

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

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Šifra projekta:

V4-2004

2. 1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

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

2.2: Naslov projekta v angleškem jeziku:

Management strategies and control of *Salmonella* Infantis infections in broiler flocks

3. Ključne besede projekta

3.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

Perutnina, pitovni piščanci, *Salmonella* Infantis, karakterizacija sevov, biofilmi, dezinfekcija, kritične točke, sekvenciranje celotnih genomov (WGS)

3.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

Poultry, broilers, *Salmonella* Infantis, strain characterisation, biofilms, disinfection, critical points, whole-genome sequencing (WGS)

4. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

08023 Olga Zorman Rojs

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

Kemijski inštitut

Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju

6. Raziskovalno področje po šifrantu ARRS¹:

4.04.02 Animalna patologija in epizootiologija

7. Raziskovalno področje po šifrantu FOS²:

4.03 Veterina

8. Sofinancer/sofinancerji:

ARIS

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

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi? (v izbran kvadratk vtispiš črko x)

☒ a) v celoti

☐ b) delno

☐ c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

☐ a) da

☒ b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

¹ Spletni naslov šifrantu ARRS: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-vpp.asp>

² Spletni naslov šifrantu FOS: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/klasif-znan-FOS.asp>

2. Izvleček vsebinskega poročila o realizaciji predloženega programa dela ³:

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. *Salmonela* 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, 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 gruči 3 izolati iz let 2021 in 2022, v gruči 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* učinkovitosti izbranih

³ Na tem mestu je potrebno napisati izvleček vsebinskega raziskovalnega poročila -študije, ki je obvezen element tega obrazca (Priloga 1). V izvlečku mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

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 serumii 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*. Nadalje smo preverili vpliv IgY na proliferacijo in migracijo *S. Infantis* v kulturi. Meritve proliferacije s kvantitativnim PCR in sledenja rasti kolonijam ter migracije na čvrstem gojišču niso potrdile verjetnosti teh dveh mehanizmov pri zamejitvi delovanja bakterij z uporabo IgY. S konfokalnim mikroskopom smo demonstrirali interakcijo *S. Infantis* z epitelijskim modelom. 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 protektivnih 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 genoskih 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 genosko plastičnost plazmida pESI, ki omogoča evolucijsko prilagoditev *S. Infantis* na različne okoljske razmere. Tovrstni izolati z okrnjenim plazmidom pESI niso imeli genov *sulI*, *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.

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 izolat 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 (*qacEΔ1*) 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.

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen rezultatov in učinkov vašega raziskovalnega projekta⁴:

- F.01 pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin;
- F.02 pridobitev novih znanstvenih spoznanj;
- F.04 dvig tehnološke ravni;
- F.10 izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije;
- F.14 izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov;
- F.17 prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso;
- F.18 posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference);
- F.22 izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov;
- G.02.06 večja konkurenčna sposobnost;
- G.08 varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta⁵:

- 7. Zdravje: preprečevanje, spremljanje in obvladovanje nalezljivih in nenalezljivih bolezni, spremljanje (monitoring - širši pojem) zdravstvenega stanja
- 8. Kmetijstvo: spodbujanje kmetijstva, gozdarstva, ribištva in proizvodnje živil, veterina in druge kmetijske znanosti

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

Proizvodnja konkurenčne, visoko kakovostne in predvsem varne hrane od perutninske panoge zahteva vedno nove prilagoditve in izboljšave proizvodnje, vključno z zmanjševanjem mikrobiološke kontaminacije mesa. Okužbe s salmonelami so druga najpomembnejša s hrano prenosljiva bakterijska zoonoza v državah Evropske skupnosti. *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 brojlerjev, svežem mesu in mesnih pripravkih brojlerjev, okužba pa je prisotna tudi v prireji jajc. V okviru projekta smo določili ključne kritične točke vnosa in širjenja *S. Infantis* v rejah pitovnih

⁴ Vpišete lahko več odgovorov. Uporabite šifrant rezultatov pod točko F, učinkov pod točko G), ki je dostopen na spletnem naslovu: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/inc/sif-razisk-rezult.pdf>

⁵ Šifrant je dostopen na spletnem naslovu: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/inc/klasif-druz-b-ekon-09.pdf>

piščancev. Ugotovili smo, da vsi izolati *S. Infantis* pridobljeni tekom študije posedujejo plazmid pESI, ki povečuje sposobnost preživetja salmonel v okolju in v gostitelju. Z uporabo najsodobnejših diagnostičnih metod (analiza zaporedij lokusov osrednjega genoma) smo potrdili 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, kot tudi posamezne vnose novih sevov na farmo. Rezultati naše študije so tudi pokazali, da imajo novejši izolati *S. Infantis* zmerno do močno izraženo filmotvornost, ki narašča s temperaturo in časom. Okarakterizirali smo učinkovitost najpogostejših biocidov, ki se uporabljajo v rejah perutnine, in določili pomanjkljivosti čiščenja kot enega najpomembnejših korakov, ki omogočajo učinkovito sanitacijo perutninskih farm. Na osnovi vseh teh spoznanj smo pripravili smernice za obvladovanje in zmanjšanje pojavnosti bakterije v rejah. Rezultati, pridobljeni v okviru projekta, imajo uporabno vrednost za celotno slovensko perutninarstvo panogo.

Možne izboljšave za učinkovitejšo sanitacijo v rejah perutnine smo v praksi predstavili rejcem ter organizirali poseben sestanek tudi z nosilcem dejavnosti, kjer smo študijo izvedli. 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. Naša spoznanja smo predstavili tudi na več mednarodnih konferencah in simpozijih, kot tudi v znanstvenih revijah z veliko mednarodno odmevnostjo.

V okviru projekta smo vpeljali sistem produkcije specifičnih imunoglobulinov IgY pridobljenih iz kokoših jajc predhodno imuniziranih kokoši in poskušali ovrednotiti njihov potencial v *in vitro* pogojih. Menimo namreč, da ta tehnološki pristop predvsem zaradi težav z odpornostjo bakterij proti protimikrobnim zdravilom predstavlja eno od dokaj enostavno aplikativnih alternativ konvencionalnemu načinu obvladovanja okužb in zmanjšanja uporabe protimikrobnih zdravil.

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

Globalno se potrošnja perutninskega mesa v zadnjih letih zelo povečuje povsod po svetu. Perutninsko meso je cenovno konkurenčno, hitro pripravljeno in bolj zdravo, saj vsebuje manj nasičenih maščobnih kislin kot goveje, ovčje in prašičje meso. V Sloveniji je stopnja samooskrbe s perutninskim mesom stabilna, samooskrbna in izvozno naravnana. Proizvodnja konkurenčne, visoko kakovostne in predvsem varne hrane od perutninske panoge zahteva vedno nove prilagoditve in izboljšave proizvodnje, vključno z zmanjševanjem mikrobiološke kontaminacije mesa. Projekt obravnava pomemben ekonomski in zdravstveni problem v pridelavi perutninskega mesa in hkrati resen zdravstveni problem pri ljudeh. Čeprav salmoneloze pri ljudeh najpogosteje povzročata serotipa *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium*, so okužbe ljudi s *S. Infantis* na četrtem mestu. Poznavanje kritičnih točk za vnos okužb s *S. Infantis* v perutninske reje in določitev učinkovitih biovarnostnih ukrepov so tisti dejavniki, ki predstavljajo predpogoj za zmanjšanje kontaminacije živil perutninskega izvora s to bakterijo ter tako zmanjšanje tveganj za potrošnike. V izvedbo projekta je bil vključen drugi največji proizvajalec perutninskega mesa v Sloveniji, rezultati, pridobljeni v okviru projekta, pa imajo uporabno vrednost za celotno slovensko perutninarstvo proizvodnjo, kar omogoča večjo konkurenčnost te pomembne živinorejske in predelovalne panoge ne le pri nas, temveč tudi v svetu. V okviru projekta smo pridobili tudi pomemben podatek, da v slovenskih rejah perutnine zaenkrat ne krožijo sevi *S. Infantis* z determinantami ESBL, tudi genov za odpornost proti kolistinu nismo ugotovili, kar je z vidika varnosti potrošnikov posebej pa varnosti ljudi, ki so pri svojem delu v vsakodnevnem stiku s perutnino, zelo pomembno.

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

X a) v domačih znanstvenih krogih;

X b) v mednarodnih znanstvenih krogih;

X c) pri domačih uporabnikih;

☐ d) pri mednarodnih uporabnikih.

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

Interes po naših spoznanjih so izkazale večje perutninske hiše kot tudi strokovnjaki iz sosednjih držav, ki se ukvarjajo s podobno problematiko.

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

4. Sodelovanje z tujimi partnerji: /

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

/

Datum: 14.11.2023

Podpis vodje projekta:



Podpis in žig izvajalca:

PO POOBLASTILU:

izvr. prof. dr. Breda Vekovar Strajn
dekanja

Priloga 1: Zaključno poročilo

Priloga 2: Smernice za učinkovitejše obvladovanje kontaminacij s *S. Infantis* v rejah pitovnih piščancev