* na polistirenu pri dveh različnih temperaturah in inkubacijskih časih 72 in 168 ur

Temperatura	20 °C		28 °C	
Oznaka izolata	72 h	168 h	72 h	168 h
101/08	šibek	šibek	zmeren	šibek
160/121	šibek	zmeren	/	/
251/121	šibek	šibek	šibek	šibek
42/14	/	/	/	/
290/18	šibek	močen	šibek	močen
42/19	šibek	močen	šibek	močen
134/19	šibek	močen	šibek	močen
219/19	šibek	močen	šibek	močen
236/19	zmeren	močen	šibek	močen
323/19	šibek	močen	zmeren	močen
321/20*	/	močen	šibek	močen
58/21*	šibek	močen	šibek	zmeren
60/21*	/	močen	/	zmeren
61/21*	/	šibek	/	šibek
62/21*	zmeren	močen	šibek	močen

Legenda: Izolati *S. Infantis* s pESI so označeni poudarjeno; *humani izolati

Določanje biofilma bakterij *S. Infantis* na različnih površinah

Sposobnost adhezije seva *S. Infantis* 323/19 smo določali na treh površinah, ki se pogosto pojavljajo v reji in klavnici (plastika, jeklo AISI 304 in AISI 316). Predhodno smo za ta sev tudi ugotovili, da dodatek govejega serumskega albumina v koncentraciji 0,03 % kot simulacije nečistoč v okolju, ne vpliva na minimalne inhibitorne koncentracije (vrednosti MIC) testiranih biocidov.

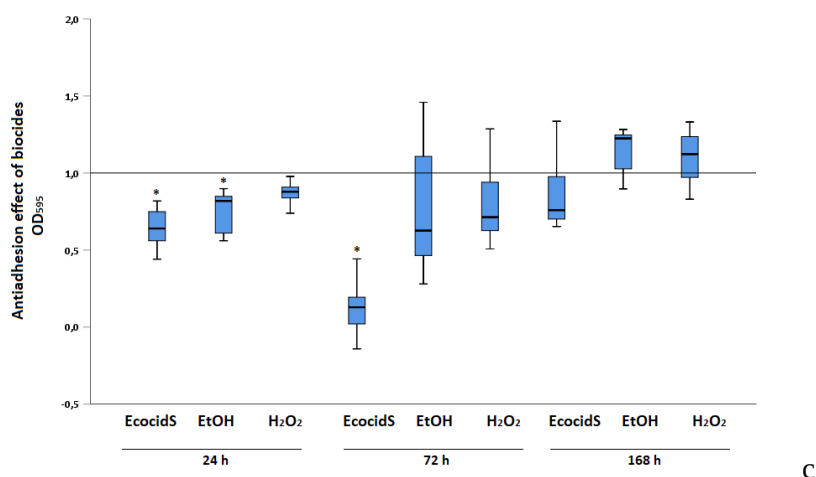
Zaradi lastnosti materialov smo poskus izvedli tako, da smo na površino posamezne ploščice nanесли suspenzije bakterij ter inkubirali 24 in 48 ur pri temperaturi 20 °C. Po obeh časih inkubacije (24 in 48 ur) je bilo na plastični površini število CFU/cm² statistično značilno ($p < 0,05$) višje v primerjavi z jeklom AISI 316. Po 48 urah inkubacije pa je bilo število CFU/cm² na jeklu AISI 316 statistično značilno nižje kot na ostalima testiranima površinama.

Protimikrobna učinkovitost izbranih biocidov

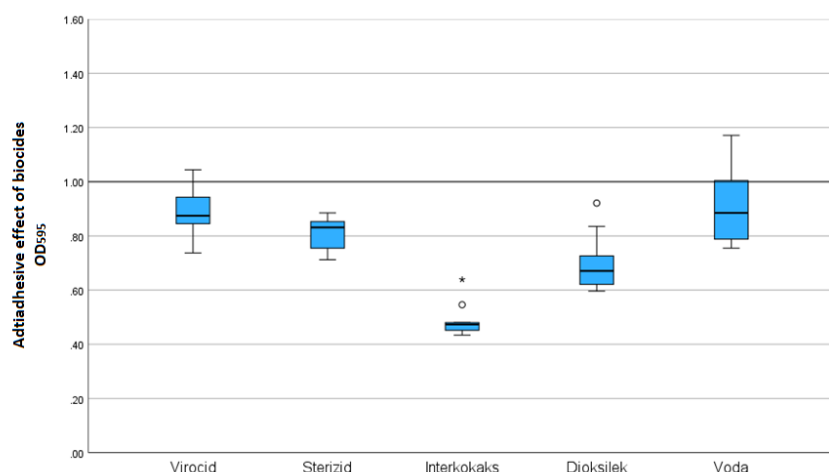
Za določitev protimikrobne učinkovitosti biocidov *in vitro* smo uporabili metodo mikrodilucije v hranilnem mediju. Testirali smo: Ecocid S, etanol in vodikov peroksid. Testiranje smo izvedli na petih humanih in petih živalskih izolatih *S. Infantis*. Vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) so bile za Ecocid S 0,75 % in za etanol 9 %. MIC vrednosti za vodikov peroksid so bile 0,015 % razen pri treh izolatih (101/8, 134/19, in 323/19), pri katerih so bile 0,029 %. Na sevu z najboljšo sposobnostjo tvorbe biofilma (izolat z oznako 323/19) smo testirali tudi druge biocide, ki se pogosteje uporabljajo v intenzivnih rejah perutnine. MIC vrednost so bile naslednje: Virocid 0,000195 %, Sterizid P12 DES 0,00156 %, Dioksilek 3,5 % Interkokask 0,0625 % in ionizirana voda 750 ppm.

Določanje antiadhezivnega učinka biocidov

Antiadhezivni učinek biocidov Ecocid S, etanol, vodikov peroksid, Virocid, Sterizid P12 DES, Dioksilek, Interkokask in aktivno/ionizirano vodo smo testirali na sevu *S. Infantis* 323/19. Učinke smo opazovali na poliestirenski površini v laboratorijskih pogojih, po inkubaciji pri 20 °C po 24, 72 in 168 urah. Biocide smo uporabili v subinhibitorni koncentraciji 1/8 MIC. Antiadheziven učinek se je pokazal samo po 24 urni inkubaciji in sicer značilno za Ecocid S, etanol in Interkokask. Po 48 urni inkubaciji je bil učinkovit samo Ecocid S. Rezultati so prikazani na sliki 4 in 5.



Slika 4. Antiadhezivni učinek biocidov Ecocid S, etanol in vodikov peroksid na izolat *S. Infantis* 323/19 po različnih inkubacijskih časih pri 20 °C.



Slika 5. Antiadhezivni učinek biocidov Virocid, Sterizid, Dioksilek, Interkokask in ionizirane vode na izolat *S. Infantis* 323/19 po 24 urah pri 20 °C.

Tretiranje biofilma S. Infantis z biocidi

Z biocidi smo tretirali biofilm *S. Infantis* 323/19 po 72 in 168 urni inkubaciji pri 20 °C. Uporabili smo koncentracije biocidov, ki se uporabljajo za dezinfekcijo površine, in sicer: 1 % Ecocid S, 70 % etanol in 1 % vodikov peroksid ter MIK vrednosti biocidov Virocid, Sterizid P12 DES, Dioksilek, Interkokask in ionizirano/aktivno vodo. 72 % etanol in 1 % Ecocid S sta se pokazala kot popolnoma učinkovita in že po 15-minutnem kontaktnem času nismo zaznali živosti bakterij. 1 % vodikov peroksid je bil učinkovit v primeru kontaktnega časa 30 min, po 15 min pa se je živost celic 72 ur starega biofilma znižala za 50 %, v primeru 168 ur starega biofilma pa je bila učinkovitost 18 %. Pri testiranju MIK vrednosti drugih biocidov je bil pri 15 min tretiranju 24-urnega biofilma učinkovit le Interkokask, ki je znižal živost bakterij za 12 %.

Presoja ustreznosti postopkov sanitacije na farmi in priporočila

Presoja izvajanja sanitacijskih postopkov

Čiščenje. Ob ogledu objekta smo ugotovili zaostalo nečistočo in prah na posameznih delih objekta in opreme (slika 6). V večini objektov opravljajo čiščenje s pomočjo hidranta in tlaka iz vodovodnega sistema (objekti 1–6). Kljub temu, da se uporabi glede na skupno površino objekta zadostno količino vode (50 m³ vode), ta nima pričakovanega učinka v procesu mokrega pranja objektov, saj curek vode

nima zadostne kinetične energije, da bi ustvaril ustrezen mehanični učinek ob zasušenih naslagah pri odstranjevanju nečistoče s talne površine.



Slika 6. Ostanki nečistoč po čiščenju.

Ob ogledu hlevov, kjer se uporablja čiščenje z visokim tlakom (hleva 7 in 8), omenjenih zastajanj nečistoče na tleh niti na napajalnikih ni bilo.

Čistilo pustijo delovati 12 ur, kar ni v skladu z navodili proizvajalca. Čistilni učinek sredstva se namreč po eni uri začne zmanjševati in oddvojena nečistoča s površin se ponovno nalaga. Ventilatorje čistijo le z izpihovanjem, kar omogoča širjenje mikroorganizmov v okolje. Na podoben način čistijo tudi silose ter pot med silosom in hlevov. Uporabljajo vodo iz vodovodnega sistema in imajo nameščen filtrirni sistem. Ker je poraba vode med rejo velika, menimo, da je potrebno preveriti zmožljivost filtracije filtrov. V predprostoru hlevov čiste in nečiste poti niso ločene.

Razkuževanje: Razkužilo se lahko nanaša na očiščene in sprane površine po postopku čiščenja. Običajna količina razkužila, ki jo pripravijo za razkuževanje površine, je 0,4 litra razkužila/m². Proizvajalec v navodilih priporoča 0,25 litra razkužila/m² površine. Za razkužbo objekta in dela dvorišča uporabijo samo 100 litrov razkužila. Ker je skupna površina objekta 3000 m², je potrebno pripraviti 1200 litrov

dezinfekcijske raztopine. Po objektu potresejo 25 kg gašenega apna oziroma glede na površino 23 g/m² površine. Razkuževanje površin med objekti poteka le sporadično. Razen prehoda/prevoza čez dezobariero na vhodu farme se posebej ne razkužuje niti oskrbnih vozil ob vstopu na dvorišče kot tudi ne voznikov. Ker je lastnikov na farmi več, si tudi medsebojno pomagajo, zato bi morali biti biovarnosti ukrepi še toliko bolj striktno izvajani.

Priporočila za učinkovito sanitacijo objektov in farme

Čiščenje:

- **Namakanje objekta:** po odvozu gnoja in temeljitim mehničnim čiščenju priporočamo namakanje objekta v količini 1,0–1,5 litra vode/m² površine objekta. Namakamo predvsem izpostavljene talne površine okrog krmilnikov v času 24 ur. Nato s pomočjo strgala ročno odstranimo namočene nečistoče iz površin pred začetkom mokrega čiščenja.
- **Mokro čiščenje:** priporočamo, da se za čiščenje površin uporablja visokotlačni način čiščenja s pomočjo visokotlačnih strojev z uporabo ploščatih in turbo šob.
- **Čiščenje napajalnikov:** priporočamo, da se v postopku namakanja omoči tudi krmilnike in napajalnike s kislo raztopino čistilnega sredstva, s čemer odstranimo tudi vodni kamen. To omogoča temeljitejši čiščenje napajalnikov.
- **Uporaba sredstva za čiščenje:** sredstvo za čiščenje je potrebno po eni uri delovanja na površine sprati s površin, da se odstrani nečistoča in samo sredstvo. S tem je omogočimo večjo učinkovitost razkužila, hkrati pa preprečimo morebitni nevtralizacijski učinek med čistilom in razkužilom.
- **Ventilacijski sistem:** priporočamo ureditev namestitve ventilatorjev tako, da se jih lahko odpira in se mogoči dostopnost v prezračevalne jaške. Taka namestitev omogoča tudi učinkovitejše postopke čiščenja in razkuževanja samih ventilatorjev.
- **Krmilni sistem s silosom:** priporočamo notranje visokotlačno čiščenje silosov in transportne poti.
- **Napajalni sistem:** priporočamo ločeno uporabo kislega sredstva za odstranjevanje vodnega kamna in uporabo vodikovega peroksida kot sredstva za razkuževanje.
- **Predprostor:** priporočamo vzpostavitev čistih in nečistih poti (oziroma področij), priporočamo tudi poostreitev čiščenja tal in opreme.

Razkuževanje:

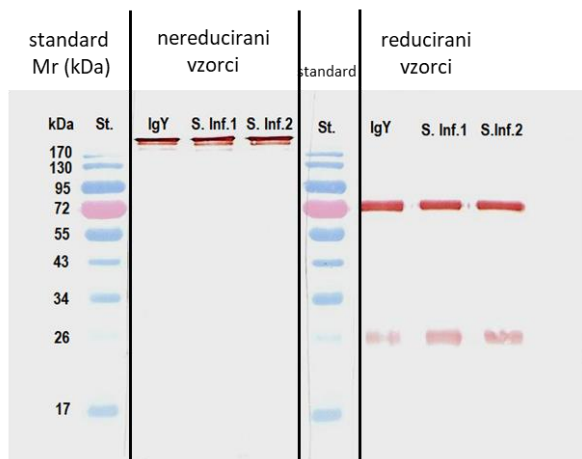
- **Razkuževanje objekta:** za ustrezno razkužbo objekta je potrebno pripraviti ustrezno količino razkužila. Priporočamo spiranje čistilnega sredstva in osušitve površin pred ponovno razkužbo. Uporaba gašenega apna ima zaviralni učinek na mikroorganizme posebej v drugem delu reje živali, ko se vlažnost v stelji poveča, priporočena količina gašenega apna je 0,5–1,0 kg/m² površine.
- **Razkuževanje ventilacijskega sistema:** potrebno je narediti dostop do ventilacijskih jaškov in ventilatorjev, da se lahko opravi razkuževanje.
- **Razkuževanje napajalnega sistema:** priporočamo, da se najprej uporabi kislo sredstvo, predvsem za odstranjevanje vodnega kamna, sledi spiranje sistema in nato uporaba vodikovega peroksida. S tem se bo povečala zanesljivost razkužbe cevne sistema.
- **Predprostor:** priporočamo uporabo razkužila za roke in ločevanje čistih in nečistih poti.
- **Dvorišče farme:** potrebno je vzpostaviti učinkovit način razkužbe vozil in voznikov (dezbariere ali sprotne dezinfekcije ob vstopu na dvorišče). Prav tako je potrebno izvajati razkužbo talnih površin pred in med objekti kot tudi zunanosti objektov.

Pridobivanje imunoglobulinov IgY proti *S. Infantis* iz rumenjakov kokošjih jajc in ugotavljanje njihove učinkovitosti in specifičnosti na modelu črevesne sluznice

Izolacija IgY iz jajčnega rumenjaka

IgY proti *S. Infantis* smo iz jajčnega rumenjaka izolirali z netoksičnimi reagenti, kar omogoča uporabo IgY v prehranske in medicinske namene. Izolat je vseboval med 21,8 in 22,1 mg/mL proteinov IgY. V povprečju smo iz enega mL rumenjaka izolirali 7,75 mg IgY. Z elektroforezno metodo NaDS-PAGE

smo potrdili čistost izoliranih protiteles. Dodatno smo IgY potrdili z imunskim odtisom (imunoblot) s primerjavo s standardom komercialnih piščančjih IgY. Za detekcijo smo uporabili konjugat IgG proti kokošjim IgY, konjugiranim s HRP, ter substrat AEC. Pri nereduciranih vzorcih smo detektirali eno liso, medtem ko smo pri reduciranih vzorcih potrdili prisotnost težkih in lahkih verig IgY. Imunoblot izoliranih IgY se je ujemal s standardom IgY (slika 7).

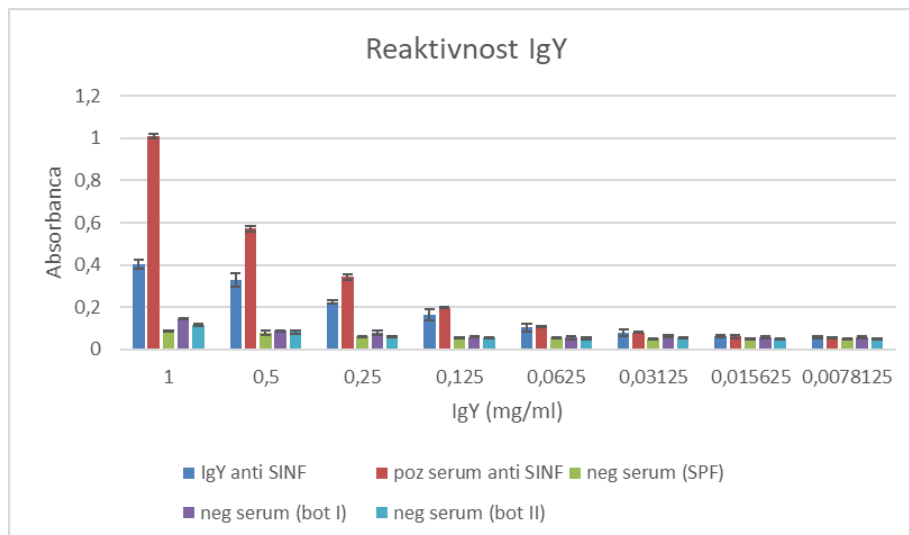


Slika 7. Imunoblot IgY: prikazani so standardi ter imunoblot nereducirajočih in reducirajočih vzorcev standarda IgY ter dveh serij izoliranih IgY *S. Infantis*.

Kvalitativno ovrednotenje specifičnosti IgY proti *S. Infantis*

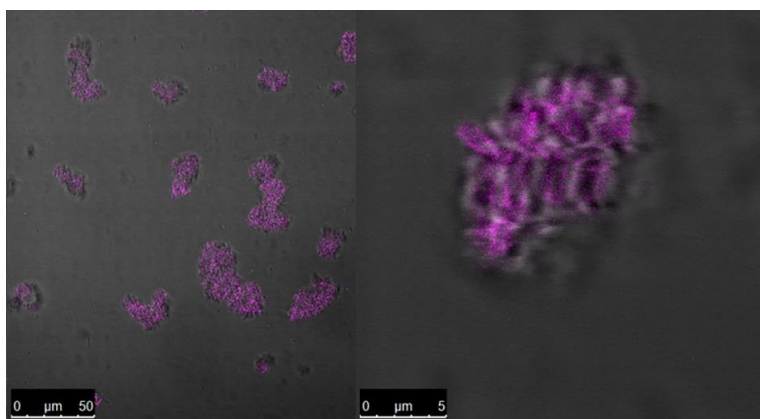
Vpeljali smo encimsko-immunski test (ELISA) za ugotavljanje protiteles po imunizaciji kokoši z inaktiviranim celim antigenom *S. Infantis*. Vpeljano metodo ELISA smo v nadaljevanju uporabili za določanje protiteles izoliranih iz jajčnih rumenjakov kokoši predhodno imuniziranih s *S. Infantis*. Testirali smo različne koncentracije IgY, izoliranih iz rumenjakov in določili mejno koncentracijo, pri kateri še ugotovimo protitelesa proti bakteriji *S. Infantis* z metodo ELISA; ta je znašala 0,03125 mg/ml. Določili smo tudi ekvivalent razredčitvi seruma 1:1000, ki je znašal 1 mg/mL. Zaključimo lahko, da je vpeljana metoda ELISA primerna za detekcijo IgY proti *S. Infantis*, izoliranih iz kokošjih rumenjakov. Koncentracija IgY proti *S. Infantis* v kokošjih rumenjakih je bila visoka, količina IgY proti *S. Infantis*, izoliranih iz kokošjih rumenjakov, pa je bila zadostna za nadaljnje poskuse. Metoda je potrdila pričakovano povišanje reaktivnosti proti *S. Infantis* (slika 8).

Dodatno smo izvedli funkcijske aglutinacijske teste. Metoda je pokazala povečano številčnost in velikost bakterijskih skupkov v prisotnosti specifičnih protiteles. Opsonizacijo bakterij smo dodatno potrdili s fluorescentno označenimi sekundarnimi protitelesi, z reaktivnostjo proti IgY. Ti so nazorno pokazali razporeditev IgY po celi površini *S. Infantis* v bakterijskih skupkih.



Slika 8. Absorbanca v meritvi ELISA je merilo reaktivnosti prikazanih koncentracij izoliranih IgY proti *S. Infantis* in je primerjana z zaporednimi dvakratnimi razredčinami (ne)specifičnih serumov (začenši s 500-kratno razredčino).

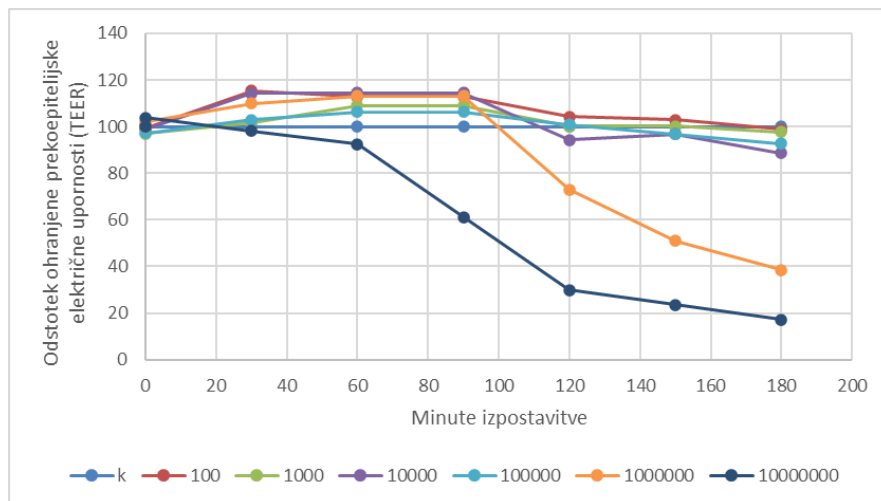
Dodatno smo izvedli funkcijske aglutinacijske teste. Metoda je pokazala povečano številčnost in velikost bakterijskih skupkov v prisotnosti specifičnih protiteles. Opsonizacijo bakterij smo dodatno potrdili s fluorescentno označenimi sekundarnimi protitelesi, z reaktivnostjo proti IgY. Ti so nazorno pokazali razporeditev IgY po celi površini *S. Infantis* v bakterijskih skupkih (slika 9).



Slika 9. Mikroskopski posnetek tvorbe aglutinacij *S. Infantis* v prisotnosti specifičnih IgY. Prisotnost IgY je potrjena s fluorescentno označenimi sekundarnimi protitelesi proti IgY (vijolično).

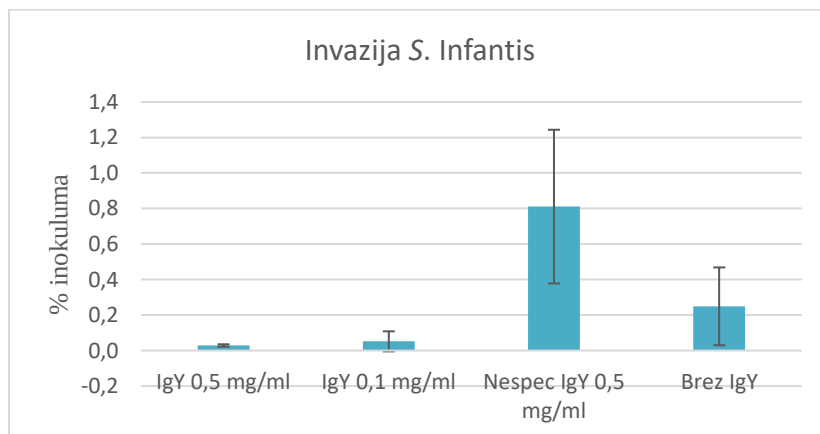
Preverjanje modela črevesne sluznice, kot pokazatelja odziva na okužbo s S. Infantis

Vzpostavili smo *in vitro* celični model za določanje interakcije bakterij *S. Infantis* in črevesnega epitelijskega modela. Uporabili smo črevesno epitelijsko celično linijo Caco-2. Z meritvami prekoepitelijske električne upornosti (TEER) smo pri tri tedne starih kulturah potrdili ustrezno visoko tesnost medceličnih stikov. To nam je omogočilo zaznavo poškodb na epiteliju kot posledice delovanja bakterij. Preverili smo izhodiščno prekoepitelijsko upornost. Ta je znašala med 2 in 3 kOhm. Celice smo izpostavili različnim inokulumom *S. Infantis* v razponu od 10^2 do 10^8 bakterij na mL ter spremljali upornosti z meritvami vsakih 60 minut. Porušitev integritete epitela, to je povišanje njegove prepustnosti za ione, smo zaznali kot padec električne upornosti. Pokazali smo korelacijo padca upornosti s časom izpostavitve epitelijskega modela in velikostjo inokuluma, kar je potrdilo ustreznost modela za detekcijo invazivnosti *S. Infantis* (slika 10).



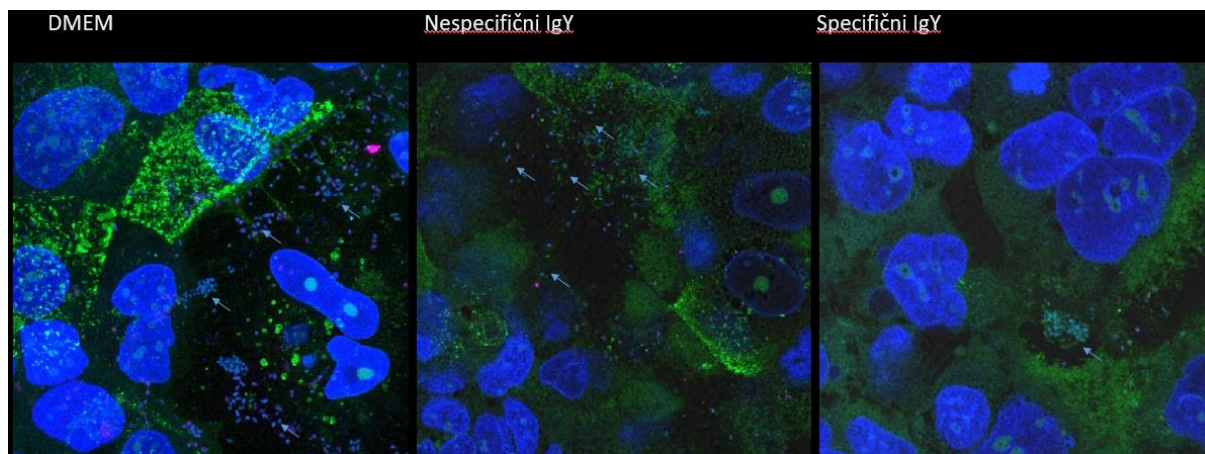
Slika 10. Prekoepitelijska upornosti v odvisnosti od števila bakterij in trajanja izpostavitve.
Legenda: k – kontrola brez bakterij.

Testirali smo vpliv specifičnih IgY na adhezivnost in invazivnost *S. Infantis* na humani črevesni epitelijski celični liniji Caco-2. Optimirali smo pogoje za izvedbo meritev; najprimernejšo velikost inokula, čas inkubacije, koncentracijo uporabljenih serumov in izoliranih IgY in vrsto medija. Izmerjene vrednosti so navkljub večji variabilnosti potrdile koncentracijsko odvisno omejitev vstopanja *S. Infantis* v epitelijske celice ob prisotnosti IgY specifičnih za *S. Infantis* (slika 11).



Slika 11. Odvisnost vstopanja *S. Infantis* v epitelijske celice Caco-2 izražen kot odstotek uporabljenega inokuluma.

Meritve adhezije na celice pa niso ponudile konsistentnih odgovorov. Ugotovili smo asociiranost *S. Infantis* z laboratorijsko plastiko, kar je eden od možnih vzrokov nekonsistentnosti teh meritev. Posnetki s konfokalnim mikroskopom so pokazali časovno odvisno akumulacijo *S. Infantis* na površini epitelnih celic in demonstrirali vstopanje posameznih bakterij v epitelne celice. Bakterije smo identificirali na osnovi oblike, vezave protiteles in barvanja DNK. Zaradi neenakomerne adhezije bakterij na celice na osnovi posnetkov ni mogoče napraviti kvantitativnih zaključkov, vendar pa smo večje zgostitve opazili v primeru odsotnosti IgY (slika 12).



Slika 12: Posnetki prikazujejo epitelne celice Caco-2 sprane in fiksirane po 90 minutni izpostavitvi *S. Infantis*. Modro barvilo označuje DNK jeder in bakterij (puščice) v primeru prisotnosti specifičnih ali nespecifičnih protiteles oziroma ob njihovi odsotnosti (DMEM-gojišče). Zelena barva aglutinina WGA označuje zgornjo površino celic. Pri specifičnih IgY vidimo redke, a večje skupke.

Ker celični model Caco-2 ne odraža povsem nativnega stanja črevesnega epitela – odsotnost mukuzne plasti, so za dokončne ocene uporabnih možnosti IgY potrebni tudi testi *in vivo*.

Izvedena izobraževanja, predstavitve rezultatov in objave

Možne izboljšave za učinkovitejšo sanitacijo v rejah perutnine smo v praksi predstavili rejcem ter organizirali poseben sestanek tudi z nosilcem dejavnosti, kjer smo študijo tudi izvedli (Pivka, maj 2021). V okviru strokovnega izobraževanja Komisije za perutnino pri Veterinarski zbornici Slovenije smo naša dognanja predstavili in prediskutirali tudi z veterinarji, tehnologi in drugimi strokovnjaki, ki se ukvarjajo z rejo in zdravstveno problematiko perutnine v Sloveniji (Ljubljana, 9. 11. 2023).

Naša spoznanja smo predstavili tudi na več mednarodnih konferencah in simpozijih, kot tudi v znanstvenih revijah z veliko mednarodno odmevnostjo:

Papić, Bojan, Mićunović, Jasna, Pirš, Mateja, Kavalič, Maja, Kušar, Darja, Ocepek, Matjaž, Avberšek, Jana. Genetic diversity of *Salmonella* Infantis isolated from poultry and humans: 2007–2020. V: *Program and abstracts: joint meeting of the German Research Platform for Zoonoses and the Research Network Zoonotic Diseases: online meeting*, Zoonoses International Symposium on Zoonoses Research, 13–15 October 2021. Berlin: German Research Platform for Zoonoses. 2021, str. 157. COBISS.SI-ID [81542403](#)

Avberšek, Jana, Papić, Bojan, Mićunović, Jasna, Slavec, Brigita, Kušar, Darja, Kavalič, Maja, Šemrov, Neva, Perc, Jasna, Zorman-Rojs, Olga. Critical points for the introduction and spread of *Salmonella* Infantis on a broiler farm. V: *Program and abstracts: joint meeting of the German Research Platform for Zoonoses and the Research Network Zoonotic Diseases: online meeting*, Zoonoses International Symposium on Zoonoses Research, 13–15 October 2021. Berlin: German Research Platform for Zoonoses. 2021, str. 158. COBISS.SI-ID [81546499](#)

Bezek, Katja, Avberšek, Jana, Zorman-Rojs, Olga, Barlič-Maganja, Darja. Biofilm formation and in vitro testing of commercial disinfectants against *Salmonella* Infantis strains. V: *FoodMicro 2022: 27th International ICFMH Conference Next generation challenges in food microbiology*, Atene, 28–31 August 2022. Atene: [s.l.], 2022. Str. 45. <https://www.foodmicro2022.com>. COBISS.SI-ID [120266755](#)

Bezek, Katja, Avberšek, Jana, Zorman-Rojs, Olga, Barlič-Maganja, Darja. Antimicrobial and antibiofilm effect of commonly used disinfectants on *Salmonella* Infantis isolates. *Microorganisms*. 2023, vol. 11, iss. 2, [article no.] 301, str. 1–12, ilustr. ISSN 2076–2607. <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/2/301>, COBISS.SI-ID [140082435](#)

Zorman Rojs in sod. 2023: Obvladovanje okužb z bakterijo *Salmonella* Infantis v rejah piščancev brojlerjev, zaključno poročilo

Papić, Bojan, Kušar, Darja, Mićunović, Jasna, Pirš, Mateja, Ocepek, Matjaž, Avberšek, Jana. Clonal spread of pESI-positive multidrug-resistant ST32 *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates among broilers and humans in Slovenia. *Microbiology spectrum*. [Spletna izd.]. 2022, str. 1-9, ISSN 2165-0497. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.02481-22>, COBISS.SI-ID [130438147](#)

Papić, Bojan, Kušar, Darja, Mićunović, Jasna, Pirš, Mateja, Biasizzo, Majda, Kavalič, Maja, Ocepek, Matjaž, Avberšek, Jana. Genetic Diversity Of *Salmonella* Infantis Isolates From Broilers, Humans And Food. V: 4th International Conference Of The European College Of Veterinary Microbiology: 15 - 17 September 2022, Bari, Italy. 4th International Conference Of The European College Of Veterinary Microbiology, 15 - 17 September 2022, Bari, Italy. Bari: University Of Bari Aldo Moro, Department Of Veterinary Medicine, 2022. Str. 37. COBISS.si-ID [123303171](#)

Avberšek, Jana. WGS as a tool for tracking zoonotic transmission of *Salmonella* serovars: The 4th Inter-Academy Scientific Symposium on Emerging zoonoses - continuous challenge, Ljubljana, 7. 10. 2022. COBISS.SI-ID [126481411](#)

Kavalič, Maja, Papić, Bojan, Mićunović, Jasna, Kušar, Darja, Šemrov, Neva, Zorman-Rojs, Olga, Avberšek, Jana. Persistence and spread of *Salmonella* Infantis on a broiler farm. V: *Abstract book: 5th International Conference of the European College of Veterinary Microbiology: 21-23 September 2023, Bled, Slovenia*. 5th International Conference of the European College of Veterinary Microbiology, 21-23 September 2023, Bled, Slovenia. Athens: European College of Veterinary Microbiology, 2023. Str. 36. <https://icecvmconf.org/>. [COBISS.SI-ID [168964867](#)]

RAZPRAVA IN ZAKLJUČKI

S. Infantis je v EU najpogostejše izoliran serotip salmonel pri pitovnih piščancih in predstavlja več kot polovico izolatov vseh salmonel iz jat in mesa perutnine. Tudi v Sloveniji je ta serotip prevladujoč v jatah pitovnih piščancev, svežem mesu in mesnih pripravkih. V okviru projekta smo determinirali ključne kritične točke vnosa in širjenja *S. Infantis* v rejah pitovnih piščancev. Rezultati so pokazali, da so kritična mesta kontaminacije s *S. Infantis* v vzrejnih prostorih hlevov napajalniki, tla in prezračevalni sistemi, ki predstavljajo lahko tudi potencialno nevarnost širjenja bakterije na farmi. V predprostorih objektov so bila najpogostejše kontaminirana tla, pozitivne so bile tudi delovne površine in različni predmeti, ki se uporabljajo za čiščenje objektov, kar je najverjetnejši način širjenja na farmah z več objekti, ki jih oskrbujejo isti rejci. Izmed vzorcev, ki smo jih odvzeli v okolici hlevov in širše na farmi, smo *S. Infantis* najpogostejše potrdili v vzorcih tal pred in med objekti, veliko nevarnost vnosa na farmo pa predstavljajo prevozna sredstva – tako vozila rejcev kot tudi vozila za prevoz piščancev v klavnico. Z uporabo najsodobnejših diagnostičnih metod smo potrdili stalno perzistenco oz. vnos istih klonov *S. Infantis* v objektih posameznega rejca in občasne prenose klonov *S. Infantis* med hlevi posameznih rejcev, kot tudi posamezne vnose novih sevov na farmo, kar sovпада in potrjuje pravilnost determiniranih kritičnih točk vnosa in širjenja te bakterije pri perutnini.

Vsi izolati *S. Infantis*, pridobljeni tekom tega projekta, so imeli plazmid pESI, hkrati pa smo pri novejših izolatih tega serotipa ugotovili tudi zmerno do močno izraženo filmotvornost, ki se s časom zaostajanja nečistoč v farmskem okolju izrazito poveča. Vse te prilagoditve *S. Infantis* omogočajo večjo sposobnost preživetja tako v gostitelju kot v okolju. S karakterizacijo delovanja najpogostejših biocidov, ki se uporabljajo v rejah perutnine, smo ugotovili, da imajo vsi v študijo vključeni biocidi sicer dobro protimikrobno delovanje proti *S. Infantis*, njihova antiadhezijska sposobnost pa variira glede na njihovo sestavo in starost biofilma. Dober antiadheziven učinek se je pokazal samo po 24-urni inkubaciji in sicer za razkužila pripravljena na bazi mešanice kalijevega peroksisulfata, površinsko aktivne snovi, organskih kislin in anorganskega pufra, razkužila na bazi krezola in za alkohol. Slabše delovanje razkužil na bazi kvaternih amonijevev spojin sovpadajo tudi z dognanjem, da imajo pESIpozitivni izolati *S. Infantis* gene za odpornost proti kvarternim amonijevim spojinam.

Vse te prilagoditve *S. Infantis* omogočajo večjo sposobnost preživetja tako v gostitelju kot v okolju, zato je odstranjevanje *S. Infantis* iz kontaminiranega objekta zelo zahtevno. Splošni ukrepi za sanacijo kontaminacij s *S. Infantis* vključujejo zlasti usmerjeno temeljito čiščenje in razkuževanje hleva pred ponovno naselitvijo živali, vendar pa morajo biti za uspešno sanacijo *S. Infantis* na farmi aktivno vključeni vsi, tako delavci na farmi, osebje zadolženo za logistiko dostave piščancev na farmo in na klavnico, tehnologi, veterinarji in vodstveno osebje. V okviru projekta smo skupaj z rejci pregledali stanje objektov po čiščenju in identificirali pomanjkljivosti, ki vodijo do zaostalih nečistoč in posledično slabšega delovanja razkužil. V procesu čiščenja smo izpostavili predvsem pomen namakanja, saj le-to omogoča, da odstranimo zaostalo nečistočo iz površin pred pričetkom mokrega čiščenja. Priporočili smo, da se za mokro čiščenje površin uporabljajo visokotlačni stroji z uporabo ploščatih in turbo šob. Pomembno je tudi, da se sredstva za čiščenje po eni uri delovanja iz površin sperejo. Poseben izziv v procesu čiščenja in razkuževanja predstavljajo ventilacijski sistemi. Ti se pogosto čistijo le z izpihovanjem, kar omogoča širjenje mikroorganizmov v okolje, njihova namestitve pogosto onemogoča dostopnost do prezračevalnih jaškov. Na osnovi identificiranih kritičnih točk smo dopolnili tudi proces razkuževanja, s posebnim poudarkom na pravilni količinski rabi razkužil, poostrenem razkuževanju predprostorov objektov, njihove neposredne okolice in razkuževanju vozil in osebja, ki prihajajo na farmo. Zmanjšanje kontaminacije na mestih z visokim tveganjem v kombinaciji s striktnim upoštevanjem biovarnostnih načel, kot so dosledna uporaba posebne obleke, zlasti obutve in predmetov za čiščenje le v posameznih objektih, in učinkovit proces celotne sanitacije objekta/farme, so ključni za zmanjšanje kontaminacije vzrejnih prostorov, živali, mesa in mesnih proizvodov. Na osnovi tega smo pripravili smernice za obvladovanje in zmanjšanje pojavnosti te bakterije v rejah pitovnih piščancev.

V okviru projekta smo vpeljali sistem produkcije specifičnih imunoglobulinov IgY pridobljenih iz kokoših jajc predhodno imuniziranih kokoši in uspeli delno ovrednotiti njihov potencial v *in vitro* pogojih. Ker pa uporabljeni celični model Caco-2 ne odraža povsem nativnega stanja črevesnega epitela, so za dokončne ocene uporabnih možnosti IgY potrebni tudi testi *in vivo*. Menimo, da ta tehnološki pristop predvsem zaradi težav z odpornostjo bakterij proti protimikrobnim zdravilom predstavlja eno od

dokaj enostavnih aplikativnih alternativ konvencionalnemu načinu obvladovanja okužb in da bi tak pristop pripomogel k zmanjšanju uporabe protimikrobnih zdravil pri rejnih živalih.

Z namenom ocene tveganja za prenos *S. Infantis* preko živali in mesa na ljudi, smo izolate *S. Infantis*, ki smo jih pridobili v okviru projekta, primerjali z že tipiziranimi izolati iz zbirke slovenskega NRL za salmonele, ki zajema skupno 357 genomskih zaporedij izolatov pridobljenih iz perutnine, perutninskih izdelkov in ljudi. Pri nobenem izolatu pridobljenem v okviru te študije nismo določili determinant ESBL. Prav tako pri nobenem izolatu nismo ugotovili genov za odpornost proti kolistinu. Ugotovili smo 30 različnih genov in mutacij za odpornost, ki so bili povezani z odpornostjo proti šestim skupinam protimikrobnih zdravil (aminoglikozidi, fluorokinoloni, penicilini, tetraciklini, antagonisti folne kisline in fenikoli) in nitrofurantoinu. Medsebojna primerjava sorodnosti sevov iz vseh treh virov nakazuje, da so bili v nekaterih primerih slovenski pitovni piščanci in meso vir okužbe za ljudi, saj smo ugotovili enake klone *S. Infantis* pri ljudeh, živalih in v živilih. Vendarle vir okužbe za večino humanih primerov ostaja neznan.

Literatura

Alba P, Leekitcharoenphon P, Carfora V, Amoruso R, Cordaro G, Di Matteo P, et al. Molecular epidemiology of *Salmonella* Infantis in Europe: insights into the success of the bacterial host and its parasitic pESI-like megaplasmid. *Microb. Genom.* 2020, 6:e000365, doi: 10.1099/mgen.0.000365.

Aviv G, Tsyba K, Steck N, Salmon-Divon M, Cornelius A, Rahav G, Grassl Guntram A, Gal-Mor OA. Unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. *Environmental Microbiology* 2014, 16, 977–994, doi:10.1111/1462-2920.12351.

Carfora V, Alba P, Leekitcharoenphon P, Ballarò D, Cordaro G, Di Matteo P, Donati V, Ianzano A, Iurescia M, Stravino F, Tagliaferri T, Battisti A, Franco A. Colistin resistance mediated by *mcr-1* in ESBL-producing, multidrug resistant *Salmonella* Infantis in broiler chicken industry, Italy (2016–2017). *Front Microbiol.* 2018; 9: 1880, doi: 10.3389/fmicb.2018.01880. Erratum in: *Front Microbiol.* 2018; 9: 2395.

Corcoran M, Morris D, De Lappe N, O'Connor J, Lalor P, Dockery P, Cormican M. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Appl Environ Microbiol* 2014, 80, 1507–1514, doi:10.1128/AEM.03109-13.

Drauch V, Ibesich C, Vogl C, Hess M, Hess C. *In-vitro* testing of bacteriostatic and bactericidal efficacy of commercial disinfectants against *Salmonella* Infantis reveals substantial differences between products and bacterial strains. *Int J Food Microbiol.* 2020; 328: 108660, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108660.

EFSA 2022. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2022; 20(12): 7666, 273 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>

EFSA 2021. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2021. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. *EFSA Journal* 2021; 19(4): 6490, 179 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490>

Franco A, Leekitcharoenphon P, Feltrin F, Alba P, Cordaro G, Iurescia M, Tolli R, D'Incau M, Staffolani M, Giannatale ED, et al. Emergence of a clonal lineage of multidrug-resistant ESBL-producing *Salmonella* Infantis transmitted from broilers and broiler meat to humans in Italy between 2011 and 2014. *PLOS ONE* 2015, 10, e0144802, doi:10.1371/journal.pone.0144802.

Grzywa R, Łupicka-Słowik A, Sieńczyk M. IgYs: on her majesty's secret service. *Front Immunol.* 2023; 14: 1199427, doi: 10.3389/fimmu.2023.1199427.

Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo JM, Gamazo C, Penadés JR, Lasa I. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol.* 2005; 58(5): 1322–39.

Marin C, Hernandiz A, Lainez M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poult Sci.* 2009; 88(2): 424–31.

Nógrády N, Kardos G, Bistyák A, Turcsányi I, Mészáros J, Galántai Z, Juhász A, Samu P, Kaszanyitzky JE, Pásztai J, Kiss I. Prevalence and characterization of *Salmonella* Infantis isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. *Int J Food Microbiol.* 2008; 127(1-2): 162–7, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.005.

Zorman Rojs in sod. 2023: Obvladovanje okužb z bakterijo *Salmonella* Infantis v rejah piščancev brojlerjev, zaključno poročilo

Newton K, Gosling B, Rabie A, Davies R. Field investigations of multidrug-resistant *Salmonella* Infantis epidemic strain incursions into broiler flocks in England and Wales. *Avian Pathology*, 2020; 49: 6, 631–641.

Papić B, Kušar D, Mićunović J, Pirš M, Ocepek M, Avberšek J. Clonal spread of pESI-positive multidrug-resistant ST32 *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates among broilers and humans in Slovenia. *Microbiol Spectr*. 2022;10(6): e0248122, doi: 10.1128/spectrum.02481-22.

Pate M, Mićunović J, Golob M, Vestby LK, Ocepek M. *Salmonella* Infantis in broiler flocks in Slovenia: The prevalence of multidrug resistant strains with high genetic homogeneity and low biofilm-forming ability. *Biomed Res Int* 2019, doi:10.1155/2019/4981463.

Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, Chacana PA, Porankiewicz-Asplund J, Terzolo HR. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim*. 2005; 33(2): 129–54, doi: 10.1177/026119290503300208.

Sever NK, Akan M. Molecular analysis of virulence genes of *Salmonella* Infantis isolated from chickens and turkeys. *Microb Pathog*. 2019; 126: 199–204.

Szmolka A, Szabó M, Kiss J, Pászti J, Adrián E, Olasz F, Nagy B. Molecular epidemiology of the endemic multiresistance plasmid pSI54/04 of *Salmonella* Infantis in broiler and human population in Hungary. *Food Microbiol*. 2018; 71: 25–31, doi: 10.1016/j.fm.2017.03.011.

Tate H, Folster JP, Hsu CH, Chen J, Hoffmann M, Li C, Morales C, Tyson GH, Mukherjee S, Brown AC, Green A, Wilson W, Dessai U, Abbott J, Joseph L, Haro J, Ayers S, McDermott PF, Zhao S. Comparative analysis of extended-spectrum- β -lactamase CTX-M-65-producing *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from humans, food animals, and retail chickens in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(7): e00488-17, doi: 10.1128/AAC.00488-17.

Tezel BU, Akçelik N, Yüksel FN, Karatug NT, Akçelik M. Effects of Sub-MIC Antibiotic concentrations on biofilm production of *Salmonella* Infantis. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2016, 30, 1184–1191, doi:10.1080/13102818.2016.1224981.

Umali DV, Lapuz RRSP, Suzuki T, Shiota K, Katoh H. Transmission and shedding patterns of *Salmonella* in naturally infected captive wild roof rats (*Rattus rattus*) from a *Salmonella*-contaminated layer farm. *Avian Diseases*, 2012, 56(2), 288–294.

Vestby LK, Møretrø T, Langsrud S., et al. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Vet Res* 2009; 5, 20.

Wales AD, Carrique-Mas JJ, Rankin M, Bell B, Thind BB, Davies RH. Review of the carriage of zoonotic bacteria by arthropods, with special reference to *Salmonella* in mites, flies and litter beetles. *Zoonoses Public Health*. 2010; 57(5): 299–314.