

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



UDK 579.25:579.842.1/.2:615.015.8:615.33:57.083(497.4)(043.3)

mag. Jasna Mićunović, dr. vet. med.

**GENOTIPI IN REZISTOTIPI BAKTERIJE *SALMONELLA TYPHIMURIUM*
V SLOVENIJI V OBDOBJU 2000 DO 2012**

Doktorska disertacija

**GENOTYPES AND RESISTOTYPES OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM*
ISOLATES IN SLOVENIA IN THE PERIOD FROM 2000 TO 2012**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2018

Jasna Mićunović

Genotipi in rezistotipi bakterije *Salmonella* Typhimurium v Sloveniji v obdobju 2000 do 2012

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

Javni zagovor je bil opravljen:

Mentor: zn. svet. dr. Matjaž Ocepek

Izjava o delu: Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršila avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

izr. prof. dr. Irena Zdovc

zn. sod. dr. Igor Gruntar

prof. dr. Boris Habrun (Hrv. Vet. Inst., Zagreb)

IZVLEČEK

Ključne besede: Mikrobiologija – veterinarska; salmonela – okužbe – mikrobiologija; *Salmonella Typhimurium* – učinki zdravil – genetika; zdravilo, rezistenca, mikrobná; mikrobni občutljivostni testi; genotipizacija; elektroforeza, gelska, pulzirajoče polje; Slovenija.

Salmoneloza je druga najpogosteša zoonoza v Evropski uniji. Salmonele povzročajo obolenja pri ljudeh in pri živalih. *Salmonella Typhimurium* je pomemben povzročitelj s hrano povezanih okužb pri ljudeh, poleg tega je zaskrbljujoč visok delež na protimikrobná zdravilam odpornih sevov.

V raziskavi smo pri 284 izolatih *S. Typhimurium*, ki so bili izolirani v letih 2000 do 2012 iz ljudi ($n = 93$), živali ($n = 111$), živil ($n = 71$) in drugih vzorcev ($n = 9$) preučevali rezistotipe, pridobljene z mikrodilucisko metodo določanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), in genotipe, pridobljene z metodo elektoforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE).

Ugotovili smo visok delež odpornih izolatov (72,2 %). Več kot polovica izolatov (55,6 %) je bila odporna proti več skupin antibiotikov (MDR), največ pri živalih (58,6 %) in najmanj pri ljudeh (43 %). Najpogosteši fenotipski rezistotipi so bili ACNaSuT (19,4 %), ACSuT (11,6 %) in ASuT (11,6 %). Prva rezistotipa sta bila značilna za živali (45,5 % in 51,5 %), medtem ko so bili izolati rezistotipa ASuT najpogosteši pri ljudeh (54,5 %). Ugotovili smo visok delež (32,4 %) izolatov, odpornih proti florokinolonom (pri živalih 44,1 %, pri živilih 29,6 %, pri ljudeh 18,3 %). Odpornost proti ampicilinu, tetraciklinu in sulfonamidom je bila najvišja pri izolatih iz živil (69,0 %, 66,2% in 80,3 %).

Na podlagi makrorestrikcije z encimom *XbaI* smo z metodo PFGE ugotovili 96 genotipov, razvrščenih v devet genetskih skupin (A – I), in 21 unikatnih genotipov. Največja je bila genetska skupina F z 31 genotipi, ki so predstavljali 57,7 % vseh izolatov (52,4 % iz živali, 25,6 % iz živil, 19,5 % iz ljudi in 2,4 % iz drugih vzorcev). Dve tretjini (67,1 %) izolatov v genetski skupini sta bili MDR, z najpogostešima rezistotipoma ACNaSuT in ACSuT. Druga največja skupina je bila genetska skupina E z 11,3 % vseh izolatov (12 genotipov), od tega 59,4 % iz ljudi, 31,3 % iz živil in 9,4 % iz živali. MDR je bila dokazana pri 78,1 % izolatov z najpogostešim rezistotipom ASuT. V genetski skupini I (5,6 % izolatov, 2 genotipa) je bilo 87,5 % izolatov iz ljudi in 12,5 % izolatov iz živali. Večina izolatov (81,3 %) je bila občutljiva na vsa testirana protimikrobná zdravila, medtem ko so MDR izolati (12,5 %) izkazovali rezistotip ASuT.

V raziskavi smo pridobili dragocene podatke o odpornosti in genotipih bakterije *S. Typhimurium* na nacionalni ravni. Za uspešen nadzor izbruhov salmoneloze in spremljanja odpornosti proti protimikrobnim zdravilom je zelo pomembno globalno poznavanje te tematike, zato so podatki iz te raziskave pomemben prispevek k nacionalnemu in mednarodnemu preiskovanju izbruhov.

ABSTRACT

Key words: Microbiology – veterinary; salmonella infections – microbiology; *Salmonella Typhimurium* – drug effects – genetics; drug resistance, microbial; microbial sensitivity tests; genotype; electrophoresis, gel pulsed-field; Slovenia

Salmonellosis is the second most commonly reported zoonotic disease in the European Union. *Salmonellae* cause disease in humans and animals. *Salmonella Typhimurium* is one of the important causative agents of food-borne infections in humans, with a worrying high proportion of strains resistant to antimicrobials.

In the present work, a total of 284 *S. Typhimurium* strains isolated between 2000 and 2012 were studied. Microdilution method to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) were used to study resistotypes and genotypes of 93 isolates from humans, 111 isolates from animals, 71 isolates from food and 9 isolates from other samples.

A high proportion (72.2%) of isolates was found to be resistant. More than half of the isolates (55.6%) were multi-drug resistant (MDR), mostly in animals (58.6%) and least in humans (43%). The most common phenotypic resistotypes were ACNaSuT (19.4%), ACSuT (11.6%) in ASuT (11.6%). The first two were characteristic for animals (45.5% in 51.5%) while the isolates with ASuT were most frequently found in humans (54.5%). A high proportion (32.4%) of isolates resistant against fluoroquinolones was revealed (44.1% in animals, 29.6% in food, 18.3% in humans). The resistance against ampicillin, tetracycline and sulfonamides was the highest in food isolates (69.0%, 66.2% and 80.3%, respectively).

Macrorestriction with restriction endonuclease *Xba*I yielded 96 genotypes grouped into nine clusters (A – I) and 21 unique genotypes. The largest cluster F comprised 31 genotypes which represented 57.7% of all isolates (52.4% from animals, 25.6% from food, 19.5% from humans and 2.4% from other samples). Two thirds (67.1%) of the isolates within this cluster were MDR with the most common resistotypes ACNaSuT and ACSuT. The second largest cluster was cluster E containing 11.3% of all isolates of 12 genotypes; 59.4% originated from humans, 31.3% from food and 9.4% from animals. MDR was established in 78.1% of isolates with the most common resistotype being ASuT. Cluster I (5.6% isolates, 2 genotypes) encompassed 87.5% isolates from humans and 12.5% isolates from animals. The majority of isolates (81.3%) were susceptible to all antimicrobials tested; MDR isolates (12.5%) were mostly of ASuT resistotype.

The study enabled us to collect valuable data on *S. Typhimurium* resistance and genotypes at the national level. Global knowledge on these topics is of utmost importance to successfully control salmonellosis outbreaks and to monitor the antimicrobial resistance. Therefore, the data gathered in the scope of the present study add an important piece to outbreak investigations on the national and international level.

KAZALO VSEBINE	
IZVLEČEK	4
ABSTRACT	5
KAZALO VSEBINE	6
KAZALO TABEL	8
KAZALO SLIK	12
SEZNAM OKRAJŠAV	14
1 UVOD	17
2 PREGLED LITERATURE.....	19
2.1 SALMONELLA.....	19
2.1.1 Taksonomija in osnovne značilnosti	19
2.1.2 Naravno okolje	19
2.1.3 Patogenost	20
2.2 SALMONELOZA.....	21
2.2.1 Pot okužbe, naselitev in epidemiologija.....	21
2.2.2 Salmoneloza pri ljudeh	22
2.2.3 Salmoneloza pri živalih	23
2.3 NADZOR V EU IN SVETU	24
2.4 NADZOR V SLOVENIJI.....	28
2.5 METODE DOLOČANJA IN TIPIZACIJE.....	31
2.5.1 Izolacija	31
2.5.2 Tipizacijske metode	31
2.5.2.1 Fenotipske tipizacijske metode.....	31
2.5.2.2 Molekularne metode	33
2.6 ODPORNOST SALMONEL PROTI ANTIBIOTIKOM.....	35
2.6.1 Metode za določanje odpornosti	39
2.6.2 Interpretacija rezultatov ugotavljanja odpornosti proti antibiotikom	39
2.6.3 Pregled rezultatov ugotavljanja odpornosti iz literature	42
3 MATERIALI IN METODE	47
3.1 PREUČEVANI IZOLATI.....	47
3.2 METODE	50
3.2.1 Elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (PFGE)	50
3.2.1.1 Izolacija DNA	50
3.2.1.2 Cepitev DNA z encimom <i>Xba</i> I.....	51
3.2.1.3 Elektroforeza.....	51
3.2.1.4 Analiza rezultatov PFGE	53
3.2.1.5 Opredelitev genotipov – kriteriji	53
3.2.2 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) – mikrodilucijska metoda	53
3.2.2.1 Inokulacija	53
3.2.2.2 Ocenjevanje rezultatov	54
3.2.2.3 Interpretacija rezultatov	54
3.3 STATISTIČNA ANALIZA	56

4 REZULTATI	57
4.1 REZULTATI GENOTIPIZACIJE Z METODO PFGE.....	57
4.1.1 Genetska skupina F	59
4.1.2 Genetska skupina E	61
4.1.3 Genetska skupina G	61
4.1.4 Genetska skupina I	61
4.2 REZULTATI TESTIRANJA NA OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE	62
4.2.1 Odpornost po kategorijah in podkategorijah	64
4.2.2 Odpornost glede na število skupin antibiotikov	66
4.2.3 Rezistotipi	69
4.2.3.1 Zastopanost najpogostejših rezistotipov izolatov iz ljudi in živali	71
4.2.4 Trendi odpornosti.....	71
4.3 UGOTAVLJANJE POVEZAV MED ODPORNOSTJO PROTI ANTIBIOTIKOM TER GENETSKIMI SKUPINAMI IN GENOTIPI.....	75
4.3.1 Pogostost dobro občutljivih izolatov po genetskih skupinah.....	75
4.3.2 Večkratna odpornost po genetskih skupinah in kategorijah.....	77
4.3.3 Število izolatov posameznih rezistotipov po kategorijah in genetskih skupinah.....	79
4.3.4 Odpornost izolatov, najpogostejši rezistotipi in genetske skupine	80
4.3.5 Odpornost proti posameznim antibiotikom v posameznih genetskih skupinah glede na izvor izolatov	81
4.3.6 Primer prikaza rezultatov za epizootiološko analizo izolatov s prašičje farme	84
5 RAZPRAVA	85
5.1 GENOTIPI	86
5.2 ODPORNOST IZOLATOV.....	89
5.3 GENOTIPI IN REZISTOTIPI	93
6 ZAKLJUČKI	97
6.1 HIPOTEZE	97
6.2 SKLEPI.....	99
7 POVZETEK.....	101
8 SUMMARY	103
9 ZAHVALE	105
10 LITERATURA	106
11 Priloge	113

KAZALO TABEL

Tabela 1: Podatki o številu pregledanih in pozitivnih živalih v Sloveniji iz obdobja 2007 do 2016.....	30
Table 1: Data on the number of checked and positive animals in Slovenia in the period 2007 to 2016.....	30
Tabela 2: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti ampicilinu	113
Table 2: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to ampicillin	113
Tabela 3: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti kloramfenikolu.....	114
Table 3: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to chloramphenicol.....	114
Tabela 4: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti sulfonamidom.....	115
Table 4: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to sulphonamides	115
Tabela 5: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti tetraciklinu	116
Table 5: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to tetracycline	116
Tabela 6: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti nalidiksinski kislini	117
Table 6: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to nalidixic acid	117
Tabela 7: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti ciprofloksacinu.....	118
Table 7: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to ciprofloxacin.....	118
Tabela 8: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti trimetoprimu	119
Table 8: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to trimethoprim	119
Tabela 9: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti gentamicinu	119
Table 9: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to gentamicin	119
Tabela 10: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti cefotaksimu	120
Table 10: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to cephalexine	120

Tabela 11: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti ceftazidimu	121
Table 11: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to ceftazidime.....	121
Tabela 12: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti tigeciklinu	121
Table 12: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to tigecycline	121
Tabela 13: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti kolistinu	121
Table 13: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to colistine	121
Tabela 14: Podatki iz literature o odpornosti izolatov <i>S. Typhimurium</i> proti azitromicinu	122
Table 14: Data from literature about the resistance of the isolates of <i>S. Typhimurium</i> to azitromycine	122
Tabela 15: Podatki iz literature o MDR izolatih <i>S. Typhimurium</i>	122
Table 15: Data from literature about the MDR isolates of <i>S. Typhimurium</i>	122
Tabela 16: Podatki iz literature o dobri občutljivosti izolatov <i>S. Typhimurium</i>	123
Table 16: Data from literature about the sensitivity of the isolates of <i>S. Typhimurium</i>	123
Tabela 17: Število izolatov in kategorija (skupina).....	48
Table 17: The number of isolates and their cathegory (group)	48
Tabela 18: Kategorija izolatov, vir, število in leto izolacije.....	49
Table 18: Cathegory of isolates, the source, the number and the year of isolation	49
Tabela 19: Kategorija živali s podkategorijami proizvodne in druge ter monitoring in klinika	49
Table 19: Cathegory of animals with subcathegories production and other and monitoring and clinic	49
Tabela 20: Skupine antibiotikov, nabor antibiotikov na mikrotitrski plošči, območje testiranja in mejne vrednosti.....	55
Table 20: Groups of antibiotics, the scope of antibiotics on microtiter plate, scope of testing and cut-offs.....	55
Tabela 21: Genetske skupine s številom genotipov v posamezni skupini, številom izolatov ter izvorom izolatov po kategorijah	58
Table 21: Genetic groups with the numbers of genotypes, the numbers of isolates and the origine of isolates regarding cathegories	58
Tabela 22 : Genetske skupine in genotipi v njih ter število izolatov po kategorijah in letih	124
Table 22: Genetic groups, genotypes and number of isolates regarding cathegories and year of isolation	124
Tabela 23: Število in delež izolatov v genotipih genetske skupine F po kategorijah ter po podkategorijah proizvodne in druge živali.....	59

Table 23: The number and percentage of isolates in genotypes of the genetic group F regarding cathegories and subcathegories production and other animals.....	59
Tabela 24: Primerjava (število in % izolatov) genotipov F7, F9 in F11 in vseh genotipov genetske skupine F po kategorijah in podkategorijah živali in živil.....	60
Table 24: Comparison (number and % of isolates) of genotypes F7, F9 and F11 and of all the genotypes of the genetic group F regarding cathegories an subcathegories animals and foodsuffs	60
Tabela 25: Distribucija vrednosti MIK vseh izolatov (n = 284) po posameznih testiranih antibiotikih	63
Table 25: The distribution of MIC values of all the isolates (n=284) regarding individual antibiotics tested.....	63
Tabela 26: Distribucija MIK pri izolatih iz ljudi (n = 93)	125
Table 26: Distribution of MIC in isolates from humans (n=93).....	125
Tabela 27: Distribucija MIK pri izolatih iz živali (n = 111)	126
Table 27: Distribution of MIC in isolates from animals (n=111)	126
Tabela 28: Distribucija MIK pri izolatih iz živil (n = 71)	127
Table 28: Distribution of MIC in isolates from foodstuffs (n=71)	127
Tabela 29: Distribucija MIK pri izolatih iz drugih vzorcev (n = 9)	128
Table 29: Distribution of MIC in isolates from other samples (n=9)	128
Tabela 30: Primerjava odpornosti (število in delež) proti posameznim antibiotikom med kategorijami in podkategorijami	129
Table 30: Comparison of the resistance (number and percentage) to individual antibiotics regarding cathegories and subcathegories.....	129
Tabela 31: Prikaz odpornosti po številu testiranih skupin antibiotikov	67
Table 31: Presentation of the resistance regarding the number of antibiotic groups tested.....	67
Tabela 32: Odpornost po skupinah S, R in MDR pri posameznih vrstah	68
Table 32: Resistance regarding the gorups S, R and MDR in individual specieses	68
Tabela 33: Odpornost vseh izolatov <i>S. Typhimurium</i> (n = 284) proti posameznim antibiotikom in pripadajoči rezistotipi.....	69
Table 33: Resistance of all the isolates of <i>S. Typhimurium</i> (n = 284) to the individual antibiotics and their resistotypes	69
Tabela 34: Število in delež posameznega rezistotipa po kategorijah človek, žival, živilo, drugo in ter njihova razvrstitev v genetske skupine	70
Table 34: Number and percentage of individual resistotypes regarding the cathegories human, animal, foodstuffs and their pertaining to genetic groups	70
Tabela 35: Število in odstotek dobro občutljivih izolatov (n = 79) po genetskih skupinah ter kategorijah in podkategorijah živali in živil	129
Table 35: Number and percentage of sensitive isoaltes (n=79) regarding genetic groups and cathegories and subcathegories animals and foodstuffs	129

Tabela 36: Število in delež večkratno odpornih izolatov (n = 158) po genetskih skupinah ter kategorijah in podkategorijah žival in živilo	130
Table 36: Number and percentage of multiple drug resistant isolates (n=158) regarding genetic groups and cathegories and subcathegories animal and foodstuffs	130
Tabela 37: Število izolatov posameznih rezistotipov po kategorijah in genetskih skupinah.....	79
Table 37: Number of isolates of individual resistotypes regarding cathegories and genetic groups	79
Tabela 38: Število in odstotek izolatov po skupinah I do IV glede na število skupin antibiotikov, proti katerim so odporni	80
Table 38: Number and percentage of the isolates in the groups I to IV regarding the number of antibiotic groups to which they are resistant.....	80
Tabela 39: Razporeditev izolatov s tremi najpogostejšimi rezistotipi po skupinah I do IV	81
Table 39: Allocation of isolates with the three most frequent resistotypes into groups I to IV	81
Tabela 40: Število in odstotek izolatov, odpornih proti posameznim antibiotikom, iz posameznih genetskih skupin iz ljudi	82
Table 40: Number and percentage of isolates from humans resistant to individual antibiotics from individual genetic groups.....	82
Tabela 41: Število in odstotek izolatov, odpornih proti posameznim antibiotikom, iz posameznih genetskih skupin iz živali	82
Table 41. Number and percentage of isolates from animals resistant to individual antibiotics from individual genetic groups.....	82
Tabela 42: Število in odstotek izolatov, odpornih proti posameznim antibiotikom, iz posameznih genetskih skupin iz živil.....	83
Table 42: Number and percentage of isolates from foodstuffs resistant to individual antibiotics from individual genetic groups.....	83
Tabela 43: Število in odstotek izolatov, odpornih proti posameznim antibiotikom, iz posameznih genetskih skupin iz kategorije drugo.....	83
Table 43: Number and percentage of isolates from the cathegory other resistant to individual antibiotics from individual genetic groups.....	83
Tabela 44: Primer epizootiološke analize izolatov s prašičje farme	84
Table: 44: Example of epizootiologic analysis of isolates from a pig farm	84

KAZALO SLIK

Slika 1: Piramida bremena bolezni (Burden of illness pyramid CDC FoodNet).....	26
Figure 1: The burden of illness pyramid (Burden of illness pyramid CDC FoodNet)	26
Slika 2: Primerjava kliničnih in epidemioloških mejnih vrednosti med CLSI, EUCAST in EUCAST ECOFF za določanje občutljivosti salmonel glede na način interpretacije (EFSA, 2014)	40
Figure 2: Comparison of clinical and epidemiological cut-off values between CLSI, EUCAST and EUCAST ECOFF for detection of sensitivity of salmonella regarding the way of interpretation (EFSA, 2014).....	40
Slika 3: Primer slike gela s prikazanimi fragmenti DNA po restrikciji z encimom <i>XbaI</i> ..	52
Figure 3: An example of a gel image showing fragments of DNA after restriction with the <i>XbaI</i> emzyme	52
Slika 4: Število izolatov po genetskih skupinah in po izvoru	57
Figure 4: The number of isolates regarding their genetic groups and origine	57
Slika 5: Delež odpornih izolatov proti posameznim antibiotikom	62
Figure 5: The percentage of resistant isolates to individual antibiotics.....	62
Slika 6: Delež v % odpornih izolatov proti posameznim antibiotikom iz kategorij človek, žival, živilo in drugo	64
Figure 6: Percentage of the isolates resistant to individual antibiotics from the cathegories human, animal, foodstuffs and other.....	64
Slika 7: Delež v % odpornih izolatov proti posameznim antibiotikom iz kategorije živali (klinika in monitoring ter druge in proizvodne živali).....	65
Figure 7: Percentage of isolates resistant to individual antibiotics from the cathegory animal (clinic and monitoring and other and production animals)	65
Slika 8: Delež odpornih izolatov proti posameznim antibiotikom iz prašičev in perutnine v %	66
Figure 8: Percentage of isolates resistant to individual antibiotics from pigs and poultry	66
Slika 9: Delež izolatov iz kategorij človek, žival, živilo in drugo po skupinah S, R in MDR	68
Figure 9: Percentage of the isolates from the cathegories human, animal, foodstuff and other regarding the groups S, R and MDR	68
Slika 10: Trendi odpornosti izolatov iz ljudi za obdobja I (2000–2004), II (2005–2008) in III (2009–2012).....	72
Figure 10: Trends of the resistance of the isolates from humans for periods I (2000–2004), II (2005–2008) and III (2009–2012)	72
Slika 11: Trendi odpornosti izolatov iz živil za obdobja I (2000–2004), II (2005–2008) in III (2009–2012).....	73
Figure 11: Trends of resistance of the isolates from foodstuffs for periods I (2000–2004), II (2005–2008) and III (2009–2012)	73

Slika 12: Trendi odpornosti izolatov iz prašičev za obdobja I (2000–2004), II (2005–2008) in III (2009–2012)	73
Figure 12: Trends of resistance of the isolates from pigs for periods I (2000–2004), II (2005–2008) and III (2009–2012)	73
Slika 13: Trendi odpornosti izolatov iz perutnine za obdobja I (2000–2004), II (2005–2008) in III (2009–2012)	74
Figure 13: Trends of resistance of the isolates from poultry for periods I (2000–2004), II (2005–2008) and III (2009–2012)	74
Slika 14: Dobro občutljivi izolati po genetskih skupinah in kategorijah (št. dobro občutljivih/št. vseh)	75
Figure 14: Sensitve isolates regarding the genetic groups and cathegories (No. of sensitive/No. of all)	75
Slika 15: Dobro občutljivi izolati po genetskih skupinah pri živalih (št. dobro občutljivih/št. vseh)	76
Figure 15: Sensitive isolates from animals regarding genetic groups (No. of sensitve/No. of all)	76
Slika 16: Dobro občutljivi izolati po genetskih skupinah iz živil (št. dobro občutljivih/št. vseh)	76
Figure 16: Sensitive isolates form foodstuffs regarding genetic gorups (No. of sensitive/No. of all)	76
Slika 17: Število MDR izolatov po genetskih skupinah in kategorijah (št. MDR izolatov/št. vseh izolatov)	77
Figure 17: Number of MDR isolates regarding genetic groups and cathegories (No. of MDR isolates/No. of all isolates)	77
Slika 18: Število MDR izolatov po genetskih skupinah pri živalih (št. MDR izolatov/št. vseh izolatov)	78
Figure 18: Number of MDR isolates from animals regarding genetic groups (No. of MDR isolates/No. of all isolates)	78
Slika 19: Število MDR izolatov po genetskih skupinah iz živil (št. MDR izolatov/št. vseh izolatov)	78
Figure 19: Number of MDR isolates from foodstuffs regarding genetic groups (No. of MDR isolates/No. of all isolates)	78
Slika 20: Dendrogram genotipov izolatov <i>S. Typhimurium</i>	131
Figure 20: Dendrogram of genotypes of <i>S. Typhimurium</i> isolates	131

SEZNAM OKRAJŠAV

A	ampicilin
Azi	azitromicin
C	kloramfenikol
CBP	klinične mejne vrednosti (angl. clinical breakpoints)
CDC	Center za nadzor in preprečevanje bolezni (angl. Centers for Disease Control and Prevention)
cfu	število kolonijskih enot (angl. colony forming units)
Cip	ciprofloxacin
CLSI	angl. Clinical & Laboratory Standards Institute
Col	kolistin
DNK	dezoksiribonukleinska kislina
ECDC	Evropski center za nadzor in preprečevanje bolezni (angl. European Center for Disease Prevention and Control)
ECOFFs	epidemiološke mejne vrednosti (angl. epidemiological cut-off values)
EFSA	Evropska agencija za varno hrano (angl. European Food Safety Authority)
EMA	Evropska agencija za zdravila (angl. European Medicines Agency)
EUCAST	angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EURL	Referenčni laboratorij Evropske unije (angl. European Union Reference Laboratory)
FAO	Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (angl. Food and Agriculture Organization of the United Nations)
Fot	cefotaksim
G	gentamicin
gen. sk.	genetska skupina
GS	genetska skupina
IMP	Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo
IVZ	Inštitut za varovanje zdravja (staro ime)
Maldi-Tof MS	(angl. Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry)
MDR	večkratna odpornost (angl. multi drug resistant)

Mero	meropenem
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MKGP	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
MLVA	multilokusna analiza spremenljivega števila tandemskih ponovitev (angl. Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis)
n	število
Na	nalidiksinska kislina
NARMS	Nacionalni monitoring za spremljanje odpornosti proti protimikrobnim zdravilom (angl. National Antimicrobial Resistance Monitoring System)
NCP	nacionalni kontrolni program (angl. national control program)
NGS	sekvenciranje naslednje generacije (angl. Next Generation Sequencing)
NIJZ	Nacionalni inštitut za javno zdravje
NRL	Nacionalni referenčni laboratorij (angl. National Reference Laboratory)
NTF	netifoidne salmonele
NVI	Nacionalni veterinarski inštitut
OIE	Svetovna organizacija za zdravje živali (franc. Office International des Epizooties)
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. Pulsed-field Gel Electrophoresis)
PN	PulseNet
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PMZ	protimikrobna zdravila
R	odporne bakterije proti antibiotikom (angl. resistant)
S	dobro občutljive bakterije na antibiotike (angl. susceptible)
SDV	sterilna destilirana voda
Su	sulfometoksazol
T	tetraciklin
Taz	ceftazidim
Tig	tigeciklin
Tm	trimetopirim
UVHVVR	Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin

VNTR	spremenljivo število tandemskih ponovitev (angl. Variable Number Tandem Repeat)
WGS	sekvenciranje celotnega genoma (angl. Whole Genome Sequencing)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)
ZZV	Zavod za zdravstveno varstvo (staro ime)

1 UVOD

Salmonella Typhimurium je gramnegativna, fakultativno anaerobna nesporogena paličasta bakterija, ki lahko povzroča obolenja pri ljudeh in živalih (Andlovic, 2002; Naglić in sod. 2005). V svetovnem merilu so okužbe s salmonelami zelo pomembne v javnem zdravstvu, veterinarski medicini in v proizvodnji živil. Salmoneloza je za kampilobakteriozo druga najpogostejsa zoonoza v Evropski uniji (EU). *S. Typhimurium* je med najpogostejsimi povzročitelji s hrano povezanih okužb pri ljudeh in visok delež sevov je odporen proti različnim protimikrobnim zdravilom (EFSA, 2012; EFSA, 2014; EFSA, 2017).

Obolenje običajno poteka neinvazivno, z značilnimi gastrointestinalnimi znaki in lahko izvenci samo po sebi. Posebno v rizičnih skupinah (dojenčki, majhni otroci, starostniki in imunsko oslabljeni pacienti) lahko pride do bakteriemije in/ali druge zunajčrevesne oblike okužbe. V takih primerih je poleg nadomeščanja izgube tekočine smiselna uporaba antibiotikov glede na rezultate testov občutljivosti (Chen in sod., 2011; Pui in sod., 2011; Antunes in sod., 2016; EFSA, 2014). Zato naraščanje števila večkratno odpornih izolatov salmonel po celi svetu zmanjšuje možnost uspešnega zdravljenja. Spremljanje incidence in odpornosti izolatov salmonel pri ljudeh in živalih v skupnih in usklajenih programih nadzora je zato nujno potrebno (Bender in sod., 2001; EFSA, 2017; Majowitz in sod., 2010; Long in sod., 2010; Kagambega in sod., 2013; Chen in sod., 2013).

Za uspešen nadzor nad salmonelami ter preprečevanje in obvladovanje večjih izbruhan je poleg nacionalne baze s podatki o genotipih PFGE (angl. Pulsed-field Gel Electrophoresis) nujna tudi širša baza, ki vključuje podatke več držav in v katero so vključeni medicinski in veterinarski laboratoriji. Ugotovljen genotip PFGE na lokalni ravni lahko predstavlja sporadičen primer ali pa je del izbruha. Za spremeljanje pojava in širjenja salmoneloz je potrebna primerjava genotipov PFGE na lokalni, nacionalni in mednarodni ravni (Long in sod., 2010).

Namen doktorskega dela je bil ugotoviti genetsko raznolikost in stanje odpornosti proti antibiotikom pri izolatih *S. Typhimurium* v Sloveniji iz različnih virov in v izbranem

časovnem obdobju. Rezultati so lahko podlaga za pripravo nacionalne baze genotipov PFGE *S. Typhimurium*, ki bo uporabna za humane in za veterinarske epidemiološke študije.

Postavili smo naslednje delovne hipoteze:

1. Sevi *S. Typhimurium* imajo večjo genetsko raznolikost kot *S. Enteritidis*.
2. Posamezni genotipi so stalno prisotni (v letih 2000–2012).
3. Sevi, izolirani iz različnih živali, se genetsko razlikujejo.
4. Sevi, izolirani iz živil, imajo širši spekter genotipov kot sevi, izolirani iz posameznih živalskih vrst.
5. Vzorec rezistence je vezan na določeno živalsko vrsto zaradi usmerjene uporabe antibiotikov.
6. Obseg rezistence se z leti povečuje.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 SALMONELLA

2.1.1 Taksonomija in osnovne značilnosti

Rod *Salmonella* spada v družino *Enterobacteriaceae*. Salmonele so gramnegativne paličaste, fakultativno anaerobne nesporogene bakterije, velikosti 0,7–1,5 x 2–5 µm. Večina je gibljivih s peritrihnimi flagelami, razen posameznih serovarov (npr. *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*), ki so negibljivi. Nekatere imajo kapsulo, fermentirajo glukozo, nimajo ureaze in ne izdelujejo indola (Gubina, 2002; Naglić, 2005).

V rodu *Salmonella* sta dve vrsti *Salmonella enterica* in *Salmonella bongori*. V vrsti *Salmonella enterica* je šest podvrst: *enterica* (subsp. I), *salamae* (subsp. II) *arizona* (subsp. IIIa), *diarizona* (subsp. IIIb), *houtenae* (subsp. IV) in *indica* (subsp. VI). Na osnovi somatskih antigenov po White-Kauffmann-Le Minor shemi (2007) so salmonele razvrščene v več kot 50 seroloških skupin. Serološke skupine v kombinaciji s flagelarnimi antigeni, ki so specifični za rod *Salmonella*, pa določajo več kot 2600 serovarov. Največ serovarov sodi v podvrsto *enterica*, kjer je večina serovarov, ki povzročajo obolenja pri ljudeh (> 99 %) (Grimont in Weill, 2007; Pui in sod., 2011; EFSA, 2012).

Salmonele so razširjene po vsem svetu. Za salmonelozo obolevajo sesalci, ptice in plazilci. Največkrat se izločajo s fecesom in kontaminirajo vodo, tla, hrano za ljudi (živila živalskega in rastlinskega izvora) ter krmo za živali. (Pui in sod., 2011)

2.1.2 Naravno okolje

Salmonele so zelo prilagodljive in dobro preživijo v okolju. Večina serovarov se razmnožuje pri temperaturi od 5 do 47 °C, z optimalno temperaturo od 35 do 37 °C. Tolerirajo pH 4 do 9, z optimumom 6,5 do 7,5. Živijo v okolju z visoko vodno aktivnostjo (a_w) med 0,99 in 0,94, preživijo pa tudi pri $a_w > 0,2$ (npr. v suhih izdelkih) (Pui in sod., 2011). Preživijo lahko več kot eno leto v praznem hlevu in dve leti v krmi za živali (Nygaard Jensen et al., 2006;

Habrun, 2014; Hugas in Beloil, 2015;). Za preživetje v ekstremnih pogojih, npr. v obratih predelovalne industrije, lahko proizvajajo biofilme. Salmonele lahko preživijo v zunanjem okolju zelo dolgo, več tednov ali mesecev, lahko pa jih širijo tudi vektorji, kot so muhe, podgane in ptiči. (Pui in sod., 2011). Salmonele se nahajajo povsod v naravi. Visoko stopnjo preživetja jim omogoča ciklični življenjski krog, ko prehajajo skozi gostitelja v okolje in spet v novega gostitelja. Salmonele lahko preživijo v muhi celo njeno življenjsko dobo, tj. do štiri tedne. Gnojenje polj s svežim kontaminiranim gnojem, ko je zunanja temperatura nad 20 °C, omogoči hitro širjenje salmonel med gostitelji. V neugodnih okoljih, kot so površine v predelovalni industriji ali v kopalcni in straniščni školjki, lahko salmonele s pomočjo adhezije in z nastankom biofilma preživijo tudi več tednov. Salmonele v gnuju in v vodnem okolju dobro preživijo. V zemlji lahko preživijo tudi eno leto in se celo razmnožujejo (Winfield in Groisman, 2003).

2.1.3 Patogenost

Po stopnji prilagoditve gostitelju, kar vpliva na patogenost za človeka in živali, delimo serovare v tri skupine. V prvi skupini so serovari, ki ne povzročajo zoonoz in so prilagojeni na človeka: *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* in *C*. Ponavadi povzročijo pri ljudeh hud septični tifusni sindrom in običajno niso patogeni za živali. V drugi skupini so serovari, ki so v glavnem prilagojeni na eno živalsko vrsto: *S. Gallinarum* (prilagojena na perutnino), *S. Abortusovis* (prilagojena na ovce), *S. Choleraesuis* (prilagojena na prašiče), *S. Dublin* (prilagojena na govedo) in drugi serovari. Nekateri od teh lahko povzročijo tudi sistemsko obliko salmoneloze pri ljudeh. V tretji skupini so serovari, ki niso prilagojeni na posamezne vrste in so razširjeni povsod (ubikvitarni) ter povzročajo večino zoonoz. Taka sta *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium*, ki povzročata običajno gastrointestinalne okužbe pri ljudeh in pri živalih (Naglič, 2005; Pui in sod. 2011; Chen in sod., 2013; Habrun, 2014).

Sekvenciranje genomov in primerjalna genomska analiza vrstno specifičnih in vrstno prilagojenih serovarov sta pokazali, da so spremembe in klonske raznolikosti v in med serovari posledica evolucijskega mehanizma prilagajanja salmonel na gostitelje. Nenehno prilaganje vodi tudi do povečane patogenosti in povečane odpornosti proti protimikrobnim zdravilom (Chen in sod., 2013).

2.2 SALMONELOZA

2.2.1 Pot okužbe, naselitev in epidemiologija

Najobičajnejša pot okužbe pri ljudeh je zaužitje kontaminirane hrane. Salmonele imajo mehanizme, ki jih ščitijo pred delovanjem organskih in anorganskih kislin (npr. solne kisline v želodcu). Mladi organizmi so bolj občutljivi za okužbo, verjetno zaradi višjega pH v želodcu, nestabilne črevesne mikrobiote in slabše razvitega imunskega sistema. Poleg gastroenteritisa salmonele lahko povzročijo septikemijo in se naselijo v možganskih ovojnicih in v gravidni maternici. Salmonele se lahko naselijo v sečnem mehurju, v mezenterialnih bezgavkah, pa tudi v žolčniku, kjer ostajajo različno dolgo (perzistirajo) in se trajno ali občasno izločajo z blatom. Pri latentnih klicenoscih lahko perzistirajo v bezgavkah in tonzilah. (Habrun, 2014).

Največkrat ugotovljeni vir salmonelnega gastroenteritisa pri ljudeh je zaužitje kontaminirane hrane, npr. premalo termično obdelano meso goveda, prašičev, perutnine, morski proizvodi in jajca. Velikokrat je lahko vzrok kontaminirano sveže sadje in zelenjava. (Winfield in Groisman, 2003; VURS, 2009; EFSA, 2012; EFSA, 2014, EFSA 2017). Hidroponično namakanje s kontaminirano vodo lahko omogoči salmonelam, da kolonizirajo notranjost zelenjave npr. paradižnika. Plazilci so naravni rezervoar salmonel, kot ljubiteljske živali pa so lahko vir okužb za lastnike. Divje ptice in žuželke so pomembni vektorji za hitro širjenje salmonel v okolje (Winfield in Groisman, 2003).

Viri okužbe s salmonelami so odvisni od načina življenja in prehranskih navad. V Afriki, kjer živijo ljudje in živali v neposredni bližini in je higienski nadzor nad proizvodnjo živil pomanjkljiv, predstavljamjo živali kot vir okužbe veliko tveganje za zdravje ljudi. V raziskavi v Burkini Faso so ugotovili visoko prevalenco salmonel pri domačih in divjih živalih. Od skupno 729 vzorcev fecesa je bilo 53 % vzorcev pozitivnih. Salmonela je bila dokazana pri 52 % vzorcev fecesa iz goveda, 16 % iz prašičev in 96 % iz ježev (Kagambega in sod., 2013).

V epidemiološki raziskavi v mehiških zveznih državah je bilo ugotovljeno, da so bile vir okužbe najpogosteje proizvodne živali. Kontaminacija mesa kot vzrok salmoneloze je bila

najvišja v državah z visoko stopnjo revščine. V industrijskih področjih je bila na prvem mestu kontaminacija pri predelavi mesa. V ostalih zveznih državah je bil najpogostejši razlog poleg kontaminiranih živil še prenos s človeka na človeka in z živali na človeka (Zaidi in sod., 2008).

Kronični klicenosci (še zlasti, če sodelujejo pri pripravi hrane) lahko okužijo potencialno veliko število posameznikov. Salmonele se izločajo s fecesom povprečno od 6 tednov do 3 mesecev, kar je odvisno od serovara, približno 0,1 % okuženih ljudi pa izloča salmonele tudi eno leto (Pui in sod., 2002).

2.2.2 Salmoneloza pri ljudeh

Ocenjeno je, da v svetu za salmoneloznim gastroenteritisom letno zboli 93,8 miljonov ljudi. Za posledicami jih umre 155.000. Število prijavljenih primerov salmoneloze je bistveno manjše od dejanskega števila obolelih. Pri 80,3 miljonov primerov je vzrok okužba s hrano. Salmonelne okužbe predstavljajo veliko breme tako v razvitih kot tudi v državah v razvoju (Majowitz in sod., 2010).

V svetovnem merilu so okužbe s salmonelami zelo pomembne v javnem zdravstvu. Salmoneloza je v EU za kampilobakteriozo druga najpogostejša zoonoza. Salmonelzo pri ljudeh povzročajo serotipi *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Pet najpogostejših serovarov v EU: Enteritidis, Typhimurium (vključno z monofazno varianto), Virchow, Infantis in Hadar. Seznam najpogostejših desetih serovarov v EU se z leti spreminja, na prvih dveh mestih pa vztrajata serovra Enteritidis in Typhimurium.

Inkubacijska doba je od 4 do 72 ur. Običajno poteka neinvazivno z značilnimi gastrointestinalnimi znaki (driska, vročina in abdominalna bolečina), kjer ni potrebno zdravljenje z antibiotiki. Infekcijska doza pri zdravih odraslih je od 10^6 do 10^8 cfu (število kolonijskih enot, angl. colony forming units).

V 5 do 10 odstotkih primerov lahko pride do resnejšega poteka: do bakteriemije in/ali druge zunajčervesne oblike okužbe (osteomielitis, meningitis) še zlasti pri rizičnih skupinah (dojenčki, majhni otroci, starostniki in imunsko oslabljeni pacienti), pri katerih je infekcijska doza lahko bistveno nižja (od 1 do 10 cfu). V takih primerih je poleg nadomeščanja izgube

tekočine smiselna uporaba antibiotikov glede na rezultate testov občutljivosti. Antibiotiki izbora so ampicilin, trimetoprim-sulfametoksazol, fluorokinoloni ali cefalosporini tretje generacije (Chen in sod., 2011; Pui in sod., 2011; EFSA, 2014; Antunes in sod., 2016).

Naraščanje števila večkratno odpornih izolatov (MDR, angl. multi drug resistant) salmonel po celem svetu zmanjšuje možnost uspešnega zdravljenja pri kritičnih skupinah (otroci, starostniki nosečnice in imunsko oslabljeni pacienti). Spremljanje incidence in odpornosti izolatov salmonel pri ljudeh in živalih v skupnih in usklajenih programih nadzora je zato nujno potrebno (Bender in sod., 2001; Long in sod., 2010; Majowitz in sod., 2010; Chen in sod., 2013; Kagambega in sod., 2013; EFSA, 2017)

2.2.3 Salmoneloza pri živalih

Salmoneloza je kužna bolezen, za katero lahko obolijo vse domače živali. Najbolj dovetne za okužbo so mlade, breje in živali v laktaciji. Salmonele (razen vrstno prilagojenih) pri živalih povzročajo pretežno subklinične okužbe in se zlahka razširijo v jati ali čredi. Živali lahko postanejo občasni ali trajni klicenosci (Hugas in sod., 2014).

Salmoneloza običajno poteka kot gastroenteritis, lahko pa pride do resnejšega poteka z akutno septikemijo, abortusi, artritisi in respiratornimi obolenji. Take živali so pomemben vir za širjenje okužbe med jatami in čredami ter hkrati predstavljajo vir kontaminacije živil in okužb ljudi (OIE, 2016) .

Pri prašičih je najbolj pogosto izoliran serovar *Typhimurium*. Prašiči se največkrat okužijo s kontaminirano krmo. Okužba se med prašiči širi po fekalno-oralni poti. Salmonele naselijo predvsem ileum, cekum in kolon, lahko pa po zaužitju vstopijo v tonzile, kjer lahko dolgo perzistirajo. Večina okužb s *S. Typhimurium* poteka subklinično in asimptomatsko in ima lahko za posledico dolgotrajno klicenoštvo, pri katerem se salmonele izločajo samo občasno. Izločanje salmonel pri klicenoscih zaradi stresa med transportom do klavnice kontaminira okolje in okuži zdrave prašiče (Boyen in sod., 2008). Pri prašičih je mogoča okužba tudi z aerosolom (Winfield in Groisman, 2003).

Okužba pri odraslem govedu poteka običajno asimptomatsko. Okužba s *S. Typhimurium* povzroča pri teletih podobne znake kot pri ljudeh. Primarno je to črevesna bolezen, kjer je smrtnost običajno povezana z dehidracijo in poškodbami črevesja. Pri teletih, mlajših od dveh mesecev, lahko okužba s *S. Typhimurium* povzroči bakteriemijo (Tsolis in sod., 1999).

Okužba z vrstno neprilagojenimi serovari poteka pri perutnini običajno asimptomatsko. Dovzetnost za okužbo se razlikuje po serovarjih in je odvisna predvsem od starosti živali (Cosby in sod., 2015).

2.3 NADZOR V EU IN SVETU

Pri ljudeh je okužba s *S. Enteritidis* najpogosteje povezana s kontaminiranimi jajci in perutninskim mesom, medtem ko so primeri *S. Typhimurium* večinoma povezani z uživanjem kontaminiranega mesa prašičev, perutnine in goveda (EFSA, 2014; Hugas in Beloil, 2014).

Po podatkih iz poročila EFSA (angl. European Food Safety Authority, EFSA) za leto 2010 je bil delež serovara *S. Typhimurium* v EU pri ljudeh 21,9 %, pri prašičih 31,5 %, pri govedu 26,3 %, pri perutnini pa 5,6 % (EFSA, 2012).

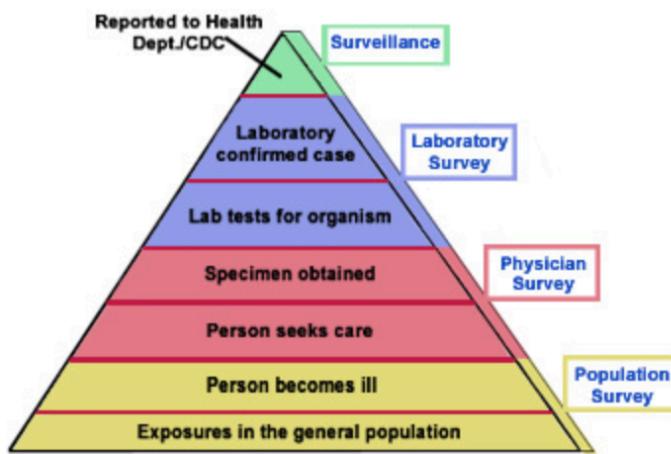
Na pomen serovara *S. Typhimurium* kažejo rezultati temeljnih študij prevalence salmonel v EU. Ugotovljena prisotnost *S. Typhimurium* v posameznih temeljnih študijah: pri brojlerjih (2005–2006) je bila ugotovljena v 3 % vseh izolatov in 4,6% vseh preiskovanih posestev v 15 državah; v bezgavkah klavnih prašičev (2006–2007) v 40 % vseh pozitivnih prašičev iz 25 držav in v brisih trupov klavnih prašičev na klavnicah v 49,4 % pozitivnih trupov iz 10 od 13 sodelujočih držav; pri nesnicah (2004–2005) 4,8 % vseh izolatov s 3,8 % posestev v 15 državah; pri puranih (2006–2007) v matičnih jatah 10 % izolatov s 15,4 % posestev iz dveh držav in pri pitovnih puranih 7,1 % z 9 % posestev iz 12 držav; pri razplodnih prašičih (2008) 17,9 % izolatov s 25,4 % posestev v 17 državah in pri pitovnih prašičih 13,7 % izolatov z 20,1 % posestev v 16 državah (EFSA, 2007 a; EFSA 2007 b; EFSA 2008 a; EFSA 2008 b; EFSA 2009).

Iz poročila EFSA za leto 2008 v EU je razviden visok delež rezistence *S. Typhimurium* v primerjavi rezistotipov med *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium* v odstotkih (EFSA, 2010).

Za nadzor nad salmonelami pri različnih proizvodnih vrstah domačih kokoši in puranov ter za omejitve tveganja kontaminacije proizvodov iz perutnine izvajajo države članice EU nacionalne kontrolne programe nadzora (NCP, angl. national control program) v skladu z zakonodajo EU (Regulation (EC) No 2160/2003). Redni nadzor se izvaja v izbranih populacijah perutnine, kot so plemenske jate vrste *Gallus gallus*, kokoši nesnice in pitovni piščanci ter purani za vzrejo in pitanje. Ciljni serovari so *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar*, *S. Infantis* in *S. Virchow* v matičnih jatah *Gallus gallus* ter *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium* v drugih perutninskih populacijah. *S. Typhimurium* vključuje tudi monofazno varianto *S. Typhimurium* 1,4, [5], 12: i: -. Nacionalni kontrolni programi nadzora držav članic EU temeljijo na enakih načelih in ciljih zmanjšanja prevalence. Vključujejo sistematično izvajanje preventivnih ukrepov v jatah, temeljiti nadzor nad statusom salmonele v jatah in predpisano ukrepanje ob ugotovitvi okužbe s salmonelo. Programi se uvajajo postopoma od leta 2005 (Hugas in Beloil, 2014). Uspešnost ukrepov potrjuje signifikantno zmanjšanje števila salmoneloz pri ljudeh v desetletnem obdobju. Vse države bi morale slediti skupnim ciljem in hkrati prilagajati svoje programe glede na pojavnost izoliranih serovarov pri ljudeh (Hugas in Beloil, 2014; Antunes in sod., 2016).

Piramida, ki predstavlja breme bolezni (CDC, 2015), je model za razumevanje poročanja o zoonozah, povezanih s hrano, in ilustrira korake, ki se morajo zgoditi pri epizodi bolezni v populaciji, da bo registrirana pri nadzoru (slika 1). Začne se z velikim številom v široki bazi piramide in se zmanjšuje proti vrhu:

- posamezniki iz populacije so izpostavljeni mikroorganizmu,
- od izpostavljenih se posamezniki okužijo in zbolijo,
- od obolelih posamezniki poiščejo zdravniško pomoč,
- na laboratorijsko analizo pošljejo vzorce samo od posameznih obolelih,
- laboratorij testira posamezne vzorce na ta patogen,
- laboratorij potrdi vzročni patogen samo v nekaterih od teh vzorcev,
- laboratorijsko potrjen primer se poroča lokalnemu in državnemu zdravstvenemu nazornemu sistemu.



The burden of illness pyramid is a model for understanding foodborne disease reporting.

Slika 1: Piramida bremena bolezni (Burden of illness pyramid CDC FoodNet)

Figure 1: The burden of illness pyramid (Burden of illness pyramid CDC FoodNet)

<https://www.cdc.gov/foodnet/surveillance.html>

V EU je nadzor pri izbruhih salmoneloze pri ljudeh obvezen. V državah članicah EU stalno spremljajo zoonoze in povzročitelje zoonoz (vključno s salmonelo) pri proizvodnih živalih in v živilih. Podatke o ljudeh, živalih in živilih združujeta in analizirata Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) in Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. European Center for Disease Prevention and Control, ECDC), ki vsako leto predstavita zbirno poročilo o trendih in virih zoonoz, povzročiteljih zoonoz in izbruhih, povzročenih s hrano, za EU (EFSA, 2012; EFSA, 2014; EFSA, 2017).

V prizadevanjih za zmanjšanje števila okužb so vzpostavljeni številni državni sistemi nadzora, kot npr. danski DANMAP (angl. Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Program), ameriški NARMS (angl. National Antimicrobial Resistance Monitoring System), GFN-WHO (angl. Global Foodborne Infections Network - World Health Organization) in drugi. V okviru teh programov spremljajo odpornost bakterij, uporabo antibiotikov pri živalih in distribucijo serovarov ter zbirajo podatke o odpornosti in trende njihovega širjenja (Chen in sod., 2013; Kuang in sod. 2015).

Vse države članice EU morajo na podlagi smernic, ki so jih pripravile FAO (angl. Food and Agriculture Organization of the United Nations), OIE (franc. Office International des Epizooties) in WHO postopoma pripraviti nacionalne strategije in ustrezne akcijske načrte za

smotrno rabo protimikrobnih zdravil in obvladovanje odpornosti v humani in veterinarski medicini.

Tudi države v razvoju bi potrebovale take sisteme, saj je pasivni nadzor nezadosten. Bolni ljudje namreč velikokrat ne pridejo do zdravnische pomoči, analizira se premajhno število vzorcev in zdravniki niso zavezani poročati v zdravstvene referenčne centre o primerih in smrtih. V štirih od 32 mehiških zveznih držav so leta 2002 poskusno vpeljali skupni sistem nadzora (IFCSs), ki je omogočil spremljanje in odkrivanje pomembnih tveganj za zdravje ljudi in je prispeval pomembne podatke v nacionalno bazo ter dokazal, da je to ekonomsko in tehnično izvedljivo (Zaidi in sod., 2008).

PulseNet je omrežje laboratorijev za javno zdravje, ki ga usklajujejo centri za nadzor in preprečevanje bolezni (CDC), v katerih z metodo PFGE tipizirajo bakterije, ki povzročajo s hrano povezane bolezni. Mreža omogoča primerjavo genotipov PFGE iz različnih geografskih območij. Državni in zasebni laboratoriji vnašajo rezultate (genotipe PFGE) v nacionalno bazo podatkov CDC PulseNet. Enaki genotipi PFGE, ugotovljeni na nacionalni ravni, lahko predstavljajo del velikega mednarodnega izbruha (Bender in sod., 2001; Long in sod. 2010). Enaki genotipi PFGE bakterije, izolirane pri najmanj dveh osebah, nakazujejo, da gre zelo verjetno za isti vir okužbe (Bender in sod., 2001, Berrett 2006).

Za uspešen nadzor nad salmonelami ter preprečevanje in obvladovanje večjih izbruhov je poleg nacionalne baze nujna tudi skupna baza, ki vključuje podatke več držav in v katero so vključeni medicinski in veterinarski laboratoriji. Ugotovljeni genotip PFGE na lokalni ravni lahko predstavlja sporadični primer ali pa je del izbruha. Za spremljanje pojava in širjenja salmoneloz je potrebna primerjava genotipov PFGE in genetskih skupin (npr. v ZDA lokalna, državna in nacionalna raven) (Long in sod. 2010).

V začetku devetdesetih let je bilo v ZDA odkritih in raziskanih vedno več izbruhov okužb s hrano, zato so razvili mrežo PulseNet. Tipizacijo so izvajali lokalni laboratoriji za javno zdravje v zveznih državah, kar je razbremenilo centralni laboratorij in omogočilo hitrejšo analizo izolatov, hkrati na lokalni in centralni ravni.

Namen mreže je določanje genotipov PFGE pri izolatih bakterij, ki povzročajo s hrano povezane okužbe, in zgodnje prepoznavanje izbruhan (ločevanje med sporadičnimi primeri in povezanimi primeri – izbruhi), pomoč pri prepoznavi in potrditvi vira okužbe pri izbruhih ter učinkovita povezava med javnozdravstvenimi laboratoriji. PulseNet ima tako ključno vlogo pri nadzoru in preiskavah izbruhan bolezni, povezanih s hrano. Z identifikacijo bakterijskih izolatov in z znanim genotipom PFGE lahko strokovnjaki v nekaj dneh povežejo primere z viri, tudi če so geografsko oddaljeni.

V mednarodno mrežo Pulse Net (angl. PulseNet International) je vključenih 88 držav iz sedmih regij: ZDA, Latinska Amerika s Karibi, Azija s Pacifikom, Afrika, Bližnji vzhod in Evropa.

PulseNet (PN) Europe je ustanovila FP (Framework programme – 6. okvirni program EU) mreža odličnosti Med-Vet-Net, virtualnega evropskega centra za zoonoze (www.medvetnet.org). Glavni cilj je bil vzpostaviti sistem podatkovnih baz za odkrivanje in preiskovanje izbruhan, ki jih v EU povzročajo salmonele, verotoksigena *Escherichia coli* (VTEC) in *Listeria monocytogenes*. V PN mrežo je vključenih 32 evropskih držav z zdravstvenimi, veterinarskimi in živilskimi laboratoriji. Partnerji imajo neposreden dostop do osrednjih baz podatkov PN Europe, ki jim omogoča primerjavo na nacionalni, evropski in mednarodni ravni. Zelo pomembna je kakovost genotipov PFGE, ki bodo naloženi v osrednjo zbirkovo podatkov, in enotno poimenovanje. Določenih je šest kuratorjev PN Europe, ki skrbijo za centralno zbirkovo podatkov, poimenovanje in potrditev genotipov PFGE, ki jih predložijo partnerji (PulseNet Europe, 2014).

2.4 NADZOR V SLOVENIJI

Med zoonozami pri ljudeh je v Sloveniji salmoneloz od leta 2009 na drugem mestu. Največje število ugotovljenih primerov pri ljudeh je bilo v letu 2003, ko smo bili po stopnji incidence (169/100.000) na prvem mestu v EU. Od leta 2004, ko so bili postopoma uvedeni nacionalni programi za zmanjšanje prevalence v jatah perutnine, se je število salmoneloz pri ljudeh zmanjšalo za več kot 90 % (s 4.005 v letu 2004 na 393 v letu 2012). Število se je zmanjšalo tudi na račun spremembe pravilnika o pregledu delavcev v proizvodnji in prometu živil (avgust 2003), ko je bistveno upadlo število laboratorijskih preiskav blata (NIJZ, 2006). Medtem ko se je v Sloveniji od leta 2003 število primerov s serovarom Enteritidis zmanjšalo

za 90 % (s 3.812 v letu 2003 na 184 v letu 2012 in 151 v letu 2015), ostaja število primerov s serovarom Typhimurium približno enako (NIJZ, 2015; NIJZ, 2017).

V humani medicini se beležijo od leta 2004 dalje samo klinični, laboratorijsko potrjeni primeri, zato je dejansko število zanesljivo večje. Število salmoneloz iz vzorcev v pasivnem monitoringu namreč vedno predstavlja samo 'vrh ledene gore'.

V veterinarski medicini v laboratorijih Nacionalnega veterinarskega inštituta (NVI) pri živalih odkrijemo okužbo s salmonelami največkrat v monitoringu, tj. pri živalih brez kliničnih znakov. Na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete (IMP VF) smo v preiskovanem obdobju pridobili izolate iz živali iz obveznih vzorčenj v okviru temeljnih študij (pri plemenskih prašičih, prašičih pitancih, puranih in nesnicah) in iz vzorcev, odvzetih po pravilnikih o nadzoru salmonel pri perutnini, iz živil v okviru monitoringa zoonoz in notranjega nadzora pri nosilcih dejavnosti ter samo izjemoma v okviru epidemiološkega poizvedovanja (po izbruhih pri ljudeh).

Število vzorcev za bakteriološko/laboratorijsko ugotavljanje vzroka bolezni ali pogina pri proizvodnih živalih, razen pri perutnini, se v zadnjih 15 letih stalno zmanjšuje. Pri prašičih smo do leta 2000 redno prejemali vzorce z naših farm za kontrolo vzroka pogina. Razlogi za upad števila vzorcev so verjetno zmanjševanje stroškov proizvodnje in mogoče posledice zaradi ukrepov po veljavnih pravilnikih. Pri govedu in prašičih lahko tako v zadnjih letih odkrijemo le posamezne primere, največkrat pri sistematičnem nadzoru pogina.

Na Veterinarskem zavodu Slovenije je bilo od leta 1961 do leta 1970 preiskanih na salmonele kar 20.093 vzorcev iz živali in krmil, od katerih je bilo povprečno 14,3 % pozitivnih na salmonele. *S. Typhimurium* je bila po pogostosti na drugem mestu z 235 izolati in *S. Enteritidis* na petem mestu s 101 izolatom. Pri teletih so v treh izbruhih izolirali *S. Typhimurium*. V letih 1979 do 1982 je bilo ugotovljeno povečano število *S. Typhimurium* (n = 147) kot posledica enzootije salmoneloze pri teletih in akcije preiskav golobov, večje pa je bilo tudi število *S. Typhimurium* pri perutnini in v krmilih. V dvanajstletnem obdobju (1979 do 1990) je bila *S. Typhimurium* izoliarna iz 524 vzorcev (43 izolatov iz krmil, 302 iz živali, 172 iz živil in 8 iz drugih vzorcev) (Bole-Hribovšek, 1993).

Od drugih živalskih vrst so občasno na prisotnost salmonel pregledane živali iz živalskega vrta, ki so namenjene za učne namene, ter plazilci. V okviru projektov smo pregledali tudi določeno število mestnih golobov.

V Sloveniji se redno izvaja aktivni monitoring pri perutnini, pri drugih živalih pa le občasno. V tabeli 1 so podatki o pregledanih in pozitivnih vzorcih pri živalih od leta 2008 do 2016. Vir podatkov so letna poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji, ki jih izdata MKGP (Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano) in UVHVVR (Uprava RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin) in so objavljena na spletni strani UVHVVR (UVHVVR, 2017).

Tabela 1: Podatki o številu pregledanih in pozitivnih živalih v Sloveniji iz obdobja 2007 do 2016

Table 1: Data on the number of checked and positive animals in Slovenia in the period 2007 to 2016

vrsta živali	obdobje	testirane jate / gospodarstva / živali št. vzorcev	pozitivni vzorci:			
			Salmonella sp.	S.Typhimurium	št.	%
matične jate ^a	2007-2016	2470	27	1,1	3	0,1
nesnice ^a	2008-2016	2926	109	3,7	2	0,1
brojlerji ^a	2009-2016	18799	762	4,1	7	0,0
purani ^a	2010-2016	919	27	2,9	0	0,0
prašiči (bezgavke) ^c	2006-2007	443	27	6,1	3	0,7
prašiči (plemenski) ^b	2008	114	10	8,8	0	0,0
prašiči ^c	2010	384	21	5,5	6	1,6
prašiči ^c	2015	100	11	11,0	7	7,0
					2 ^d	2,0
govedo ^c	2008	386	1	0,26	0	0
drobnica ^c	2009	103	1	0,97	0	0

^a testirane jate, ^b testirana gospodarstva, ^c testirane živali, ^d monofazna ST

Pri perutnini je po uvedbi nacionalnih kontrolnih programov signifikantno padlo število izolatov *S. Typhimurium* in *S. Enteritidis* pri matičnih jatah, nesnicah in brojlerjih, medtem ko pri puranah ni signifikantne razlike. Imamo dosežen nacionalni cilj, tj. manj kot 1 % pozitivnih jat na *S. Typhimurium* in *S. Enteritidis*. Pri matičnih jatah od leta 2012 nismo zabeležili pozitivne jate na *S. Typhimurium* (v letu 2008 je bila pozitivna ena jata, v letu 2011 pa dve jati). Pri nesnicah smo imeli dve pozitivni jati na *S. Typhimurium* v letu 2014. Pri

prašičih je povprečni delež pozitivnih na *S. Typhimurium* manj kot 2 %. Pri govedu se od leta 2010 izvaja samo pasivni monitoring.

2.5 METODE DOLOČANJA IN TIPIZACIJE

2.5.1 Izolacija

Salmonele rastejo na enostavnih tekočih in trdnih gojiščih. V tipični obliki in barvi zrastejo na selektivnih in kromogenih gojiščih. Pri kliničnih primerih zrastejo direktno na neselektivnih gojiščih (npr. krvni agar in agar po Drigalskem). Kadar preiskujemo vzorce na prisotnost salmonel pri zdravih živalih (npr. monitoring), poteka preiskava s predobogativijo in selektivno obogativijo na bujonih ter prepoznavo tipičnih kolonij na selektivnih trdnih gojiščih (npr. XLD in Rambach agar). Postopki za izolacijo salmonel iz živil, krmil ter vzorcev iz okolja primarne proizvodnje so standardizirani (ISO 6579-1:2017).

Tipične kolonije determiniramo. Potrjujemo jih biokemijsko, molekularno ali pa z masno spektrometrijo (Maldi-Tof MS, angl. Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry).

2.5.2 Tipizacijske metode

Namen in cilj epidemiološke raziskave je pridobivanje informacij o okužbi (izvor, potek, prenos in dejavniki), da bi razumeli, preprečevali in obvladali širjenje povzročiteljev nalezljive bolezni pri živalih in ljudeh. Pri epidemioloških raziskavah so pomembne tipizacijske metode, ki so nam v pomoč pri odkrivanju virov, poti in obsega širjenja povzročiteljev. Za identifikacijo in tipizacijo izolatov salmonel je na voljo več fenotipskih in molekularnih metod. V nadaljnem besedilu navajamo samo nekatere najbolj pogosto uporabljene metode.

2.5.2.1 Fenotipske tipizacijske metode

Serotipizacija je najbolj uporabljena metoda za tipizacijo salmonel. Salmonele razvršča na osnovi antigenskih razlik v lipopolisaharidu (antigen O), flagelinu (antigena H1 in H2) in

kapsuli (antigen Vi). Na podlagi prisotnosti teh antigenov ima vsak serovar svojo značilno antigensko formulo. Glede na prisotnost antigenov H poznamo bifazne, monofazne in negibljive salmonele. Antigenska formula za serovar Typhimurium je 1,4,[5],12:i:1,2. Monofazna varianta *S. Typhimurium* nima druge flagelarne faze 1,4,[5],12:i:-.

Klasifikacija serovarov salmonel po shemi White-Kauffman-Le Minor (Grimont in Weill 2007) je v svetu najbolj uveljavljena. Relativno malo od opisanih več kot 2.500 serovarov je povezanih s salmonelozo pri ljudeh in domačih živalih. Serotipizacija pri najbolj razširjenih serovarjih (*S. Typhimurium* in *S. Enteritidis*) za epidemiološke analize zato ne zadostuje, ampak je potrebna nadaljnja subtipizacija. Pomankljivosti metode, ki je sicer široko uporabljena, so: dragi antiserumi (ki morajo biti kakovostni), dolgotrajen postopek in potreba po dobro usposobljenem osebju. Vsi sevi zato niso tipizirani. Klasična serotipizacija ostaja pomembno izhodišče za karakterizacijo izolatov pri različnih študijah in pri epidemioloških preiskavah (Barco in sod., 2013).

Fagotipizacija je tradicionalna metoda, ki temelji na različni občutljivosti sevov na bakteriofage. Z izbranim nizom bakteriofagov se izolatu določi fagotip.

Za nekatere pomembne serovare (tudi *S. Typhimurium*) so razvili sheme za tipizacijo. Metoda je poceni in ne zahteva posebne opreme, izvede pa jo lahko samo omejeno število referenčnih laboratorijskih fagi. Tipiziranje zahteva veliko izkušenj pri interpretaciji (Barco in sod., 2013).

Rezistotipizacija je metoda, s katero določamo pri bakterijskem izolatu odpornost proti antibiotikom. Metoda je poceni in ne zahteva posebne opreme in reagentov. Razviti so standardizirani protokoli za izvajanje analize in interpretacijo. Pri bakterijah so nekatere determinante odpornosti stabilne (npr. mutacija genov, ki kodirajo odpornost proti florokinolonom), druge pa se zelo lahko prenašajo med bakterijami s plazmidi, integroni in genomskimi otoki. Iste fenotipske vzorce odpornosti lahko kodirajo različni geni. Nekromosomski geni za odpornost se zlahka pridobijo ali izgubijo (lahko tudi ob pasaži izolatov v laboratoriju), zato je takva tipizacija nezanesljiva. Ta nestabilnost zmanjšuje pomembnost te metode v epidemioloških raziskavah (Barco in sod., 2013).

2.5.2.2 Molekularne metode

Pri epidemiološki analizi izbruha ni dovolj določiti serovar, lokacijo in datum okužbe, ampak je nujno potrebna molekularna subtipizacija in določitev vzorca odpornosti, da lahko razlikujemo med sporadičnimi in povezanimi primeri (izbruhi) ter odkrivamo vire okužb. Pri serovarih, ki so na določenem področju pomembni za zdravje ljudi, kot je npr. *S. Typhimurium*, je potrebna rutinska molekularna subtipizacija, kar pomeni, da je izolate treba zbirati oz. pošiljati v za to usposobljeni laboratorij (Bender in sod., 2001). Netifoidne salmoneloze se običajno širijo klonalno. Mehanizmi za nastanek, razširjanje in poznejši upad novih klonov salmonel so neznani. Verjetno so razlog genetski dejavniki, ki omogočajo učinkovitejše razširjanje v določenih gostiteljih in okoljih. Posamezni kloni se lahko zadržujejo več let samo pri eni vrsti gostitelja, preden se razširijo na druge. Primerjava izolatov pri ljudeh in živalih z rezistotipi in genotipi PFGE omogoča spremljanje in odkrivanje virov okužbe (Davis in sod., 2007). Z molekularnimi metodami analiziramo spremembe na nivoju bakterijskega genoma. Z njimi potrjujemo dokazane povezave s fenotipskimi metodami oziroma odkrivamo povezave med posameznimi izolati (Van Belkum in sod., 2007). Enak genotip nakazuje na prenos okužbe. Dokaz za prenos okužbe je, ko s tipizacijo skupine izolatov laboratorijsko dokažemo, da so epidemiološko povezani izolati genetsko sorodni (Tenover in sod., 1995). Kriteriji za vrednotenje molekularnih metod so sposobnost razlikovanja, ponovljivost in fleksibilnost (uporabnost za različne bakterijske vrste).

Razvite so številne molekularne metode subtipizacije, ki na osnovi DNK (dezoksiribonukleinska kislina) ugotavljajo sorodstvene odnose med izolati salmonel. Metode so razvršcene v tri glavne skupine: določanje vzorcev DNK (fingerprinti), sekvenciranje DNK in metode, ki temeljijo na hibridizaciji DNK (microarray metode). Metode v prvi skupini razvrščajo se več glede na razlike v velikosti pasov DNK (fragmentov) po cepitvi DNK z restrikcijskimi encimi. Metode v drugi skupini določajo nukleotidno zaporedje ciljnih regij v genomu. V tretjo skupino sodijo metode, ki temeljijo na ujemaju komplementarnih zaporedij v genomu.

Najpogostejši metodi, ki se uporabljajo v laboratorijih EU za subtipizacijo sevov salmonel, sta gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (PFGE) in multilokusna analiza

spremenljivega števila tandemskih ponovitev (angl. multiple-locus-variable-number tandem repeat analysis, MLVA) (Barco in sod., 2013). V zadnjem času pa se vedno bolj uporablja sekvenciranje celotnih genomov (ang. whole genome sequencing, WGS), ki je trenutno najsodobnejša metoda tipizacije mikrobov (ECDC, EFSA, 2017).

PFGE je široko uporabljen genotipizacijska metoda, zato ima oznako 'zlati standard'. PFGE je standardna metoda genotipizacije, ki ob harmonizaciji med laboratoriji omogoča primerjavo izolatov na lokalni, nacionalni in mednarodni ravni. Velja za robustno in zanesljivo metodo z dobro ponovljivostjo in je primerna skoraj za vse serovare salmonel (Lienneman in sod., 2015, Cai in sod., 2016; van Belkum in sod., 2007). Temelji na analizi celotne genomske DNA po razrezu z restriktijskimi encimi. Z elektroforezo ločujemo zelo velike fragmente DNA v električnem polju s periodičnim spremicanjem smeri električnega toka. Rezultate genotipizacije lahko obdelujemo z različnimi programi (npr. BioNumerics (Applied Maths, Belgija), Finferprinting II (BioRad, ZDA)), ki omogočajo medsebojno primerjavo genotipov, izdelavo dendrogramov in izmenjavo rezultatov med laboratoriji. Računalniški program izračuna stopnjo podobnosti in izdela dendrogram z različnimi algoritmi.

Mreža PulseNet ima opredeljene protokole PFGE, ki so v rutinski uporabi v nadzornih laboratorijih po celi svetu. Genotipi PFGE so objavljeni v spletnih bazah za globalno primerjavo. Metoda je visoko standardizirana. Je komplikirana, delovno intenzivna ter zahteva dobro tehnično znanje. PFGE je bila priznana kot ena najbolj diskriminatornih tehnik subtipizacije in jo uspešno uporabljajo v številnih epidemioloških analizah. Metoda pa ni dovolj diskriminatorna za genetsko zelo sorodne seve, kot je npr. *S. Enteritidis*. Kriteriji za interpretacijo so bili postavljeni za analize bolnišničnih izbruhov in ne ustrezajo popolnoma, kadar želimo primerjati genotipe iz nepovezanih izolatov v daljšem časovnem obdobju in iz različnih geografskih območij, zato bi bilo treba pripraviti nove smernice za vrednotenje (Barco 2013).

V številnih študijah avtorji z genotipizacijsko metodo PFGE primerjajo izolate in ugotavljajo sorodnost. Primerjava rezultatov med avtorji je težka, ker ocena rezultatov ni harmonizirana. Glede na število in izvor izolatov avtorji s pomočjo različnih računalniških programov določajo obseg posamezne genetske skupine. Posamezne genotipe PFGE bo mogoče

primerjati, ko bo vzpostavljena skupna mreža na ravni EU. Referenčni laboratorijski EU (angl. European Union Reference Laboratory, EURL) organizirajo za nacionalne referenčne laboratorijske (angl. National Reference Laboratory, NRL) medlaboratorijske primerjave (za salmonele od leta 2013) in izobraževanja za uskladitev izvedbe metode in interpretacijo rezultatov.

MLVA je genotipizacijska metoda PCR (angl. polymerase chain reaction), ki temelji na hkratni analizi večjega števila lokusov s spremenljivim številom tandemskih ponovitev (VNTR). Shema MLVA ni enako diskriminatorna za vse serovare. V Evropi sta standardizirana protokola za *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium*. Metoda je hitra in enostavna, slabost pa je morda prehitra evolucija tandemskih ponovitev. Lahko je zelo uporabna pri preiskavah izbruhov in tudi v dolgoročnih študijah (Barco in sod., 2013).

WGS je ena od aplikacij sekvenciranja naslednje generacije (angl. Next Generation Sequencing, NGS). Omogoča nam primerjavo celotnih mikrobnih genomov ali njihovih delov. Zaradi nižjih stroškov in primerljive hitrosti s klasičnimi subtipizacijskimi metodami je WGS vse bolj prisotna v rutinski tipizaciji mikroorganizmov. Pri salmonelah se je metoda izkazala kot zelo uporabna pri razreševanju izbruhov in bi lahko nadomestila uveljavljene metode za subtipizacijo salmonel, kot so PFGE, MLVA in ribotipizacija (Leekitcharoenphon in sod., 2014; Taylor in sod., 2015).

2.6 ODPORNOST SALMONEL PROTI ANTIBIOTIKOM

Od leta 1990 se je zaradi razvoja novih antibiotikov uporaba le-teh v humani in veterinarski medicini močno povečala. To je sicer olajšalo zdravljenje različnih bakterijskih okužb, vendar je hkrati dolgotrajna in pogosto nekritična raba privedla do selekcijskega pritiska na povzročitelje in posledično do razvoja pridobljene odpornosti bakterij proti različnim antibiotikom. Protimikrobna zdravila za zdravljenje salmoneloz in za preverjanje odpornosti salmonel so antibiotiki, zato v nadalnjem besedilu uporabljam samo izraz antibiotiki. Prilagoditve na antibiotike ustvarjajo tako patogene bakterije kakor tudi bakterije endogene mikrobiote. Oporne komenzalne bakterije proizvodnih živali lahko kontaminirajo mesne izdelke in tako pridejo v črevesni trakt človeka. Gene odpornosti proti antibiotikom, ki so ali

so bili uporabljeni samo pri živalih, so tako ugotovili ne le pri bakterijah iz živali, temveč tudi v komenzalni mikrobioti pri ljudeh. Determinante odpornosti se lahko prenašajo tudi med nesorodnimi bakterijami (npr. *Bacteroides* na eni strani, ter *Salmonella* in *Escherichia* na drugi strani). Odporne bakterije se lahko širijo klonalno ali s prenosom genov za odpornost med različnimi bakterijami (Chen in sod., 2013; Michael in Schwarz, 2016).

Barza (2002) opisuje pet potencialnih škodljivih učinkov protimikrobnih zdravil (PMZ) na zdravje:

- antibiotiki ne delujejo samo ciljno na enega bakterijskega povzročitelja, temveč zmanjšujejo tudi za ta antibiotik občutljivo normalno mikrobioto, ki ima v zdravem organizmu zaščitni učinek. Ko pride v tako spremenjeno okolje odporna patogena bakterija, se lahko razmnoži in povzroči okužbo;
- odpornost in virulenza sta različni lastnosti, ki pa sta pri nekaterih izolatih lahko prisotni hkrati, tako je bolj odporna bakterija lahko tudi bolj virulentna;
- zdravljenje postane oteženo z izbiro zdravila, proti kateremu je patogena bakterija odporna, ali pa če ima to zdravilo stranske učinke;
- patogene bakterije, ki so pridobile odpornost pri živalih, se lahko prenesejo po prehranski verigi na ljudi;
- komenzalna mikrobiota pri živalih lahko pridobi odpornost proti PMZ in to prenese skozi prehransko verigo na komenzalne in patogene bakterije pri ljudeh (Barza, 2002).

Antibiotiki, ki se uporabljajo kot promotorji oziroma pospeševalci rasti (za povečanje produktivnosti in za ohranjanje zdravja klavnih živali) so v EU že dolgo prepovedani. Prepovedana je tudi prodaja mesa, ki vsebuje ostanke antibiotikov. V ZDA in številnih drugih državah pa je še vedno dovoljena uporaba antibiotikov v živinoreji kot dodatek krmi.

Dokazano je, da ponavljajoča izpostavljenost nizkim odmerkom antibiotikov ustvarja idealne pogoje za nastanek in širjenje bakterij, odpornih proti antibiotikom. V državah, kjer so zaradi povečane potrebe po živilih živalskega izvora pospešeno zamenjali ekstenzivno proizvodnjo za intenzivno, se antibiotiki kot biostimulatorji uporabljajo rutinsko. To predstavlja veliko tveganje za dodatno povečanje odpornosti bakterij proti antibiotikom. Predvideva se, da se bo tako poraba protimikrobnih sredstev do leta 2030 povečala za 67 % in skoraj podvojila v

Braziliji, Rusiji, Indiji, na Kitajskem in v Južni Afriki. Te ugotovitve zahtevajo pobude za ohranjanje učinkovitosti antibiotikov. Glede na splošno povečano odpornost izolatov proti antibiotikom je za omejitev prekomerne uporabe in zlorabe protimikrobnih sredstev v proizvodnji živil živalskega izvora nujno usklajeno globalno delovanje v vseh državah in uvedba ukrepov, ki bi morali vključevati: (i) izvajanje javno financirane mednarodne nadzorne mreže za uporabo antibiotikov pri proizvodnih živalih v državah, ki hitro uvajajo intenzivno proizvodnjo; (ii) sodelovanje s proizvajalci veterinarskih zdravil in proizvajalci živalske krme za navzkrižno potrditev ocen potrošnje in podatkov o prodaji; (iii) izvajanje mednarodne agende za uskladitev regulativnih okvirov med državami in (iv) dokončno opuščanje protimikrobnih zdravil za spodbujanje rasti na podlagi uspešnih izkušenj v EU in novih bioloških in ekonomskih dokazov, ki izpodbijajo domnevne koristi uporabe protimikrobnih sredstev pri vzreji proizvodnih živali (Van Boeckel in sod., 2015).

Zoonotske salmonele so skozi leta pridobile različne mehanizme protimikrobne odpornosti. Geni z zapisi za odpornost so na plazmidih, transpozonih, genskih kasetah ali na otokih patogenosti SGI1 in SGI2. Pri primerjavi odpornosti in trendov je pomembno razumeti, da obstajajo specifične razlike med državami in med serovari (Michael in Schwarz, 2016).

Pojav in razširjanje večkratno odpornih izolatov netifoidnih (NTF) salmonel je postal globalni problem in zato predstavlja resno grožnjo javnemu zdravju ter zahteva stalni nadzor (Chen in sod., 2013; Michael in Schwarz, 2016; EFSA, 2017).

Podatki iz nadzora nad salmonelami kažejo na očitno povečanje splošne odpornosti proti antibiotikom med salmonelami z 20 do 30 % v začetku devetdesetih let do 70 % v nekaterih državah na prelomu stoletja (Chen in sod., 2013).

Pri podatkih o odpornosti *Salmonelle* sp. v poročilih EFSA na razlike med leti močno vpliva izbor serovarov, ki so vključeni, saj posamezni serovari (*S. Typhimurium* in *S. Derby*) izkazujejo večjo odpornost proti določenim antibiotikom in izražajo večkratno odpornost v večji meri kot drugi. *S. Enteritidis* je relativno dobro občutljiva na protimikrobna zdravila. Visoko stopnjo odpornosti proti antibiotikom ugotavljajo pri *S. Typhimurium* in njeni monofazni varianti (Chen in sod., 2013; EFSA, 2017).

Ugotovljena je zelo visoka do ekstremno visoka odpornost proti tradicionalnim antibiotikom (ampicilin, kloramfenikol in sulfonamidi), ki predstavljajo prvo izbiro pri zdravljenju (EFSA, 2012; EFSA, 2014; EFSA, 2017). Posebno zaskrbljujoča je odpornost proti antibiotikom za rezervno (kritično) rabo v humani medicini (fluorokinoloni, cefalosporini tretje generacije in karbapenemi).

Fluorokinoloni predstavljaljo izbirno zdravilo, ko pride pri odraslih do invazivnih okužb s salmonelami (Threlfall, 2002; EFSA, 2012; Chen in sod., 2013; Michael in Schwarz, 2016). Vsi fluorokinoloni v veterinarski in v humani medicini imajo enak mehanizem delovanja (inhibicija replikacije DNA). Ugotovljena odpornost proti enemu pomeni največkrat odpornost proti vsem fluorokinolonom.

Posebno problem je naraščanje odpornosti proti cefalosporinom tretje generacije. Stopnja odpornosti je odvisna od prisotnosti različnih beta laktamaz. Odpornost običajno pripisujejo plazmidno kodiranim genom, ki se lahko prenašajo med enterobakterijami. Pri bakterijah z razširjenim spektrom beta laktamaz (angl. extended specter beta lactamase, ESBL) je zdravljenje močno oteženo.

Za bolnike z invazivnimi okužbami s salmonelo, ki je odporna tako proti fluorokinolonom kot cefalosporinom tretje generacije, so lahko karbapenemi zadnja izbira med antibiotiki. Leta 2010 je bil potrjen prvi primer pacienta z okužbo sečil z izolatom *S. Typhimurium*, ki je razvil odpornost proti karbapenemom (Chen in sod. 2013).

Pri izolatih *S. Typhimurium* iz proizvodnih živali, zlasti prašičev in tudi goveda, je ugotovljena velika odpornost proti antibiotikom. Intenzivna proizvodnja, konkurenčnost na trgu in nižanje cene proizvodnje na račun dobrih razmer bivanja in kakovostne krme so velikokrat razlog za slabšo odpornost živali in posledično večjo obolenost, slabše proizvodne rezultate in večjo porabo antibiotikov. Temu nujno sledi večja odpornost komenzalnih in patogenih bakterij v organizmu živali.

2.6.1 Metode za določanje odpornosti

Za določanje odpornosti proti antibiotikom je opisanih več standardiziranih metod, med katerimi se najbolj pogosto uporablja klasična disk difuzijska in mikrodilucijska metoda.

Metoda difuzije antibiotika v agarju z diskami po Kirby-Bauerju (**disk difuziska metoda – DD**), je standardna metoda, ki jo uporablja večina evropskih držav in vsi medicinski laboratoriji v Sloveniji. Metodo redno posodablja CLSI (angl. Clinical & Laboratory Standards Institute) in EUCAST (angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Metoda je enostavna in se lahko uporablja v večini standardno opremljenih laboratorijev, vendar pa je manj primerna za epidemiološke študije (EUCAST, 2017).

Za določenje **minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)** je na voljo več metod, kot so agar dilucijska metoda, E-test in mikrodilucijska metoda. Najbolj uporabljana je mikrodilucijska metoda, za katero so voljo številne različne komercialno pripravljene mikrotitrskie plošče. Na plošče z različno koncentracijo antibiotikov nanesemo v posebnem bujonu suspendirano bakterijsko kulturo, inkubiramo v predpisanih pogojih in odčitamo rezultate. MIK je najmanjša koncentracija antibiotika, ki zavre rast bakterije. Rezultate interpretiramo po smernicah, določenih s standardi (npr. EUCAST), in poročamo kot občutljivost (angl. susceptible, S) ali odpornost (angl. resistant, R).

2.6.2 Interpretacija rezulatov ugotavljanja odpornosti proti antibiotikom

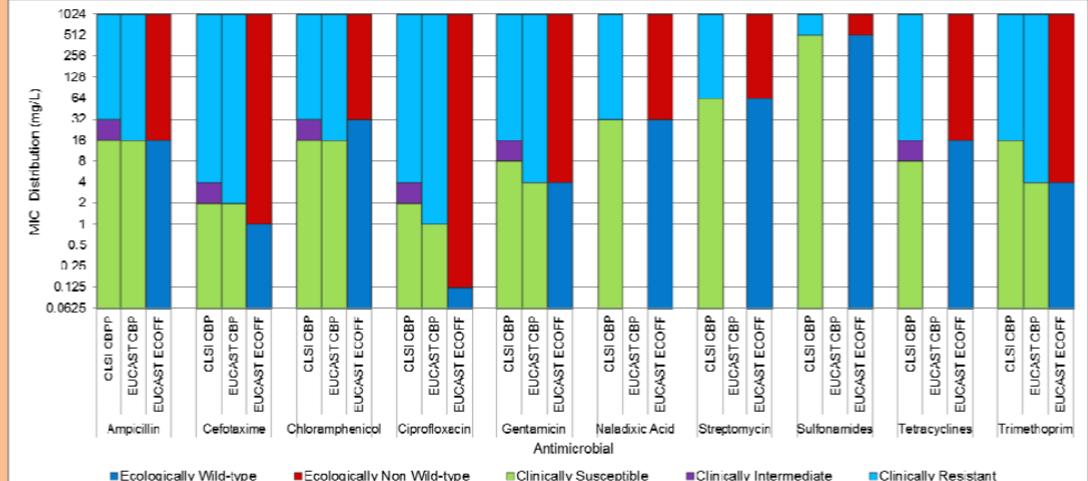
EURL za salmonele, *L. monocytogenes*, *E. coli* in odpornost bakterij v okviru izobraževanj in medlaboratorijskih primerjav usklajujejo in harmonizirajo metode izolacije in genotipizacije PFGE ter določanje in vrednotenje rezultatov testov odpornosti. Samo na enak način pridobljene rezultate je mogoče primerjati, določiti trende in izboljšati ukrepe.

EFSA in ECDC zbirata ter analizirata podatke iz držav članic o pojavu in odpornosti bakterij, ki povzročajo zoonoze. Objavljata tudi skupna letna poročila EU glede odpornosti indikatorskih in drugih bakterij proti protimikrobnim zdravilom. V poročila niso vključeni podatki o izolatih iz živali, živil iz rutinskega nadzora in notranjih kontrol. Posamezne države zbirajo in poročajo svoje podatke skladno z nacionalnimi usmeritvami, ki pa se v

preiskovanem obdobju precej razlikovale glede na različne nacionalne programe in različen obseg obveznega poročanja. Različne so bile metode ugotavljanja, kriteriji vrednotenja in interpretacije rezultatov odpornosti bakterij proti antibiotikom v humani in v veterinarski medicini ter med državami. Vsako leto so poročila bolj usklajena in primerljiva – harmonizacija poteka načrtno, vendar počasi.

Metode ugotavljanja odpornosti proti antibiotikom in nabor antibiotikov se v različnih študijah in različnih državah razlikujejo. Disk difuzijsko metodo (Kirby-Bauer) so v preiskovanem obdobju uporabljali predvsem pri humanih izolatih, medtem ko je pri živalih in živilih večina uporabljala mikrodilucijsko metodo (EFSA, 2014). Za ugotavljanje MIK so bili in so še vedno na voljo različni nabori antibiotikov na komercialnih mikrotitrskih ploščah. Laboratoriji za določanje odpornosti uporabljajo različne mejne vrednosti (kriteriji CLSI, ECOFFs (angl. epidemiological cut-off values) ali podobni ECOFFs).

Figure SA1. Comparison of clinical breakpoints and epidemiological cut-off values used to interpret minimum inhibitory concentration data reported for *Salmonella* spp. from humans, animals or food



MIC: minimum inhibitory concentration.

Note: CLSI (M100-S22 2012), EUCAST clinical breakpoints (2011), EUCAST ECOFFS (as by EFSA, 2007).

Slika 2: Primerjava kliničnih in epidemioloških mejnih vrednosti med CLSI, EUCAST in EUCAST ECOFF za določanje občutljivosti salmonel glede na način interpretacije (EFSA, 2014)

Figure 2: Comparison of clinical and epidemiological cut-off values between CLSI, EUCAST and EUCAST ECOFF for detection of sensitivity of salmonella regarding the way of interpretation (EFSA, 2014)

Za interpretacijo rezultatov odpornosti bakterij proti antibiotikom so države v poročilih EFSA v obdobju do 2010 za izolate iz ljudi upoštevale klinične mejne vrednosti, medtem ko so za izolate iz živali in živil upoštevale epidemiološke mejne vrednosti, v poročilu za leto 2012 pa so države upoštevale še dodatne kriterije (slika 2).

Epidemiološke mejne vrednosti so praviloma nižje kot klinične, zato je v teh poročilih več izolatov iz živali in živil kategoriziranih kot odpornih proti antibiotiku v primerjavi z izolati iz ljudi. Za kloramfenikol, nalidiksinsko kislino, sulfonamide in tetraciklin so mejne vrednosti primerljive oziroma se razlikujejo za eno razredčino (kar je sicer merilna negotovost metode). Za cefotaksim, ciprofloksacin, gentamicin in trimetoprim pa se mejne vrednosti razlikujejo. Največja razlika je pri ciprofloksacinu, kjer je mejna vrednost ECOFFs za tri razredčine nižja od EUCAST CBP (angl. clinical breakpoints) in za pet razredčin nižja od CLSI CBP. Zato je treba rezultate pri teh štirih antibiotikih razlagati previdno in ni smiselna neposredna primerjava med državami. Če je bila v določenem časovnem obdobju, ki ga zajema poročilo, uporabljen enaka metoda, lahko upoštevamo trende za posamezno državo, občutljivost pa se lahko razlikuje glede na uporabljeni mejni vrednosti. V EFSA in ECDC so zato poudarili potrebo po nadaljnji harmonizaciji, da bi lahko bolje primerjali mikrobiološko odpornost v različnih državah EU med izolati iz ljudi in tudi razlike v odpornosti med izolati iz ljudi, živali in živil. Rezultati odpornosti iz poročil EFSA so zato težje primerljivi oziroma jih je treba interpretirati previdno (EFSA, 2012; EFSA, 2014). ECDC je v letu 2014 za izolate iz ljudi vpeljala dogovoren enoten nabor antibiotikov za testiranje na odpornost. V poročilu EFSA za leto 2015 je viden napredek v harmonizaciji – razširjen je nabor skupnih antibiotikov na medicinskem in veterinarskem področju in približane so mejne vrednosti CBPs in ECOFFs na največ eno razredčino (EFSA, 2017).

Ko primerjamo trende odpornosti, je treba upoštevati tudi zdravstvene, kulturne in socialne vidike posamezne države in razlike med posameznimi serovari. Pomembno je, da se uporabi enak način vzorčenja in enake metode preverjanja občutljivosti ter enake kriterije pri interpretaciji rezultatov (Michael in Schwarz, 2016).

2.6.3 Pregled rezultatov ugotavljanja odpornosti iz literature

V literaturi so prikazani različni podatki o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti posameznim antibiotikom glede na državo, preiskovano obdobje in izvor izolatov. V objavljenih poročilih EFSA (2012, 2014 in 2017) so navedeni podatki po državah EU ter število držav, med katerimi so za izolate iz ljudi večinoma tudi podatki iz Slovenije. Pregled podatkov o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* iz literature je prikazan v prilogi v tabelah 2 do 16.

Po kriterijih EFSA so vpeljani različni izrazi za oceno stopnje odpornosti: redko (< 0,1 %), zelo nizko (> 0,1 % do 1 %), nizko (> 1 % do 10 %), srednje (> 10 % do 20 %), visoko (> 20 % do 50 %), zelo visoko (> 50 % do 70 %), ekstremno visoko (> 70 %) (EFSA, 2014).

Odpornost proti ampicilinu (tabela 2 v prilogi). Pri izolatih iz ljudi je bil delež odpornih izolatov po poročilih EFSA povprečno v EU zelo visok, vendar so bile zelo velike razlike med državami. Globalno so poročali o ekstremno visoki odpornosti izolatov v Italiji, na Madžarskem, Portugalskem, v Tajvanu, na Kitajskem in v Mehiki.

Pri živalih je bila podobna slika. Globalno je bila odpornost ekstremno visoka pri izolatih iz goveda v Italiji in na Japonskem, iz prašičev v Italiji, iz puranov v Italiji in iz piščancev v Mehiki. Srednja odpornost je bila ugotovljena pri izolatih iz proizvodnih živalih na Švedskem in nizka pri izolatih iz golobov v Italiji.

Odpornost proti kloramfenikolu (tabela 3 v prilogi). Pri izolatih iz ljudi je bil delež odpornih izolatov po poročilih EFSA v EU srednji do visok, vendar so bile zelo velike razlike med državami. Zelo visoka do ekstremno visoka je bila odpornost na Kitajskem in ekstremno visoka v Mehiki.

Pri živalih je bila podobna slika. Globalno je bila pri izolatih iz goveda odpornost zelo visoka v Italiji in na Japonskem ter ekstremno visoka v Mehiki. Pri izolatih iz piščancev je bila ugotovljena ekstremno visoka odpornost v Mehiki.

Odpornost proti sulfonamidom (tabela 4 v prilogi). Pri izolatih iz ljudi je bil delež odpornih izolatov po poročilih EFSA v povprečju v EU zelo visok, vendar z velikimi razlikami med

posameznimi državami. Globalno je bila ugotovljena ekstremno visoka odpornost v Franciji, Romuniji, Litvi, na Kitajskem, v Tajvanu in Mehiki.

Pri živalih so bile velike razlike. Srednja odpornost je bila ugotovljena pri izolatih iz golobov v Italiji in pri proizvodnih živalih na Finskem. V EU je bila ugotovljena visoka odpornost pri izolatih iz prašičev (poročalo je majhno število držav). Globalno je bila ekstremno visoka odpornost ugotovljena pri izolatih iz prašičev v Italiji in Mehiki, iz goveda v Italiji, na Japonskem in v Mehiki, iz piščancev v Mehiki in iz puranov v Italiji.

Odpornost proti tetraciklinu (tabela 5 v prilogi). Pri izolatih iz ljudi je bil delež odpornih izolatov po poročilih EFSA v povprečju v EU zelo visok, vendar z velikimi razlikami med posameznimi državami. Globalno je bila ugotovljena ekstremno visoka odpornost v Italiji, Franciji, Tajvanu, na Kitajskem in v Mehiki.

Pri živalih so bile velike razlike. Srednja odpornost je bila pri izolatih iz golobov v Italiji in iz proizvodnih živali na Finskem. V EU je bila povprečna odpornost pri izolatih iz prašičev zelo visoka (poročalo je majhno število držav). Globalno je bila ekstremno visoka odpornost ugotovljena pri izolatih iz prašičev v Italiji in Mehiki, iz goveda v Italiji, na Japonskem in v Mehiki, iz piščancev v Mehiki in iz puranov v Italiji.

Odpornost proti nalidiksinski kislini (tabela 6 v prilogi). Pri izolatih iz ljudi je bil delež odpornih izolatov po poročilih EFSA v EU nizek, vendar so bile zelo velike razlike med državami. Globalno je ugotovljena zelo visoka odpornost v Mehiki in ekstremno visoka na Kitajskem.

Pri živalih so velike razlike. Na Švedskem pri izolatih iz proizvodnih živalih niso ugotovili odpornosti. Povprečna odpornost pri izolatih iz prašičev v EU je bila nizka (poročalo je majhno število držav). Globalno je bila ugotovljena zelo visoka odpornost pri puranih v Italiji in ekstremno visoka odpornost pri prašičih in govedu v Mehiki.

Odpornost proti ciprofloksacinu (tabela 7 v prilogi). Večina rezultatov odpornosti proti ciprofloksacinu pri izolatih iz ljudi je interpretirana v skladu s kliničnimi mejnimi vrednostimi (CLSI CBP), ki se zelo razlikujejo od epidemioloških mejnih vrednosti (EUCAST CBP).

Pri izolatih iz ljudi je bila po poročilih EFSA v EU povprečna odpornost nizka. Globalno so bili izolati največkrat dobro občutljivi. S Kitajske je bila poročana nizka do srednja odpornost.

Rezultati odstopajo v državah, kjer so poročali skladno z epidemiološkimi mejnimi vrednostimi (EUCAST CBP). Visoko odpornost so tako ugotovili na Nizozemskem (2010), na Portugalskem (2015) in v Sloveniji (2015).

Pri živalih so bili rezultati podobni kot pri ljudeh (večina poročevalcev je interpretirala rezultate skladno z CLSI CBP). V EU je bila povprečna odpornost pri izolatih iz prašičev nizka, vendar je poročalo samo pet držav (interpretacija v skladu z EUCAST ECOFFs).

Odpornost proti trimetoprimu (tabela 8 v prilogi). Pri izolatih iz ljudi je bil delež odpornih izolatov po poročilih EFSA v povprečju v EU nizek do srednji, vendar z velikimi razlikami med posameznimi državami. Visoka odpornost je bila ugotovljena v Luksemburgu, Romuniji in Franciji. Iz Kitajske so poročali o zelo visoki odpornosti.

Pri izolatih iz prašičev je bila v EU povprečna odpornost visoka (podatke je poročalo samo pet držav). Na Švedskem pri proizvodnih živalih niso ugotovili odpornih izolatov.

Odpornost proti gentamicinu (tabela 9 v prilogi). Pri izolatih iz ljudi je bil delež odpornih izolatov po poročilih EFSA v povprečju v EU nizek, vendar z ekstremnimi razlikami med posameznimi državami (od 0 % do 95,8 %). Na globalni ravni je bila odpornost visoka na Cipru, v Tajvanu in Mehiki, zelo visoka na Kitajskem in ekstremno visoka na Slovaškem.

Pri živalih je bila odpornost v državah EU zelo redka do nizka. Globalno je bila ugotovljena visoka odpornost pri izolatih iz prašičev in goveda v Mehiki.

Odpornost proti cefotaksimu (tabela 10 v prilogi). Cefotaksim je indikatorski antibiotik za ugotavljanje izolatov z razširjenim spektrom beta laktamaz (ESBL). Pri izolatih iz ljudi je bila po poročilih EFSA v EU povprečna odpornost zelo nizka. Odpornost proti cefalosporinom je bila na Kitajskem in v Tajvanu srednja in zelo visoka v Mehiki.

Pri izolatih iz prašičev je bila v EU odpornost nizka (poročalo je samo pet držav). Globalno je bila ugotovljena ekstremno visoka odpornost proti cefalosporinom pri izolatih iz piščancev in prašičev v Mehiki.

Odpornost proti ceftazidimu (tabela 11 v prilogi). Ceftazidim je skupaj s cefotaksimom indikatorski antibiotik za ugotavljanje izolatov z razširjenim spektrom beta laktamaz (ESBL).

Pri izolatih iz ljudi je bila po poročilih EFSA v EU povprečna odpornost zelo nizka. Na globalni ravni je bila odpornost nizka na Danskem, v Tajvanu in na Kitajskem.

Pri izolatih iz prašičev je bila v EU odpornost nizka (poročalo je samo pet držav).

Odpornost proti tigeciklinu (tabela 12 v prilogi). Pri izolatih iz ljudi in prašičev je bila po poročilih EFSA v EU povprečna odpornost nizka (poročalo je majhno število držav).

Odpornost proti kolistinu (tabela 13 v prilogi). Pri izolatih iz ljudi je bila po poročilih EFSA v EU povprečna odpornost nizka, pri izolatih iz živali pa niso ugotovili odpornosti (poročalo je majhno število držav).

Odpornost proti azitromicinu (tabela 14 v prilogi). Pri izolatih iz ljudi je bila po poročilih EFSA v EU povprečna odpornost zelo nizka (poročale so samo štiri države). Globalno je odpornost nizka. Pri izolatih iz prašičev v EU niso ugotovili odpornih izolatov (poročalo je samo 5 držav).

Večkratno odpornost (MDR) (tabela 15 v prilogi). Pri izolatih iz ljudi je bil delež MDR izolatov po poročilih EFSA v povprečju v EU visok, vendar z velikimi razlikami med posameznimi državami. Globalno je bila pri izolatih večkratna odpornost zelo visoka v Španiji in Italiji ter ekstremno visoka na Portugalskem, Kitajskem in v Mehiki.

Velike razlike so ugotovljene pri izolatih iz živali. Pri izolatih iz prašičev je bil po poročilih EFSA povprečen delež MDR v EU visok. Globalno je bila ekstremno visoka večkratna odpornost ugotovljena pri govedu v Italiji, na Japonskem, v Mehiki in ZDA, pri prašičih v Mehiki in ZDA in pri puranih v Italiji.

Nizek delež MDR izolatov pri ljudeh in živalih je bil ugotovljen v skandinavskih državah, pri divjih pticah pa niso ugotovili večkratno odpornih izolatov.

Dobra občutljivost (tabela 16 v prilogi). Pri izolatih iz ljudi je bil delež dobro občutljivih po poročilih EFSA v EU visok, vendar so bile zelo velike razlike med državami. Globalno je bilo najmanj dobro občutljivih izolatov ugotovljeno v Tajvanu, Belgiji in na Kitajskem, največ dobro občutljivih pa na Danskem in v ZDA.

Velike razlike so ugotovljene pri izolatih iz živali. Globalno je bilo največ dobro občutljivih na Švedskem pri proizvodnih živalih. Manj kot 20 % dobro občutljivih izolatov je bilo pri prašičih v Belgiji, ZDA, na Japonskem in v Italiji, pri govedu v ZDA, na Japonskem in v Italiji ter pri puranih v Italiji. Golobi so bili dobro občutljivi v 74,3 %, divje ptice pa 100 %.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PREUČEVANI IZOLATI

V raziskavo smo vključili 284 izolatov *Salmonella Typhimurium* (vključno z monofazno varianto) iz obdobja od leta 2000 do leta 2012.

V obravnavo smo vključili **izolate iz živali, živil, krmil ter okolja** iz zbirke IMP. V zbirki so shranjeni izolati salmonel, izolirani v laboratorijih NVI iz Maribora, Murske Sobote, Celja, Novega mesta, Kranja, Nove Gorice, Ljubljane in iz laboratorijskih nosilcev dejavnosti Perutnine Ptuj in Pivka Perutninarnstvo. Izolati so pridobljeni v preiskavah iz različnih programov:

- iz nacionalnih in EU programov nadzora salmonel pri živalih,
- iz nacionalnih in EU programov nadzora salmonel v živilih živalskega izvora,
- iz programa monitoringa krmil in okolja,
- iz živali, živil živalskega izvora in proizvodov iz živalskih stranskih produktov v okviru notranjega nadzora nosilcev dejavnosti po sistemu HCCP,
- iz kliničnih primerov¹ pri ugotavljanju vzroka okužb gastrointestinalnega trakta,
- iz kliničnih primerov¹ pri ugotavljanju vzroka pogina pri živalih.

Iz zbirke IMP smo v raziskavo vključili 111 izolatov iz živali, 62 izolatov iz živil in 9 izolatov iz okolja in krmil. Iz Inštituta za varovanje zdravja Ljubljana (IVZ) je bilo vključenih v raziskavo 9 izolatov iz živil (od leta 2005 do 2008). Izolati iz živali, živil in okolja so bili pridobljeni s standardnimi obogatitveni metodami za izolacijo salmonel (ISO 6579:2002 in ISO 6579, Amd 1:2007), kjer je meja detekcije 5–10 cfu/25g, skladno z internimi protokoli laboratorijskih nosilcev dejavnosti ter skladno s internimi protokoli IMP¹.

Izolate iz ljudi (n = 93) smo pridobili iz laboratorijskih enot ZZV (Zavod za zdravstveno varstvo) iz Maribora, Nove Gorice in Kranja. Izolati so bili pridobljeni iz kliničnih primerov z direktno metodo nasajanja, večinoma iz vzorcev blata. Iz ZZV Maribor smo pridobili 40 izolatov, iz ZZV Nova Gorica 12 izolatov, iz ZZV Kranj 24 izolatov in iz IVZ 17 izolatov.

¹ izolacija iz kliničnih vzorcev z direktno metodo nasajanja

Vse izolate (n = 284) smo razdelili v štiri osnovne kategorije: človek (n = 93), žival (n = 111), živilo (n = 71) in drugo (n = 9). Razporeditev izolatov po letih, kategoriji in viru so prikazani v tabelah 17 in 18.

Kategorijo živali smo razdelili v podkategorije (tabela 19):

- monitoring (zdrave) in klinika (bolne) živali ter
- proizvodne živali (vir živil živalskega izvora) in druge (neproizvodne) živali, ki zajemajo prostoživeče živali, živali iz živalskega vrta in družne živali.

Izolati *Salmonella Typhimurium* so bili shranjeni na vbodnikih s hranljivim agarjem na sobni temperaturi. Izolate smo oživeli na krvnem agarju (Blood agar base No. 2, Oxoid, s 5 % ovčje krvi). Za preiskave smo uporabili 24-urno čisto kulturo.

Tabela 17: Število izolatov in kategorija (skupina)

Table 17: The number of isolates and their category (group)

Leto	Št. izolatov po kategorijah				Skupaj	
	človek	živali	živilo	drugo	št.	(%)
2000	2	19			21	(7,4)
2001	2	5	1	1	9	(3,2)
2002	1	18	7	1	27	(9,5)
2003	2	2	4	1	9	(3,2)
2004	2	6	4	1	13	(4,6)
2005	9	4	17	1	31	(10,9)
2006	9	7	6		22	(7,7)
2007	3	10	7		20	(7,0)
2008	5	9	12		26	(9,2)
2009	12	7	5	3	27	(9,5)
2010	19	14	1		34	(12,0)
2011	18	9	4		31	(10,9)
2012	9	1	3	1	14	(4,9)
Skupaj	93	111	71	9	284	(100,0)

Tabela 18: Kategorija izolatov, vir, število in leto izolacije

Table 18: Category of isolates, the source, the number and the year of isolation

Kategorija	Vir izolatov	Št. izolatov (n = 284)	Leto izolacije
človek	človek - klinični primeri	93	2000–2012
živali	prašiči	47	2000–2002, 2005–2010
	perutnina	39	2000–2011
	govedo	3	2005, 2007
	druge (neproizvodne) živali	22	2000–2001, 2004, 2006, 2008–2012
živila	meso prašičev	19	2002, 2005–2009, 2011
	meso perutnine	25	2001–2007, 2009–2011
	meso goveda	2	2006, 2008
	meso kuncev	1	2005
	mleto meso (mešano)	24	2002–2009, 2012
drugo	krmilo	1	2001, 2009
	mesno-kostna moka	3	2002, 2009
	odpadna voda	3	2003, 2004, 2005
	gnojevka, kompost	2	2009, 2012

Tabela 19: Kategorija živali s podkategorijami proizvodne in druge ter monitoring in klinika

Table 19: Category of animals with subcategories production and other and monitoring and clinic

Podkategoriji ŽIVALI		Monitoring (zdrave)	Klinika (bolne)	Skupaj
		št.	št.	št.
n = 89	proizvodne	prašiči	19	28
	živali	kokoši	10	1
		purani	18	18
		perutnina	10	10
		govedo	1	2
n = 22	druge živali	afriški jež	1	1
		čaplja		1
		činčila		2
		golob	3	5
		kanarček		2
		konj		1
		kvakač		1
		laboratorijska miš	1	1
		miš (farma nesnic)	1	1
		papagaj		1
		pes		1
		prostoživeče ptice		2
Skupaj		64	47	111

3.2 METODE

3.2.1 Elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (PFGE)

Postopek je povzet po standardnem protokolu za metodo PFGE (Ribot in sod., 2006).

Priprava raztopin:

- 1 M Tris (pH 8,0): 121,1 g TRIZMA base in cca. 42 ml konc. HCl smo raztopili v cca. 800 ml sterilne destilirane vode (SDV) (ob starnem mešanju smo počasi dodajali HCl in merili pH, nato dopolnili do 1000 ml SDV ter avtoklavirali);
- 0,5 M EDTA: 93,05 g EDTA in cca. 10 g NaOH smo raztopili v cca. 400 ml SDV (ob starnem mešanju smo počasi dodajali NaOH in merili pH, nato dopolnili do 500 ml SDV in avtoklavirali);
- TE pufer: zmešali smo 10 ml 1 M Tris (pH 8,0) in 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ter dopolnili do 1000 ml SDV;
- Pufer CSB (angl. Cell Suspension Buffer): zmešali smo 10 ml 1 M Tris (pH 8,0) in 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ter dopolnili do 100 ml SDV;
- Pufer CLB (angl. Cell Lysis Buffer): zmešali smo 25 ml 1 M Tris (pH 8,0), 50 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) in 50 ml 10-% sarcosyl ter dopolnili do 500 ml SDV;
- 70-% alkohol: 7 delov absolutnega etanola smo razredčili s 3 deli SDV;
- 1-% HCl: 2,7 ml konc. HCl (Merck) smo zmešali z 100 ml SDV;
- 20% SDS: 20 g SDS raztopimo v 80 ml SDV (če se ne raztaplja, segrejemo na 68 °C in dopolnimo do 100 ml SDV in prefiltriramo skozi filter 0,2 µm);
- Pufer 0,5×TBE: 50 ml pufra 10×TBE smo dodali 950 ml destilirane vode.

3.2.1.1 Izolacija DNA

Za izolacijo DNA smo uporabili 24-urno čisto bakterijsko kulturo. V epruvete z 2 ml pufra CSB smo suspendirali kulturo s trdnega gojišča, tako da je bila z biofotometrom (Eppendorf, Nemčija) izmerjena optična gostota suspenzije (OD 600), med 1,3 in 1,4. V 2 ml epruvetko smo prenesili 400 µl suspenzije bakterij in dodali 20 µl proteinaze K (20 mg/ml) ter narahlo premešali s pipetiranjem. Dodali smo 400 µl pripravljene 1-% SeaKem Gold agaroze

(Cambrex Bio Science, ZDA) in nežno premešali s pipetiranjem. S to mešanico smo napolnili označene modelčke za čepke – pet jamic za en izolat – ter počakali približno 15 minut, da so se agarozni čepki strdili. V označene 50 ml centrifugirke smo dodali 3 ml pufra CLB in 15,6 µl proteinaze K (20 mg/ml). Z vrha modelčkov za čepke smo porezali odvečno agarozo, nato pa čepke (vse pripadajoče enemu izolatu salmonel) prestavili s spatulo v centrifugirko. Spatulo smo med uporabo razkuževali v 70%- alkoholu. Centrifugirke smo inkubirali najmanj 2 uri pri 54 °C v vodni kopeli s stresanjem (150–175 rpm) in nato preko cedilc odstranili vso tekočino. Ob stalnem potresanju smo počasi dodali 20 ml ogrete SDV in inkubirali centrifugirke 15 minut pri 50 °C v vodni kopeli s stresanjem. Odlili smo vso tekočino in še enkrat ponovili postopek.

Odlili smo vso tekočino in počasi (ob stalnem potresanju centrifugirke) dodali 20 ml ogretega pufra TE ter inkubirali centrifugirke 15 minut pri 50 °C v vodni kopeli s stresanjem ter postopek ponovili še dvakrat. Odlili smo vso tekočino in shranili čepke v 1,6 ml sterilnega pufra TE v hladilniku do naslednje faze postopka.

3.2.1.2 Cepitev DNA z encimom *Xba*I

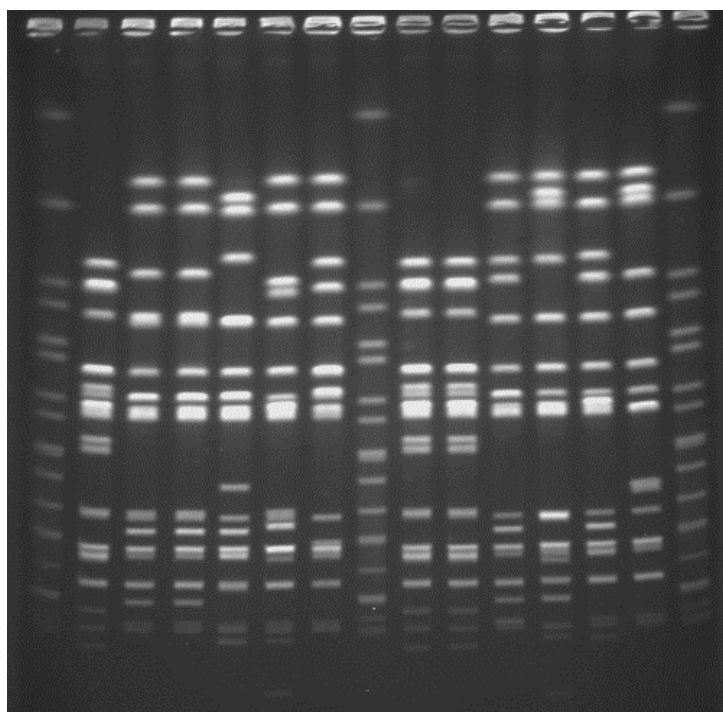
Pripravili smo restrikcijski pufer (pufer H in SDV v razmerju 1 : 10) in prenesli po 100 µl mešanice v 2 ml epruvetke. V pripravljeni epruvetki smo dodali 1–3 mm širok košček, ki smo ga odrezali od čepka, shranjenega v pufru TE, ter inkubirali cca. 15 minut pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo s pipeto pazljivo odstranili ves pufer in dodali po 102 µl cepitvene mešanice (90 µl SDV, 10 µl restrikcijski pufer, 2 µl *Xba*I (10U/µl)). Vzorce smo inkubirali najmanj 4 ure pri 37 °C.

3.2.1.3 Elektroforeza

Priprava gela: 1,8 g agaroze SeaKem Gold (Cambrex Bio Science, ZDA) smo raztopili v 180 ml 0,5×TBE pufra in do uporabe postavili v kopel na 55–60 °C.

S spatulo smo pobrali koščke čepkov iz epruvete, jih posušili s staničevino in previdno položili na glavniček (cca. 1 mm od spodnjega roba zoba), počakali 5 minut in nato zalili

čepke z 1%-agarozo SeaKem Gold. Na prvi, srednji in zadnji zob smo nanesli kontrolno *S. Braenderup* (ATTC BAA664, RDK 138). Sestavili smo okvir za vlivanje gela, vstavili glavniček in vlili agarozo v model. Počakali smo, da se je gel strdil (cca. 30 minut) in nato previdno odstranili glavniček. Jamice smo zalili z 1%-agarozo. V celico aparata za elektroforezo BioRad CHEF-DR II (Hercules, ZDA) smo vlili 2,2 l pufra 0,5×TBE. Vklopili smo vir napajanja, modul za nastavljanje programov, črpalko in hladilno enoto ter počakali, da se je pufer v celici ohladil na zahtevano temperaturo. Pladenj z gelom smo prenesli v celico za elektroforezo in počakali, da se je temperatura gela izenačila s temperaturo pufra v celici. Elektroforeza je potekala 20 ur pri 14 °C in napetosti 6 V/cm. Začetni pulzni čas je bil 2 sekundi in končni 64 sekund. Po končani elektroforezi smo za detekcijo rezultatov gel barvali 20–30 minut z etidijevim bromidom (10 mg/ml). Po barvanju smo 90 minut gel spirali v 500 ml SDV na tresoči podlagi. Vodo smo zamenjali na vsakih 30 minut. Po spiranju smo zabeležili rezultate v komori z UV presvetljevalnikom GeneGenius (Syngene) in shranili sliko v računalnik v formatu „*tif uncompressed*“.



Slika 3: Primer slike gela s prikazanimi fragmenti DNA po restrikciji z encimom *Xba*I

Figure 3: An example of a gel image showing fragments of DNA after restriction with the *Xba*I enzyme

3.2.1.4 Analiza rezultatov PFGE

Slike smo analizirali s programom BioNumerics (v.6.6 Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Program omogoča medsebojno primerjavo genotipov in izdelavo dendrogramov. Uporabili smo algoritem UPMGA (angl. unweighted pair group method using arithmetic averages) s koeficientom Dice (toleranca 1,5 %, optimizacija 1 %). V analizi nismo upoštevali pasov, ki so bili manjši kot 33,3 kb. S programom BioNumeric smo izračunavali stopnjo podobnosti in oblikovali dendrogram. Pri izračunu stopnje podobnosti program upošteva število primerov, ko je opazovana lastnost prisotna pri obeh ali vsaj pri eni operativni taksonomski enoti (ne upošteva števila primerov, ko je opazovana lastnost odsotna pri obeh primerjanih operativnih taksonomskih enotah). Restriktivske vzorce smo analizirali tudi vizualno. V primeru, ko posamezni pasovi niso bili jasno vidni, smo po potrebi postopek cepitve ponovili.

3.2.1.5 Opredelitev genotipov – kriteriji

Posamezni genotipi so določeni na podlagi razlike v najmanj enim pasu. Kriterij za razvrščanje izolatov v genetske skupine ali gruče je bila najmanj 88-odstotna (koeficient Dice > 88 %) podobnost med genotipi. Skupine ali gruče (angl. cluster) podobnih genotipov smo označili s črkami abecede A, B, C itn. Genotipe znotraj genetskih skupin smo označili z arabskimi številkami, torej A1, B1, C1 itn. Genotipi, ki jih nismo uvrstili v nobeno skupino, so unikatni in so označeni s črko X.

3.2.2 Določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) – mikrodilucijska metoda

Za testiranje smo uporabili komercialno pripravljene mikrotitrskie plošče EUSEC, Sensititre (Trek Diagnostic Systems, Thermo Fisher Scientific).

3.2.2.1 Inokulacija

Za določanje MIK smo uporabili svežo, čisto kulturo salmonel. Izbrali smo posamezne dobro izolirane kolonije, ki smo jih predhodno inkubirali za 20 do 24 ur na krvnem agarju. Z bakteriološko zanko smo kulturo preneseli v 4 ml sterilne demineralizirane vode in dobro

suspendirali. Z denzitometer Den-1B (Biosan) smo uravnali gostoto testne suspenzije na 0,5 McFarlanda. V 11 ml komercialno pripravljenega bujona Mueller-Hinton Broth (Trek Diagnostic Systems, Thermo Fisher Scientific) smo dodali 10 µl pripravljene suspenzije, tako da smo dobili gostoto približno 1×10^5 cfu/ml. Vsako jamico mikrotitrsko plošče smo z avtomatskim razlivalcem Sensititre AIM (Trek Diagnostic Systems) inokulirali po 50 µl pripravljene bakterijske testne kulture. Ploščo smo prekrili s samolepilno folijo in inkubirali pri temperaturi 35 ± 1 °C za 18 do 24 ur.

Za kontrolo postopka smo uporabili kontrolni sev *E. coli* ATCC 25922.

3.2.2.2 Ocenjevanje rezultatov

Rezultate smo ocenjevali ročno, pri čemer smo si pomagali z ogledalom za kontrolo rasti na dnu posamezne jamicice. Najprej smo preverili rast v kontrolnih jamicah. Rast se izraža kot motnost oz. gumbek na dnu jamicice.

MIK je najmanjša koncentracija antibiotika, ki popolnoma zavre rast. Vrednost MIK smo ocenili kot koncentracijo v prvi jamicici, kjer je bila vidna popolna inhibicija rasti. Izjema so bili nekateri bakteriostatični antibiotiki, npr. sulfonamidi, kjer smo upoštevali za vrednost MIK tisto koncentracijo antibiotika, ki je zavrla 80–90 % rasti v primerjavi z rastjo bakterije v kontrolni jamicici. Kadar na plošči ni bilo vidne rasti v nobeni jamicici preiskovanega antibiotika, smo ocenili vrednost MIK kot manjšo ali enako najmanjši testni koncentraciji antibiotika. Kadar se je motnost pojavila v vseh jamicah določenega antibiotika, smo ocenili vrednost MIK kot večjo od največje koncentracije antibiotika na plošči.

3.2.2.3 Interpretacija rezultatov

Za interpretacijo rezultatov (tabela 20) smo uporabili epidemiološke mejne vrednosti EUCAST ECOFFs in priporočila EFSA (EFSA, 2016). Občutljivost smo ugotavljali za 14 antibiotikov iz devetih skupin antibiotikov. Testirali smo naslednje antibiotike: ampicilin (A), azitromicin (Azi), cefotaksim (Fot), ceftazidim (Taz), kloramfenikol (C), ciprofloxacin (Cip), kolistin (Col), gentamicin (G), meropenem (Mero), nalidiksinska kislina (Na), sulfametoksazol (Su), tetraciklin (T), tigeciklin (Tgc) in trimetoprim (Tm).

Tabela 20: Skupine antibiotikov, nabor antibiotikov na mikrotitrski plošči, območje testiranja in mejne vrednosti

Table 20: Groups of antibiotics, the scope of antibiotics on microtiter plate, scope of testing and cut-offs

Skupina antibiotikov	Antibiotik	Oznaka	Mejne vrednosti	Območje testiranja MIK µg/l
			(cut-off value) EUCAST ECOFFs	
BETA LAKTAMI	- PENICILINI	ampicilin	A	8
	- CEFALOSPORINI	cefotaksim	Fot	0,5
	- KARBAPENEMI	ceftazidim	Taz	2
KINOLONI in FLUOROKINOLONI	meropenem	Mero	0,12	0,03 do 16
	nalidiksinska kislina	Na	16	4 do 128
	ciprofloxacin	Cip	0,06	0,015 do 8
TETRACIKLINI	tetraciklin	T	8	2 do 64
LIPOPEPTIDI	kolistin	Col	2	1 do 16
AMINOGLIKOZIDI	gentamicin	G	2	0,5 do 32
SULFONAMIDI in TRIMETOPRIM	trimetoprim	Tm	2	0,25 do 32
	sulfametoksazol	Su	256	8 do 1024
FENIKOLI	kloramfenikol	C	16	8 do 128
MAKROLIDI	azitromicin	Azi	16	2 do 64
GLICILCIKLINI	tigeciklin	Tig	1	0,25 do 8

Dobra občutljivost

Za občutljive smo definirali izolate, ki so bili dobro občutljivi za vse testirane antibiotike.

Večkratna odpornost

Skladno s priporočilom EFSA smo za večkratno odporne (MDR, angl. multi drug resistance) upoštevali izolate, ki so bili odporni proti trem ali več skupinam antibiotikov (Magiorakos in sod., 2011).

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Podatke smo statistično obdelali s pomočjo računalniškega programa SPSS različica 23.0. Kot metodo za preverjanje povezanosti med dvema nominalnima spremenljivkama smo uporabili Hi-kvadrat test.

Kadar je v kontingenčni tabeli več kot 20,0 % okenc s prenizko pričakovano (teoretično) frekvenco (to je manj kot 5), vrednost Pearsonovega hi-kvadrata ni zanesljiva. V tem primeru smo upoštevali vrednost Kullbackovega preizkusa ali vrednost Fisherjevega testa. Da bi določili praktično vrednost stopnje povezanosti (velikost učinka), smo izračunali Cramerjev V ali Phi koeficient. Pri analiziranju podatkov smo določili 95-odstotno verjetnost, oziroma 5-odstotno stopnjo tveganja.

Rezultate za izolate iz različnih kategorij smo primerjali med seboj in ugotavljali statistične povezave glede na izvor v spodaj navedenih kombinacijah:

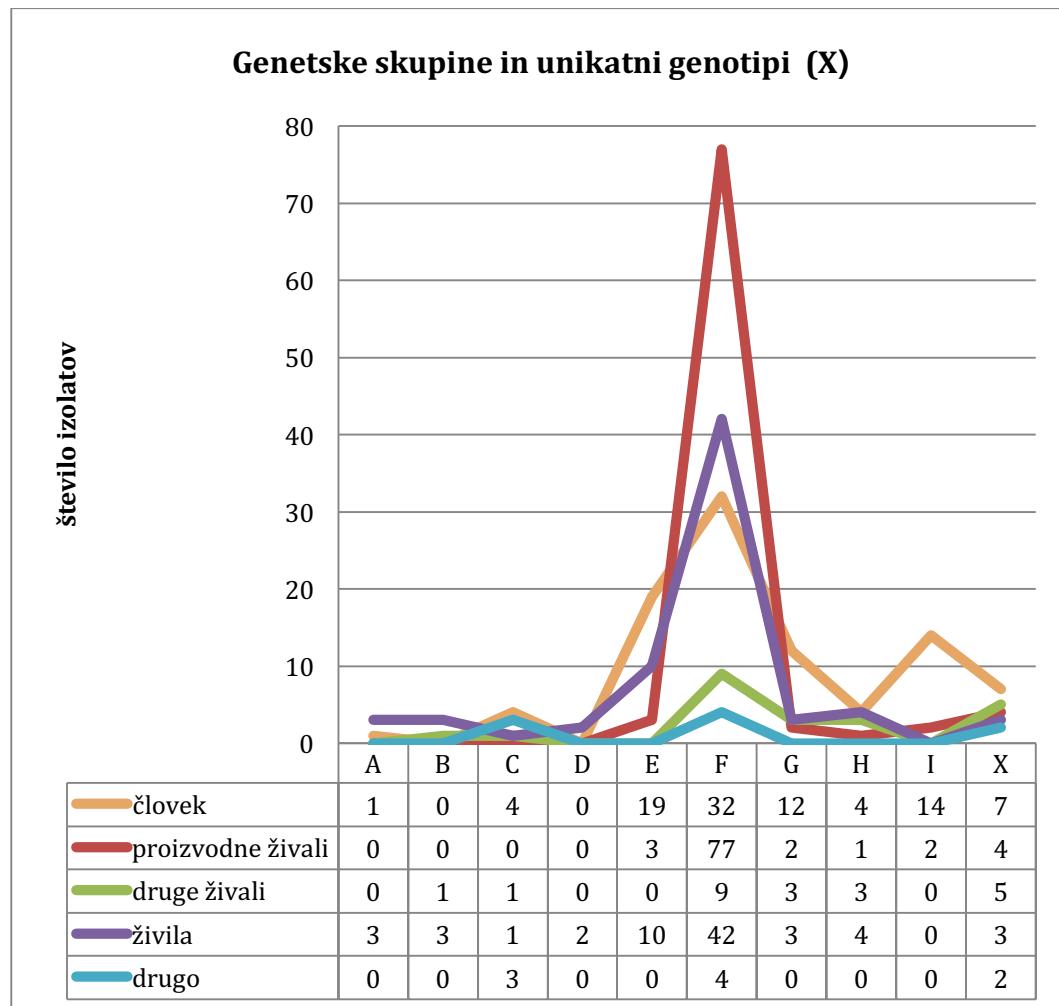
- človek, žival in živilo,
- klinični izolati in in monitoring,
- proizvodne in druge živali,
- človek, prašiči, perutnina,
- prašiči in perutnina.

Kategorije drugo (vzorci okolja in krmil) zaradi majhnega števila izolatov in heterogenosti izvora nismo vključili v analizo.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI GENOTIPIZACIJE Z METODO PFGE

Z metodo pulzne elektroforeze (PFGE) smo 284 izolatov *Salmonella Typhimurium* (vključno z monofazno varianto) razvrstili v 96 različnih genotipov. Petinsedemdeset genotipov smo razporedili v devet genetskih skupin (A do I), 21 pa je bilo unikatnih (X1). Dendrogram je prikazan v sliki 20 v prilogi.



Slika 4: Število izolatov po genetskih skupinah in po izvoru

Figure 4: The number of isolates regarding their genetic groups and origine

Po številu izolatov so izstopale genetske skupne F, E, G, in I (slika 4). Izolate iz genetske skupine F smo ugotovili pri vseh kategorijah, tj. pri ljudeh, živalih, živilih in drugih vzorcih; E, G pri ljudeh, živalih in živilih ter I pri ljudeh in živalih.

Genetske raznolikosti izolatov

Najštevilčnejše genetske skupine smo analizirali glede na izvor (kategorije človek, žival in živilo) in ugotovili statistično značilno razliko ($p < 0,05$). Statistično značilno večji delež izolatov iz genetskih skupin E (59,4 %), G (60,0 %) in I (87,5 %) smo ugotovili pri ljudeh, statistično značilno večji delež izolatov iz skupine F (53,8 %) pa pri živalih.

Tabela 21: Genetske skupine s številom genotipov v posamezni skupini, številom izolatov ter izvorom izolatov po kategorijah

Table 21: Genetic groups with the numbers of genotypes, the numbers of isolates and the origine of isolates regarding cathegories

Genetska skupina	Skupaj št. genot. (izol.)	Človek št. genot. (izol.)	Žival št. genot. (izol.)	Živilo št. genot. (izol.)	Drugo št. genot. (izol.)
A	4 (4)	1 (1)	-	3 (3)	-
B	4 (4)	-	1 (1)	3 (3)	-
C	4 (9)	2 (4)	1 (1)	1 (1)	2 (3)
D	1 (2)	-	-	1 (2)	-
E	12 (32)	6 (19)	3 (3)	6 (10)	-
F	31 (164)	10 (32)	21 (86)	7 (42)	4 (4)
G	10 (20)	6 (12)	3 (5)	3 (33)	-
H	7 (12)	4 (4)	3 (4)	1 (4)	-
I	2 (16)	2 (14)	2 (2)	-	-
Skupaj A - I	75 (263)	31 (86)	34 (102)	25 (68)	6 (7)
X ^a	21 (21)	7 (7)	9 (9)	3 (3)	2 (2)
Skupaj	96 (284)	38 (93)	43 (111)	28 (71)	8 (9)

X^a - unikatni genotipi, genot. - genotipi, izol. - izolati

Pri 93 izolatih iz ljudi smo ugotovili 31 genotipov iz 7 genetskih skupin ter 7 neopredeljenih genotipov (tabela 21). Pri 111 izolatih iz živali smo definirali 34 različnih genotipov iz 7 genetskih skupin ter 9 neopredeljenih genotipov. Pri 71 izolatih iz živil smo ugotovili 25 različnih genotipov iz 8 genetskih skupin ter 3 neopredeljene genotipe. Pri 9 izolatih iz krmil in okolja (skupina drugo) pa smo ugotovili 6 genotipov iz dveh genetskih skupin ter 2 neopredeljena genotipa.

Po številu izolatov (več kot 15) so izstopale genetske skupine F ($n = 164$), E ($n = 32$) izolatov, G ($n = 20$) in I ($n = 16$) izolatov. Razporeditev izolatov v genetske skupine, genotipi po kategorijah ter njihova distribucija po letih so prikazani v tabeli 22 v prilogi.

Podrobneje smo obdelali izolate iz genetskih skupin E, F, G in I.

4.1.1 Genetska skupina F

V genetsko skupino F se je uvrstila več kot polovica vseh izolatov (57,7 %; 164/284), ki so bile izolirane v vseh letih naše raziskave (tabela 22 v prilogi).

Tabela 23: Število in delež izolatov v genotipih genetske skupine F po kategorijah ter po podkategorijah proizvodne in druge živali

Table 23: The number and percentage of isolates in genotypes of the genetic group F regarding categories and subcategories production and other animals

Genotipi	Kategorije n = 164					Podkategorije živali n = 86	
	Človek št. (%)	Žival št. (%)	Živilo št. (%)	Drugo št. (%)	Skupaj št. (%)	Proizvodne živali št. (%)	Druge živali št. (%)
F1	1 (0,6)	4 (2,4)	2 (1,2)	1 (0,6)	8 (4,9)	4 (4,7)	
F2			1 (0,6)		1 (0,6)		
F4			1 (0,6)		1 (0,6)		
F5		1 (0,6)			1 (0,6)	1 (1,2)	
F6	2 (1,2)	3 (1,8)			5 (3,0)	2 (2,3)	1 (1,2)
F7	3 (1,8)	7 (4,3)	4 (2,4)		14 (8,5)	6 (7,0)	1 (1,2)
F8		1 (0,6)			1 (0,6)	1 (1,2)	
F9	16 (9,8)	38 (23,2)	28 (17,1)	1 (0,6)	83 (50,6)	36 (41,9)	2 (2,3)
F11		12 (7,3)	5 (3,0)		17 (10,4)	12 (14,0)	
F12				1 (0,6)	1 (0,6)		
F13		1 (0,6)			1 (0,6)	1 (1,2)	
F14		1 (0,6)			1 (0,6)	1 (1,2)	
F15	1 (0,6)				1 (0,6)		
F16	3 (1,8)				3 (1,8)		
F17		2 (1,2)			2 (1,2)	2 (2,3)	
F18		1 (0,6)			1 (0,6)	1 (1,2)	
F19			1 (0,6)		1 (0,6)		
F20		1 (0,6)			1 (0,6)		1 (1,2)
F21	1 (0,6)				1 (0,6)		
F22		1 (0,6)			1 (0,6)	1 (1,2)	
F23		1 (0,6)			1 (0,6)	1 (1,2)	
F24		4 (2,4)			4 (2,4)	2 (2,3)	2 (2,3)
F25		1 (0,6)			1 (0,6)	1 (1,2)	
F26		2 (1,2)			2 (1,2)	2 (2,3)	
F28	1 (0,6)				1 (0,6)		
F29		1 (0,6)			1 (0,6)	1 (1,2)	
F30	2 (1,2)				2 (1,2)		
F31	2 (1,2)	2 (1,2)			4 (2,4)		2 (2,3)
F32				1 (0,6)	1 (0,6)		
F33		1 (0,6)			1 (0,6)	1 (1,2)	
F34		1 (0,6)			1 (0,6)	1 (1,2)	
Skupaj	32 (19,5)	86 (52,4)	42 (25,6)	4 (2,4)	164 (100,0)	77 (89,5)	9 (10,5)

Največ izolatov (tabela 23) je bilo iz živali (52,4 %; 47 % iz proizvodnih živali in 5,5 % iz neproizvodnih živali).

Ugotovljenih je bilo 31 genotipov. Genotipi nimajo zaporednih številk, ker so nekateri izključeni iz primerjave. Pri teh izolatih namreč ni bilo izvedeno testiranje odpornosti, ker arhivskih izolatov ni bilo mogoče več oživiti. Najpogostejši genotipi so bili F9, F11 in F7. Ostale genotipe skupine F smo ugotovili le pri manjšem številu izolatov.

Genotip F9 (tabela 24) smo ugotovili pri 83 izolatih, kar predstavlja skoraj 30 % vseh izolatov in polovico izolatov iz genetske skupine F. Ugotovili smo ga pri vseh kategorijah v celotnem časovnem obdobju, zajetem v raziskavo. Največ izolatov je bilo iz živali (n = 38), večina je bila iz proizvodnih živali (n = 36) in samo 2 izolata iz drugih živali. Največji delež je bil pri izolatih iz perutnine in mesa perutnine, polovico manjši delež pa pri izolatih iz prašičev in iz mesa prašičev.

Tabela 24: Primerjava (število in % izolatov) genotipov F7, F9 in F11 in vseh genotipov genetske skupine F po kategorijah in podkategorijah živali in živil

Table 24: Comparison (number and % of isolates) of genotypes F7, F9 and F11 and of all the genotypes of the genetic group F regarding categories and subcategories animals and foodsuffs

Genetska skupina F		Genotip F7 n=14 št. (%)	Genotip F9 n=83 št. (%)	Genotip F11 n=17 št. (%)	GS F n=164 št. (%)	Št. vseh genotipov GS F (n=31)
kategorija	človek	3 (21,4)	16 (19,3)		32 (19,5)	10
	žival	7 (50,0)	38 (45,8)	12 (70,6)	86 (52,4)	21
	živilo	4 (28,6)	28 (33,7)	5 (29,4)	42 (25,6)	7
	drugo		1 (1,2)		4 (2,4)	4
podkategorija	prašiči	5 (35,7)	10 (12,0)	5 (29,4)	41 (25,0)	18
	perutnina		25 (30,1)	7 (41,2)	34 (20,7)	4
	govedo	1 (7,1)	1 (1,2)		2 (1,2)	2
	druge živali	1 (7,1)	2 (2,4)		9 (5,5)	6
živila	meso prašič		6 (7,2)	1 (5,9)	8 (4,9)	3
	meso perutnina	2 (14,3)	12 (14,5)	3 (17,6)	21 (12,8)	6
	meso govedo		1 (1,2)		1 (0,6)	1
	meso druge živali		1 (1,2)		1 (0,6)	1
	mešano meso	2 (14,3)	8 (9,6)	1 (5,9)	11 (6,7)	3

GS - genetska skupina

Genotip F11 je bil drugi najpogostejši s 17 izolati (6 % vseh izolatov oz. 10,4 % izolatov iz skupine F). Ugotovili smo ga v letih 2000 do 2005, z izjemo leta 2003, samo pri proizvodnih živalih (n = 12) in živilih (n = 5) v podobnem razmerju v deležih posameznih vrst živali kot pri F9.

Genotip F7 je bil tretji najpogosteši s 14 izolati (4,9 % vseh izolatov oz. 8,5 % izolatov skupine F), in sicer s posameznimi izolati (1 do 3) po letih v celotnem preiskovanem obdobju, z izjemo let 2003, 2004 in 2006. Polovica izolatov je bilo iz živali, od tega 6 iz proizvodnih in 1 iz drugih živali.

Rezultati kažejo, da je delež izolatov z genotipoma F9 in F11 bistveno večji pri perutnini kakor pri prašičih (tabela 24) in podoben trend se kaže tudi pri izolatih iz živil. Pestrost genotipov v genetski skupini F pa je veliko večja pri izolatih iz prašičev in živilih prašičjega izvora (18 oz. 3 genotipi pri 41 oz. 8 izolatih) kot pri perutnini in živilih perutninskega izvora (4 oz. 6 genotipov pri 34 oz. 21 izolatih).

4.1.2 Genetska skupina E

Druga po številu izolatov je bila skupina E z 11,3 % (32/284) izolatov (priloga U). Pojavljala se je od leta 2005, z izjemo enega izolata iz leta 2002. V genetski skupini E so prevladovali izolati iz ljudi z 59,4 %.

Izstopali so trije genotipi: E1 ($n = 8$), ki smo ga ugotovili samo pri izolatih iz ljudi in živil, E8 ($n = 10$) večinoma pri izolatih iz ljudi in E7 ($n = 4$) samo pri izolatih iz živil.

4.1.3 Genetska skupina G

Tretja po številu izolatov je bila skupina G s 7,0 % (20/284) izolatov, ki so bili izolirani v letu 2001 in v obdobju od 2005 do 2012.

Več kot en izolat smo ugotovili pri genotipih G1 ($n = 7$) in G5 ($n = 5$). Genotip G1 smo ugotovili večinoma pri izolatih iz ljudi in G5 pri izolatih iz ljudi in živali.

4.1.4 Genetska skupina I

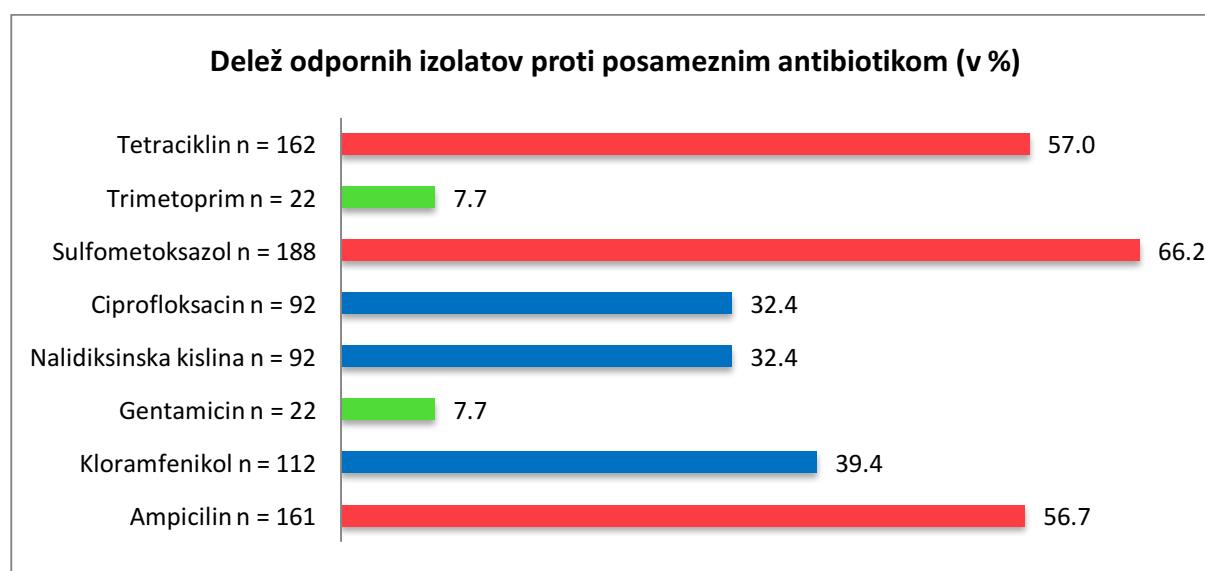
Četrta po številu izolatov je bila skupina I s 5,6 % (16/284) izolatov in z dvema genotipoma, ki so bili izolirani od leta 2003 do 2012. Genotipa I1 in I2 smo ugotovili večinoma pri izolatih iz ljudi ($n = 14$).

4.2 REZULTATI TESTIRANJA NA OBČUTLJIVOST ZA ANTIOTIKE

Minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) antibiotikov smo ugotavljali pri 284 izolatih *Salmonella Typhimurium*. Odpornost izolatov *S. Typhimurium* proti posameznim antibiotikom je prikazana na slikah 5 in 6. Distribucija vrednosti MIK vseh izolatov je prikazana v tabeli 25.

Vsi izolati so bili dobro občutljivi za cefalosporine (cefotaksim, ceftazidim), karbapeneme (meropenem), lipopeptide (kolistin), makrolide (azitromicin) in glicicikline (tigeciklin).

Zelo visok delež vseh izolatov je bil odporen proti sulfonamidom, tetraciklinu in ampicilinu (slika 5), visok delež proti kloramfenikolu, nalidiksinski kislini in ciprofloksacinu in nizek delež proti gentamicinu in trimetoprimu.



Slika 5: Delež odpornih izolatov proti posameznim antibiotikom

Figure 5: The percentage of resistant isolates to individual antibiotics

Tabela 25: Distribucija vrednosti MIK vseh izolatov (n = 284) po posameznih testiranih antibiotikih

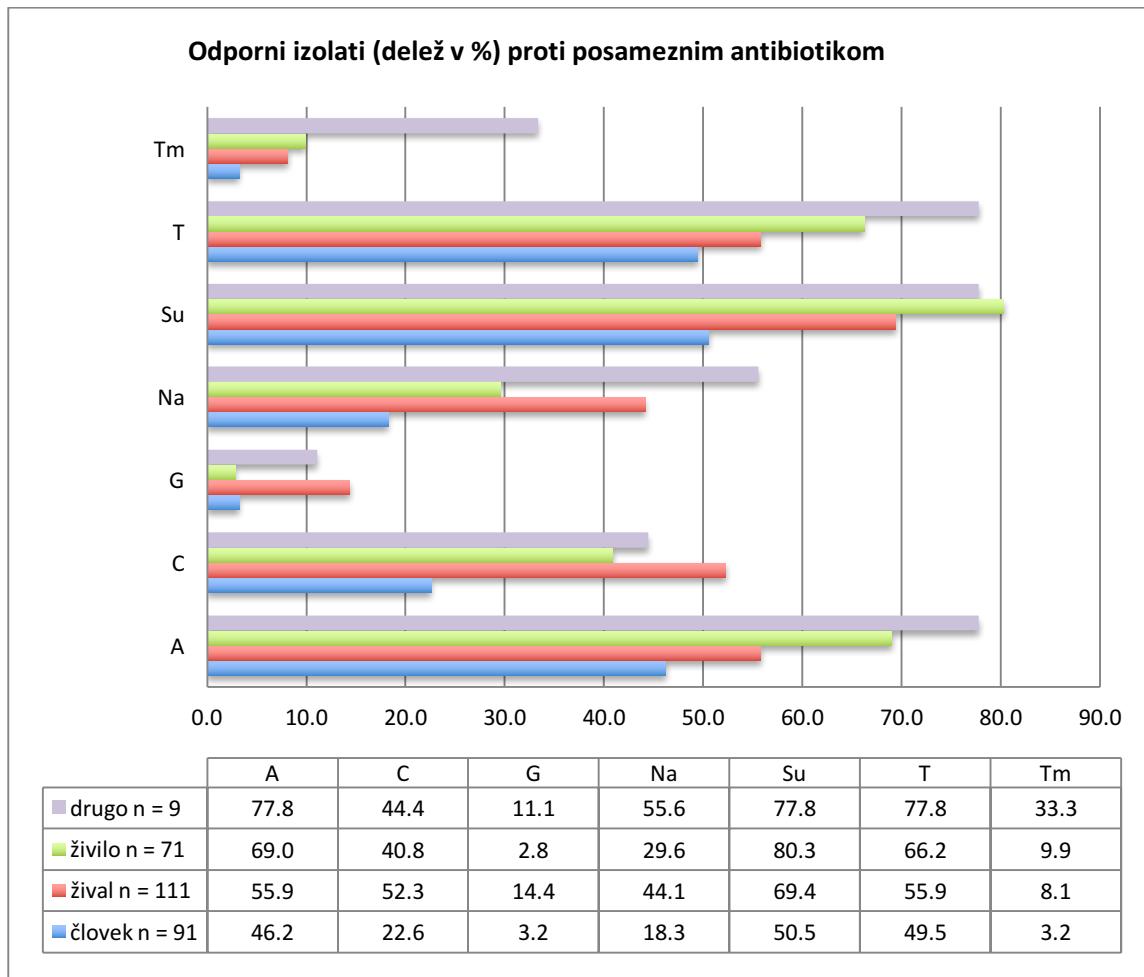
Table 25: The distribution of MIC values of all the isolates (n=284) regarding individual antibiotics tested

Antibiotik	št. R % R	MIK distribucija (mg/l) - število vseh izolatov (n=284) in delež v %																	
		0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
ampicilin	A	161 56,7							72	48	3				1	160			
									25,4	16,9	1,1				0,4	56,3			
cefotaksim	Fot	0 0,0					275 96,8	9 3,2											
ceftazidim	Taz	0 0,0					280 98,6	4 1,4											
meropenem	Mero	0 0,0		267 94,0	17 6,0														
nalid. kislina	Na	92 32,4							183 64,4	8 2,8	1 0,4				1	18 6,3	73 25,7		
ciprofloxacin	Cip	92 32,4		155 54,6	37 13,0		40 14,1	48 16,9	3 1,1	1 0,4									
tetraciklin	T	162 57,0							119 41,9	3 17,6			2	50 17,6	55 19,4	55 19,4			
kolistin	Col	0 0,0						249 87,3	35 4,2	87,7 0,7	12,3 0,7								
gentamicin	G	22 7,7					248 87,3	12 4,2	2 0,7		2 0,7	2 0,7	5 1,8	11 3,9					
trimetoprim	Tm	22 7,7					240 84,5	18 6,3	4 1,4					22 7,7					
sulfametoksazol	Su	188 66,2							21 7,4	25 8,8	36 12,7	11 3,9	3 1,1				188 66,2		
kloramfenikol	C	112 39,4							170 59,9	2 0,7		1 0,4	3 1,1	41 14,4	67 23,6				
azitromicin	Azi	0,0 0,0						120 42,3	144 50,7	16 5,6	4 1,4								
tigeciklin	Tig	0 0,0					176 62,0	97 34,2	11 3,9										

Legenda: območje testiranja je rumeno obarvano polje

4.2.1 Odpornost po kategorijah in podkategorijah

Distribucija vrednosti MIK po kategorijah človek, žival, živilo in drugo je prikazana v tabelah 26 do 29 v prilogi. Primerjava odpornosti proti posameznim antibiotikom med kategorijami in podkategorijami je prikazana v tabeli 30 v prilogi.



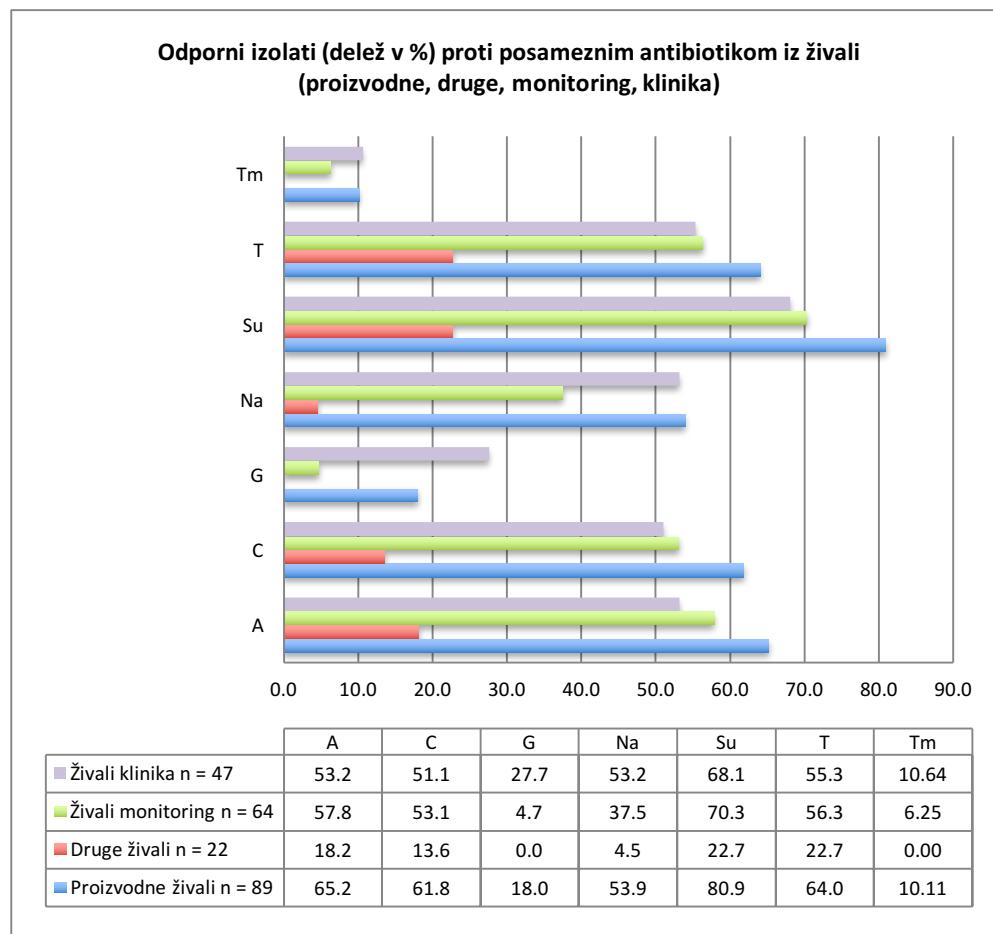
Slika 6: Delež v % odpornih izolatov proti posameznim antibiotikom iz kategorij človek, žival, živilo in drugo

Figure 6: Percentage of the isolates resistant to individual antibiotics from the categories human, animal, foodstuffs and other

Največjo odpornost smo pri vseh kategorijah ugotovili proti sulfametoksazolu, najmanjšo pa proti gentamicinu (slika 6).

Statistično pomembno razliko ($p < 0,05$) smo ugotovili pri odpornosti proti ampicilinu, kloramfenikolu, gentamicinu, nalidiksinski kislini, sulfametoksazolu in tetraciklinu pri

primerjavi izolatov med kategorijami človek, žival in živilo (slika 6) ter pri primerjavi izolatov iz proizvodnih ($n = 89$) in drugih živali ($n = 22$) (slika 7).

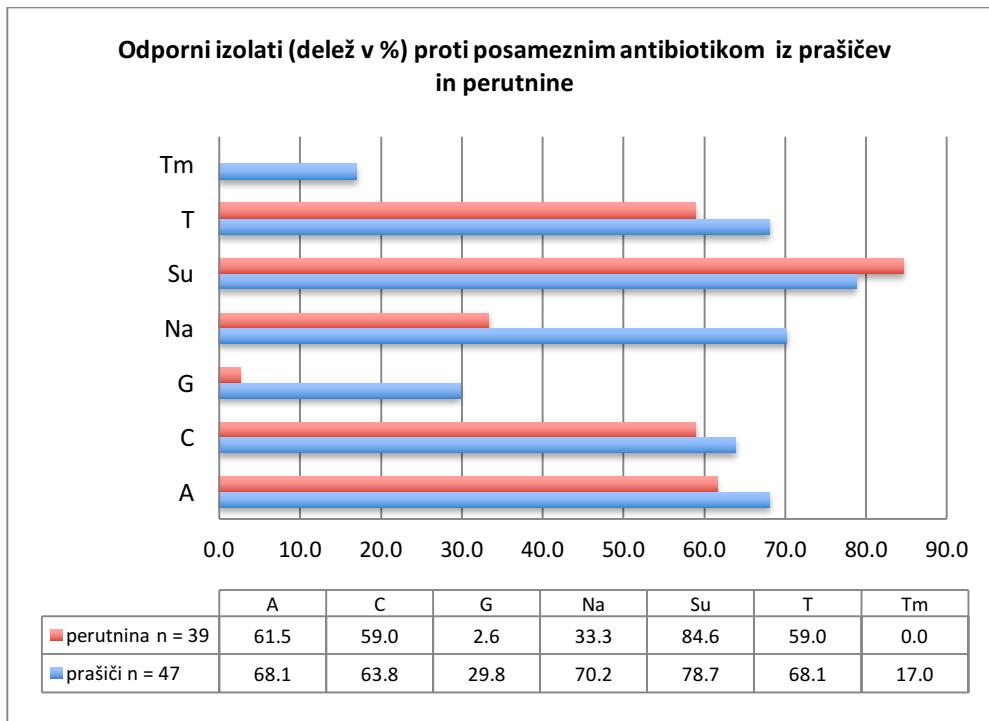


Slika 7: Delež v % odpornih izolatov proti posameznim antibiotikom iz kategorije živali (klinika in monitoring ter druge in proizvodne živali)

Figure 7: Percentage of isolates resistant to individual antibiotics from the cathegory animal (clinic and monitoring and other and production animals)

Pri primerjavi odpornosti izolatov iz klinično bolnih živali ($n = 47$) in iz monitoringa ($n = 64$) nismo ugotovili statistično pomembnih razlik ($p > 0,05$), razen za gentamicin ($p < 0,05$) (slika 7).

Pri primerjavi izolatov iz prašičev ($n = 47$) in perutnine ($n = 39$) smo ugotovili statistično pomembne razlike v odpornosti proti gentamicinu, nalidiksinski kislini in trimetoprimu ($p < 0,05$). Proti vsem trem antibiotikom so bili bolj odporni izolati iz prašičev kot izolati iz perutnine (slika 8).



Slika 8: Delež odpornih izolatov proti posameznim antibiotikom iz prašičev in perutnine v %

Figure 8: Percentage of isolates resistant to individual antibiotics from pigs and poultry

4.2.2 Odpornost glede na število skupin antibiotikov

Med odpornimi izolati (72,2 % oz. 205/284) je bil najvišji delež izolatov odpornih proti petim skupinam antibiotikov (tabela 31), sledili so izolati odporni proti trem skupinam, proti štirim skupinam, proti eni, proti dvema in najmanjši delež odpornih proti šestim skupinam. Več kot polovica izolatov je bilo večkratno odpornih (MDR), z najvišjim deležem pri drugih vzorcih, sledila so živila ter živali, najmanjši delež MDR pa je bil ugotovljen pri izolatih iz ljudi.

Primerjali smo odpornost po številu antibiotičnih skupin in ugotovili statistično pomembne razlike ($p < 0,05$). Pri izolatih iz ljudi je bil največji delež dobro občutljivih. Pri izolatih iz živali je bil največji delež odpornih proti 5 skupinam antibiotikom in enak delež dobro občutljivih. Pri izolatih iz živil pa je bil največji delež odpornih proti trem skupinam antibiotikov.

Tabela 31: Prikaz odpornosti po številu testiranih skupin antibiotikov

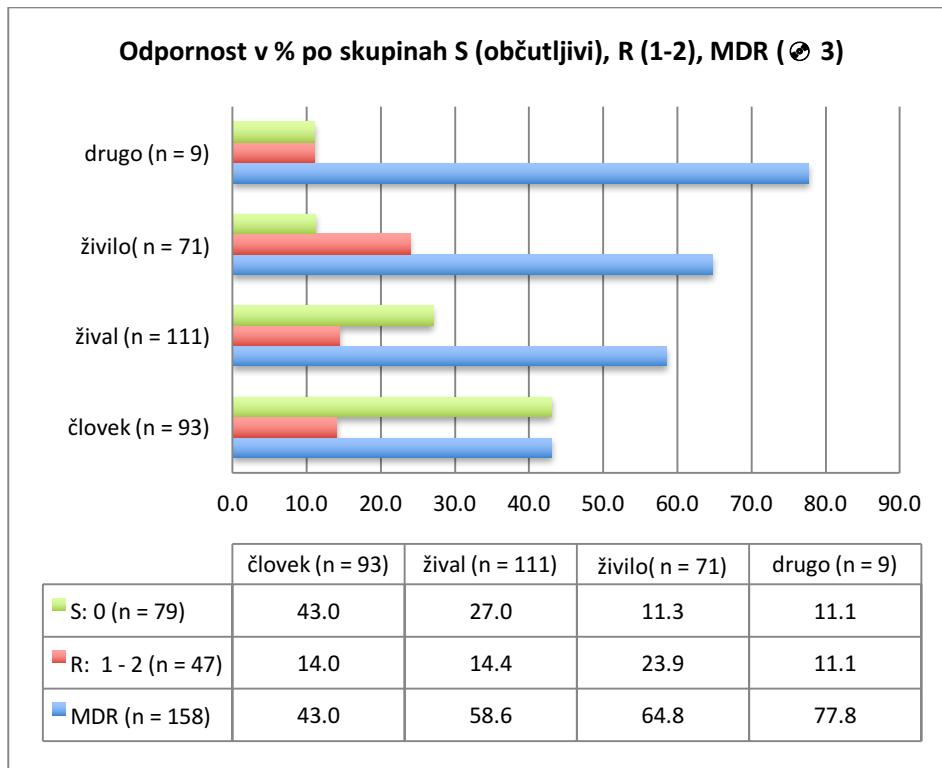
Table 31: Presentation of the resistance regarding the number of antibiotic groups tested

Odporni na št. skupin antibiotikov	Skupaj	Človek	Žival	Živilo	Drugo
	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)
6	10 (3,5)	0 (0,0)	9 (8,1)	1 (1,4)	0 (0,0)
5	66 (23,2)	17 (18,3)	30 (27,0)	15 (21,1)	4 (44,4)
MDR ≥5	76 (26,8)	17 (18,3)	39 (35,1)	16 (22,5)	4 (44,4)
4	36 (12,7)	4 (4,3)	18 (16,2)	14 (19,7)	1 (11,1)
3	46 (16,2)	19 (20,4)	8 (7,2)	16 (22,5)	2 (22,2)
MDR	158 (55,6)	40 (43,0)	65 (58,6)	46 (64,8)	7 (77,8)
2	19 (6,7)	6 (6,5)	8 (7,2)	4 (5,6)	1 (11,1)
1	28 (9,9)	7 (7,5)	8 (7,2)	13 (18,3)	0 (0,0)
dobro občutljivi	79 (27,8)	40 (43,0)	30 (27,0)	8 (11,3)	1 (11,1)
Skupaj	284	93	111	71	71

Ugotovili smo značilno razliko ($p < 0,05$) med odpornostjo pri 89 izolatih iz proizvodnih živali (prašiči, perutnina, govedo) in 22 drugih (neproizvodnih) živalih. Pri proizvodnih živalih je bilo 84,3 % (75/89) izolatov odpornih proti enemu ali več antibiotikom (MDR 68,5 % oz. 61/89) in 15,7 % (14/89) dobro občutljivih. Pri drugih živalih je bilo 72,7 % (16/22) izolatov dobro občutljivih in 27,27 % (6/22) odpornih (MDR 18,2 % oz. 4/22).

Razdelitev po skupinah glede občutljivosti za antibiotike

Pri statistični primerjavi občutljivih (S), odpornih proti 1–2 antibiotikom (R) in večkratno odpornih (MDR) smo med kategorijami človek, žival in živilo (slika 9) ugotovili statistično pomembne razlike ($p < 0,05$).



Slika 9: Delež izolatov iz kategorij človek, žival, živilo in drugo po skupinah S, R in MDR

Figure 9: Percentage of the isolates from the cathegories human, animal, foodstuff and other regarding the groups S, R and MDR

Večjo odpornost smo ugotovili pri izolatih iz klinično bolnih prašičev v primerjavi z zdravimi in pri perutnini pri izolatih iz puranov v primerjavi z izolati iz piščancev (tabela 32).

Tabela 32: Odpornost po skupinah S, R in MDR pri posameznih vrstah

Table 32: Resistance regarding the gorups S, R and MDR in individual specieses

Odpornost po skupinah	prašiči		piščanci		purani	
	<i>monitoring</i> <i>n = 19</i>	<i>klinika</i> <i>n = 28</i>	<i>monitoring</i> <i>n = 10</i>	<i>monitoring</i> <i>n = 18</i>		
S: dobro občutljivi	št. (%)	6 (31,6)	2 (7,1)	3 (30,0)	1 (5,6)	
R: odporni proti 1-2	št. (%)	1 (5,3)	2 (7,1)	2 (20,0)	4 (22,2)	
MDR	št. (%)	12 (63,2)	24 (85,7)	5 (50,0)	13 (72,2)	

4.2.3 Rezistotipi

Izolate smo glede na ugotovljeno kombinacijo odpornosti proti posameznim skupinam antibiotikov razvrstili v 28 različnih fenotipskih rezistotipov (v nadaljevanju rezistotipi). V tabeli 33 so prikazane vse kombinacije s številom izolatov posameznih rezistotipov. Pri oznaki rezistotipa smo za kinolone in fluorokinolone uporabili samo nalidiksinsko kislino, ker je bila odpornost proti ciprofloksacinu enaka. V skupini sulfonamidi in trimetoprim smo rezultate prikazali ločeno, ker se odpornosti proti sulfonamidom in trimetoprimu razlikujejo.

Tabela 33: Odpornost vseh izolatov *S. Typhimurium* (n = 284) proti posameznim antibiotikom in pripadajoči rezistotipi

Table 33: Resistance of all the isolates of *S. Typhimurium* (n = 284) to the individual antibiotics and their resistotypes

Odporni na št. skupin antibiotikov	Rezistotipi	Število izolatov	Ampicilin	Kloramfenikol	Gentamicin	Nalidiksinska kislina	Sulfametoksazol	Teraciklin	Trimetoprim
6	ACGNaSuTTm	4	A	C	G	Na	Su	T	Tm
6	ACGNaSuT	6	A	C	G	Na	Su	T	
5	ACGSuT	2	A	C	G		Su	T	
5	ACNaSuTTm	9	A	C		Na	Su	T	Tm
5	ACNaSuT	55	A	C		Na	Su	T	
4	ACSuTTm	1	A	C			Su	T	Tm
4	CGNaSuTm	1		C	G	Na	Su		Tm
4	ANaSuT	1	A			Na	Su	T	
4	ACSuT	33	A	C			Su	T	
3	ACSu	1	A	C			Su		
3	AGT	1	A		G			T	
3	ANaSuTm	1	A			Na	Su		Tm
3	ANaSu	1	A			Na	Su		
3	ASuTTm	4	A				Su	T	Tm
3	ASuT	33	A				Su	T	
3	ATTm	1	A					T	Tm
3	GNaSuTm	1			G	Na	Su		Tm
3	GNaSu	2			G	Na	Su		
3	GSuT	1			G		Su	T	
2	ASu	6	A				Su		
2	AT	2	A					T	
2	GSu	1			G		Su		
2	NaSu	7				Na	Su		
2	SuT	3					Su		T
1	G	3			G				
1	Na	4				Na			
1	Su	15					Su		
1	T	6						T	
0	dobro občutljivi	79							
	Skupaj	284							

Tabela 34: Število in delež posameznega rezistotipa po kategorijah človek, žival, živilo, drugo in ter njihova razvrstitev v genetske skupine

Table 34: Number and percentage of individual resistotypes regarding the categories human, animal, foodstuffs and their pertaining to genetic groups

Odporni na Št. skupin antibiotikov	Rezistotip	Genetska skupina	Št. (%)	Človek	Žival	Živilo	Drugo
				št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)
6	ACGNaSuT	F	6 (2,1)	-	6 (100,0)	-	-
6	ACGNaSuTTm	F, X ^a	4 (1,4)	-	3 (75,0)	1 (25,0)	-
5	ACGSuT	F, E	2 (0,7)	1 (50,0)	-	1 (50,0)	-
5	ACNaSuT	F	55 (19,3)	15 (27,3)	25 (45,5)	13 (23,6)	2 (3,6)
5	ACNaSuTTm	F	9 (3,2)	1 (11,1)	5 (55,6)	1 (11,1)	2 (22,2)
≥5	MDR ≥5	E, F, X	76 (26,8)	17 (22,4)	39 (51,3)	16 (21,1)	4 (5,3)
4	ACSuTTm	F	1 (0,4)	1 (100,0)	-	-	-
4	ANaSuT	F	1 (0,4)	-	-	1 (100,0)	-
4	CGNaSuTm	F	1 (0,4)	-	1 (100,0)	-	-
4	ACSuT	F, G, X ^a	33 (11,6)	3 (9,1)	17 (51,5)	13 (39,4)	-
3	GNaSuTm	F	1 (0,4)			1 (100,0)	
3	ACSu	F	1 (0,4)	-	1 (100,0)	-	-
3	AGT	E	1 (0,4)	-	1 (100,0)	-	-
3	ANaSu	F	1 (0,4)	-	-	1 (100,0)	-
3	ANaSuTm	E	1 (0,4)	-	-	1 (100,0)	-
3	ASuT	E, C, D, I, X ^a	33 (11,6)	18 (54,5)	3 (9,1)	10 (30,3)	2 (6,1)
3	ASuTTm	A, X ^a	4 (1,4)	1 (25,0)	-	3 (75,0)	-
3	ATTm	B	1 (0,4)	-	-	1 (100,0)	-
3	GNaSu	F	2 (0,7)	-	2 (100,0)	-	-
3	GSuT	F	1 (0,4)	-	1 (100,0)	-	-
≥3	MDR	A, B, C, D, E, F, G, I	158 (55,6)	40 (25,3)	65 (41,1)	46 (29,1)	7 (4,4)
2	ASu	E, F, G, X ^a	6 (2,1)	3 (50,0)	1 (16,7)	2 (33,3)	-
2	AT	X ^a	2 (0,7)	-	-	1 (50,0)	1 (50,0)
2	GSu	F	1 (0,4)	-	1 (100,0)	-	-
2	NaSu	F	7 (2,5)	1 (14,3)	6 (85,7)	-	-
2	SuT	H, G	3 (1,1)	2 (66,7)	-	1 (33,3)	-
1	G	G	3 (1,1)	2 (66,7)	1 (33,3)	-	-
1	Na	F, X ^a	4 (1,4)	-	1 (25,0)	3 (75,0)	-
1	Su	F, I	15 (5,3)	1 (6,7)	5 (33,3)	9 (60,0)	-
1	T	C, A, G, E, H	6 (2,1)	4 (66,7)	1 (16,7)	1 (16,7)	-
0	dobro občutljivi	F, G, I, H, E, B, X ^a	79 (27,8)	40 (50,6)	30 (38,0)	8 (10,1)	1 (1,3)
Skupaj			284	93 (32,7)	111 (39,1)	71 (25,0)	9(3,2)

^aunikatni genotipi

Ugotovili smo statistično značilno razliko ($p < 0,05$), ko smo primerjali tri napogosteješ rezistotipe glede na izvor izolatov (človek, žival, živilo). Izolati z rezistotipom ACNaSuT in ACSuT so bili statistično značilno pogostejši pri živalih, izolati z rezistotipom ASuT pa pri ljudeh (tabela 34).

4.2.3.1 Zastopanost najpogostejših rezistotipov izolatov iz ljudi in živali

Primerjali smo pogostost treh najpogostejših rezistotipov pri izolatih iz ljudi in posameznih vrst živali. Nismo upoštevali izolatov iz drugih vzorcev in iz živil, kjer bi lahko bila vir kontaminacije tako žival kakor tudi človek.

Rezistotip ACNaSuT je imelo 40 izolatov, od tega jih je bilo 37,5 % (15/40) iz ljudi, 35 % (14/40) iz prašičev, 22,5 % (9/40) iz perutnine, 2,5 % (1/40) iz goveda in 2,5 % (1/40) iz drugih živali. Glede na izvor je imelo ta rezistotip 16,1 % (15/93) izolatov iz ljudi, 29,8 % (14/47) izolatov iz prašičev, 23,1 % (9/39) izolatov iz perutnine, 33,3 % (1/3) izolatov iz goveda in 4,5 % (1/22) izolatov iz drugih živali.

Rezistotip ACSuT je imelo 20 izolatov, od tega je bilo 15 % (3/20) izolatov iz ljudi, 5 % (1/20) izolatov iz prašičev, 70 % (14/20) izolatov iz perutnine in 10 % (2/20) izolatov drugih živali. Glede na izvor pa je imelo ta rezistotip 3,2 % (3/93) izolatov iz ljudi, 2,1 % (1/47) izolatov iz prašičev, 35,9 % (14/39) izolatov iz perutnine in 9,1 % (2/22) izolatov drugih živali.

Rezistotip ASuT je imelo 21 izolatov, od tega je bilo 85 % (18/21) izolatov iz ljudi, 9,5 % (2/21) izolatov iz prašičev in 4,7 % (1/21) izolatov drugih živali. Glede na izvor pa je imelo ta rezistotip 19,4 % (18/93) izolatov iz ljudi, 4,3 % (2/47) izolatov iz prašičev in 4,5 % (1/22) izolatov drugih živali.

Pri primerjavi najpogostejših proizvodnih živalskih vrst, to je prašičev in perutnine, so bili izolati z rezistotipom ACNaSuT statistično pomembno pogostejši ($p < 0,05$) pri prašičih (85,7 %), izolati ACSuT pa pri perutnini (75,0 %).

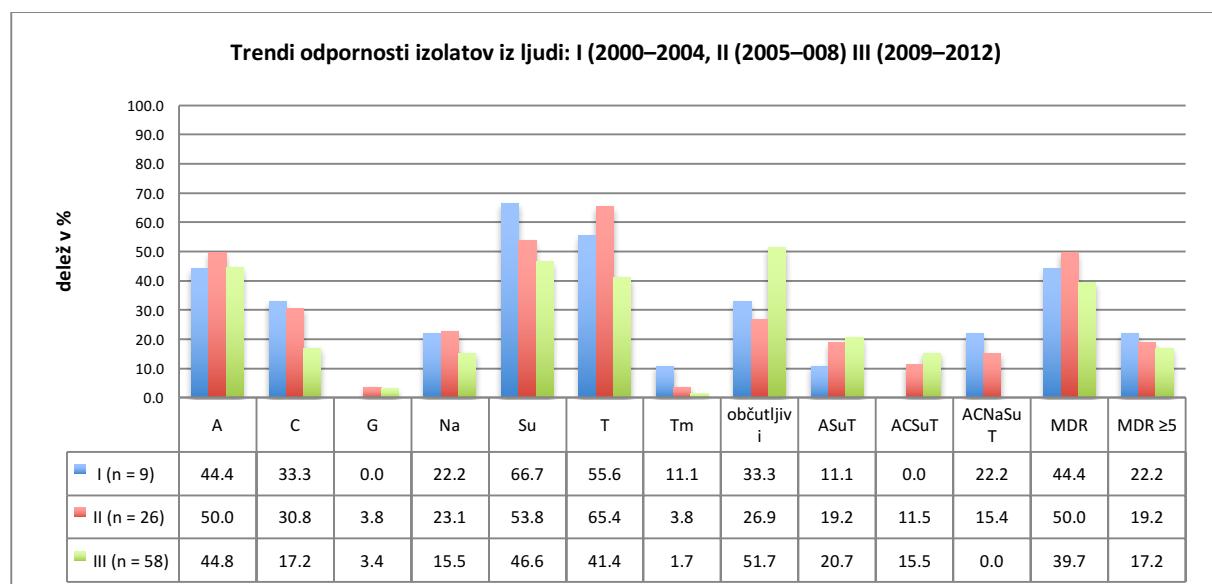
4.2.4 Trendi odpornosti

Odpornost izolatov *S. Typhimurium* proti antibiotikom smo primerjali v treh obdobjih:

- I. obdobje: za leta 2000–2004
- II. obdobje: za leta 2005–2008
- III. obdobje: za leta 2009–2012

Upoštevali smo 250 izolatov iz kategorij človek, živilo, prašiči in perutnina, ker je bilo število drugih izolatov premajhno za analizo. Primerjali smo deleže izolatov, odpornih proti posameznim antibiotikom, treh najpogostejših rezistotipov, večkratno odpornih MDR in $MDR \geq 5$ ter dobro občutljivih. Naraščanje ali upadanje odpornosti za 10 % pomeni pri majhnem številu vzorcev (9–11) le en izolat več ali manj, kar morda le nakazuje tendenco upadanja oz. naraščanja. Na splošno lahko ugotovimo, da se nakazuje trend zmanjševanja odpornosti pri izolatih iz ljudi in perutnine ter naraščanje odpornosti pri izolatih iz živil (slike 10 do 13).

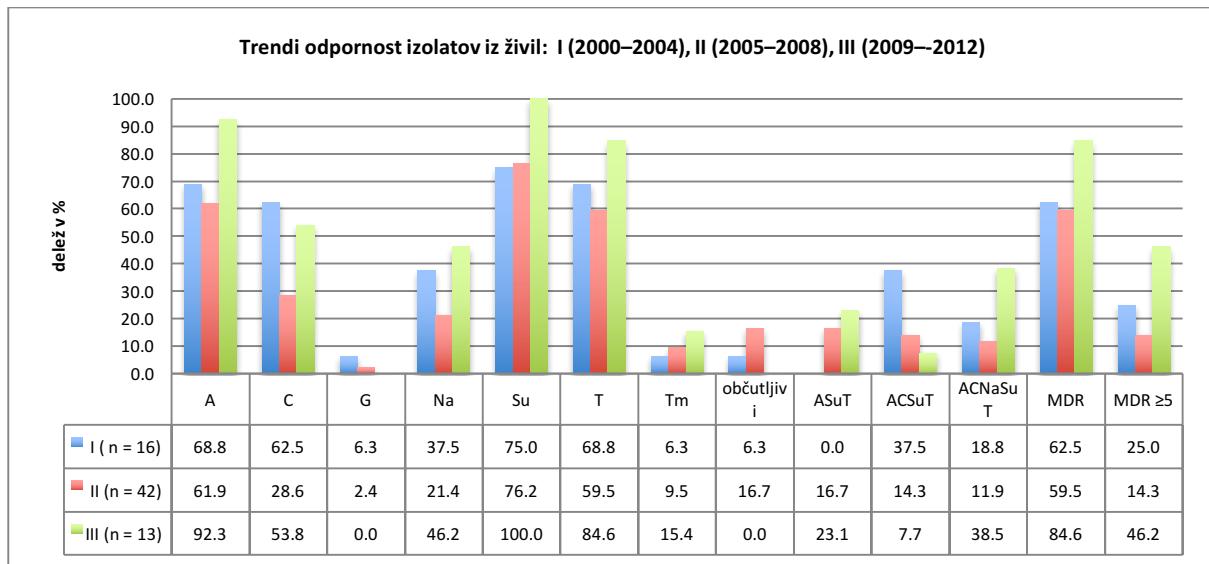
Pri ljudeh (slika 10) se pri primerjavi med tremi obdobjji zmanjšuje obseg odpornosti proti kloramfenikolu, sulfonamidom, tetraciklinu in trimetoprimu ter povečuje obseg rezistotipa ASuT in ACSuT in obseg dobro občutljivih.



Slika 10: Trendi odpornosti izolatov iz ljudi za obdobja I (2000–2004), II (2005–2008) in III (2009–2012)

Figure 10: Trends of the resistance of the isolates from humans for periods I (2000–2004), II (2005–2008) and III (2009–2012)

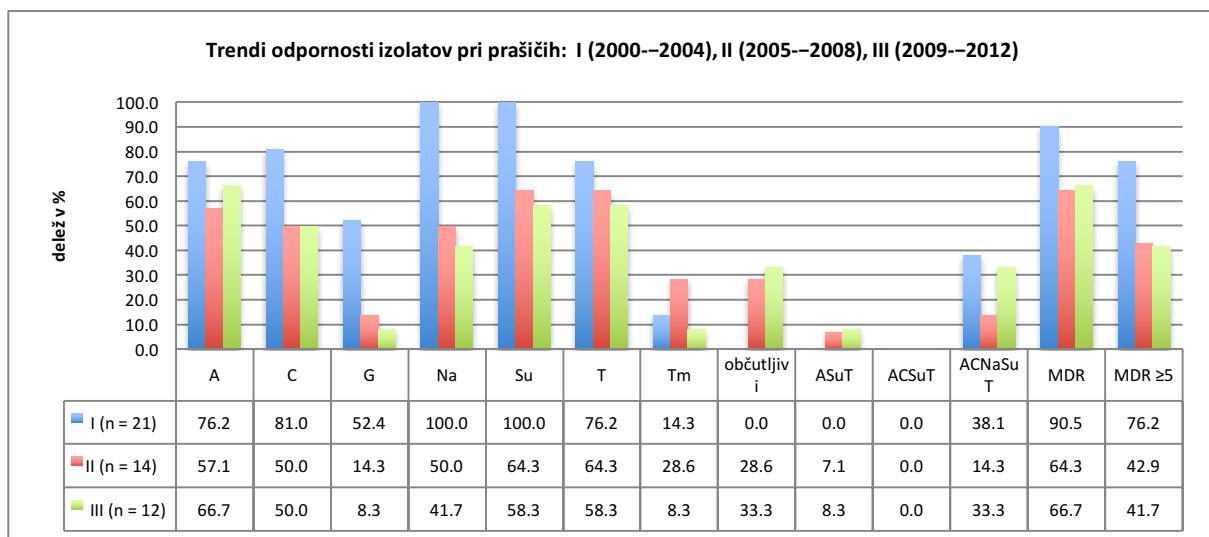
Pri izolatih iz živil (slika 11) se povečuje obseg odpornih izolatov proti ampicilinu, tetraciklinu, nalidiksinski kislini, sulfonamidom, trimetoprimu, večkratno odpornih izolatov, $MDR \geq 5$ ter rezistotipov ASuT in ACNaSuT. Zaskrbljujoče je tudi, da v zadnjem obdobju nismo ugotovili dobro občutljivih izolatov.



Slika 11: Trendi odpornosti izolatov iz živil za obdobja I (2000–2004), II (2005–2008) in III (2009–2012)

Figure 11: Trends of resistance of the isolates from foodstuffs for periods I (2000–2004), II (2005–2008) and III (2009–2012)

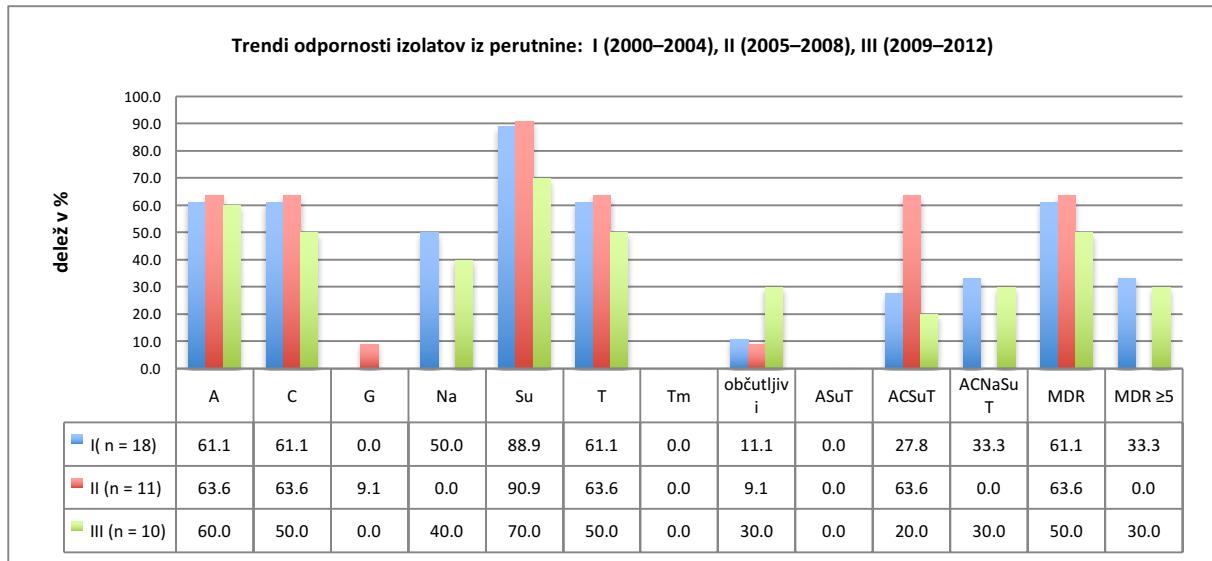
Pri **izolatih iz prašičev** (slika 12) težko ocenimo trend odpornosti, ker so v prvem obdobju prevladovali klinični izolati, ki so praviloma bolj odporni proti antibiotikom, v drugem in tretjem obdobju pa so bili izolati večinoma iz monitoringov. V tretjem obdobju se v primerjavi z drugim obdobjem povečuje obseg odpornosti proti ampicilinu in obseg rezistotipa ACNaSuT.



Slika 12: Trendi odpornosti izolatov iz prašičev za obdobja I (2000–2004), II (2005–2008) in III (2009–2012)

Figure 12: Trends of resistance of the isolates from pigs for periods I (2000–2004), II (2005–2008) and III (2009–2012)

Pri **izolatih iz perutnine** (slika 13) smo ugotovili, da se nakazuje zmanjšan obseg odpornih izolatov proti posameznim antibiotikom in večkratno odpornih ter povečuje delež dobro občutljivih.



Slika 13: Trendi odpornosti izolatov iz perutnine za obdobja I (2000–2004), II (2005–2008) in III (2009–2012)

Figure 13: Trends of resistance of the isolates from poultry for periods I (2000–2004), II (2005–2008) and III (2009–2012)

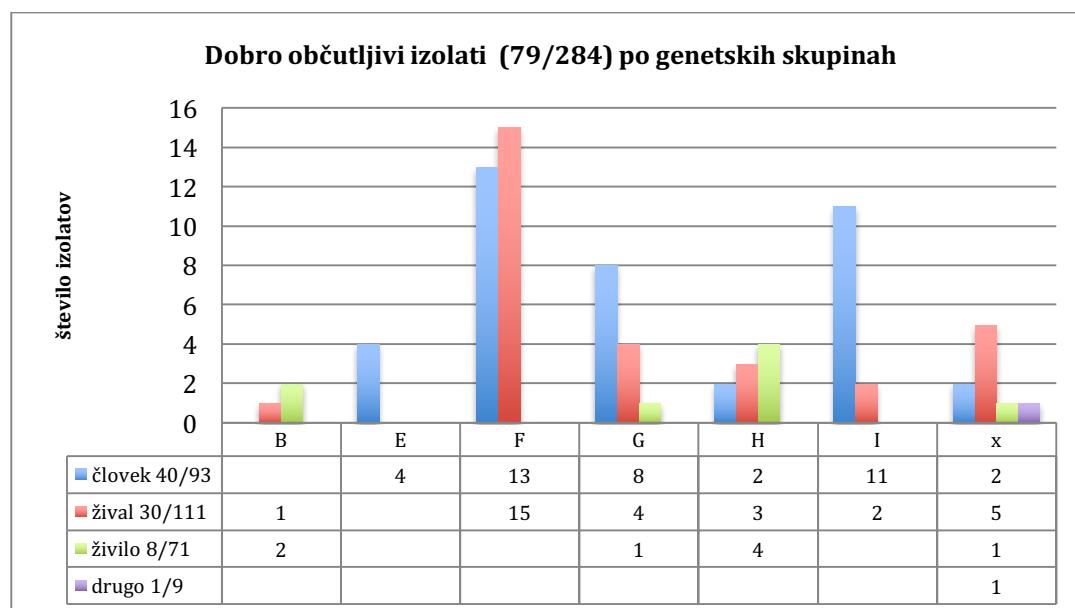
4.3 UGOTAVLJANJE POVEZAV MED ODPORNOSTJO PROTI ANTIBIOTIKOM TER GENETSKIMI SKUPINAMI IN GENOTIPI

4.3.1 Pogostost dobro občutljivih izolatov po genetskih skupinah

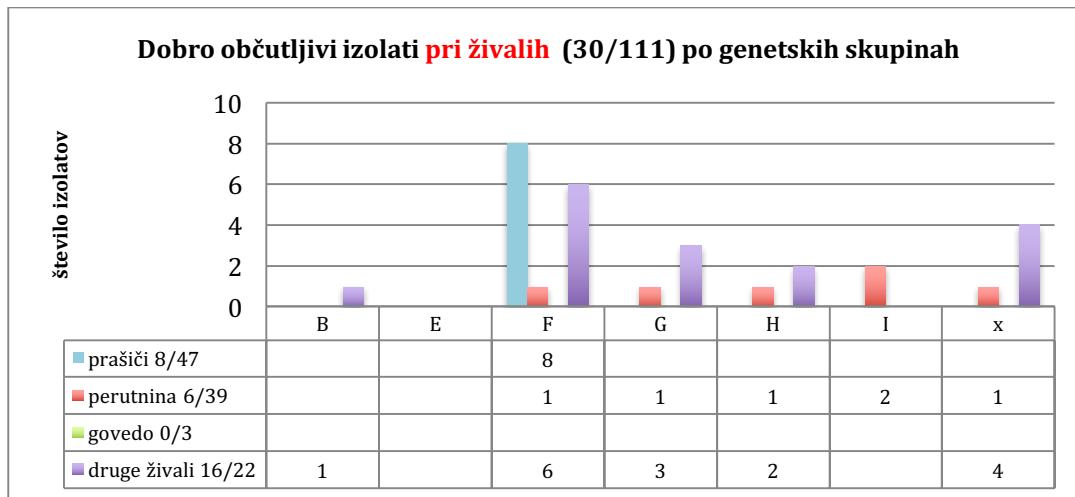
V slikah 14 do 16 je prikazano število dobro občutljivih izolatov po kategorijah in podkategorijah.

Dobro občutljivost smo ugotovili pri približno četrtini 27,8 % (79/284) izolatov. Pri ljudeh so bili dobro občutljivi izolati v 5 genetskih skupinah, od tega največ v skupinah F, skupini I in skupini G (tabela 35 v prilogi). Pri živalih so dobro občutljivi izolati pripadali 5 genetskim skupinam, največ skupini F. Pri primerjavi dobro občutljivih izolatov iz prašičev in perutnine so bili izolati iz prašičev vsi v skupini F, medtem ko so bili iz perutnine v 4 skupinah: F, G, H in I (posamezni izolati).

Če primerjamo deleže dobro občutljivih po genetskih skupinah, je bil velik delež dobro občutljivih v genetskih skupinah I (81,3 %, 13/16) izolatov, H (75 %, 9/12) izolatov in G (65 %, 13/20) izolatov. Nasprotno pa je ta delež bil majhen v skupinah F (17,1 %, 28/164) in E (12,5 %, 4/32) izolatov. V skupinah A, C, in D ni bilo dobro občutljivih izolatov.

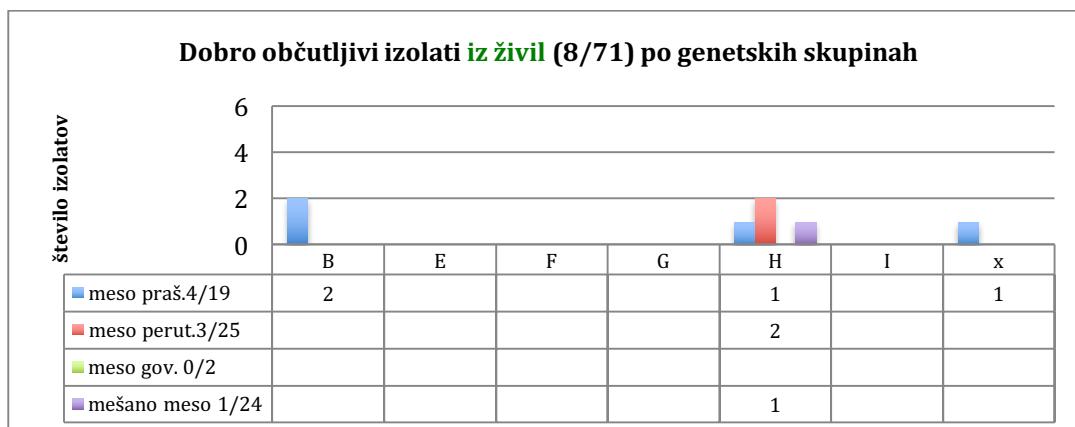


Slika 14: Dobro občutljivi izolati po genetskih skupinah in kategorijah (št. dobro občutljivih/št. vseh)
Figure 14: Sensitve isolates regarding the genetic groups and cathegories (No. of sensitive/No. of all)



Slika 15: Dobro občutljivi izolati po genetskih skupinah pri živalih (št. dobro občutljivih/št. vseh)

Figure 15: Sensitive isolates from animals regarding genetic groups (No. of sensitive/No. of all)



Slika 16: Dobro občutljivi izolati po genetskih skupinah iz živil (št. dobro občutljivih/št. vseh)

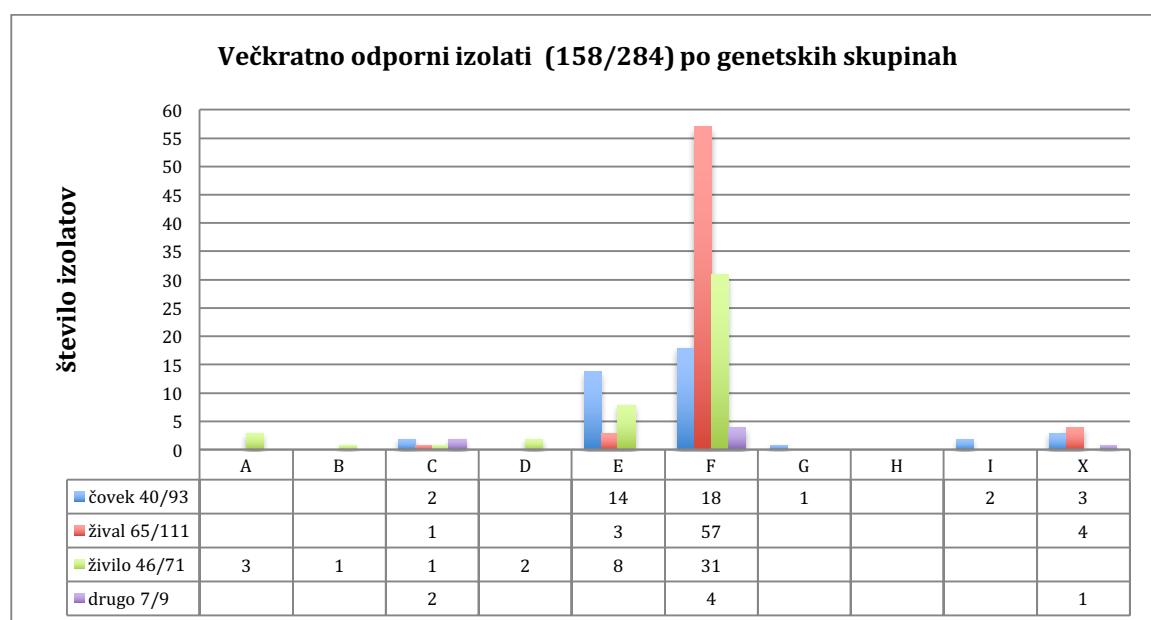
Figure 16: Sensitive isolates from foodstuffs regarding genetic groups (No. of sensitive/No. of all)

4.3.2 Večkratna odpornost po genetskih skupinah in kategorijah

V slikah 17 do 19 je prikazano število MDR izolatov po kategorijah in podkategorijah.

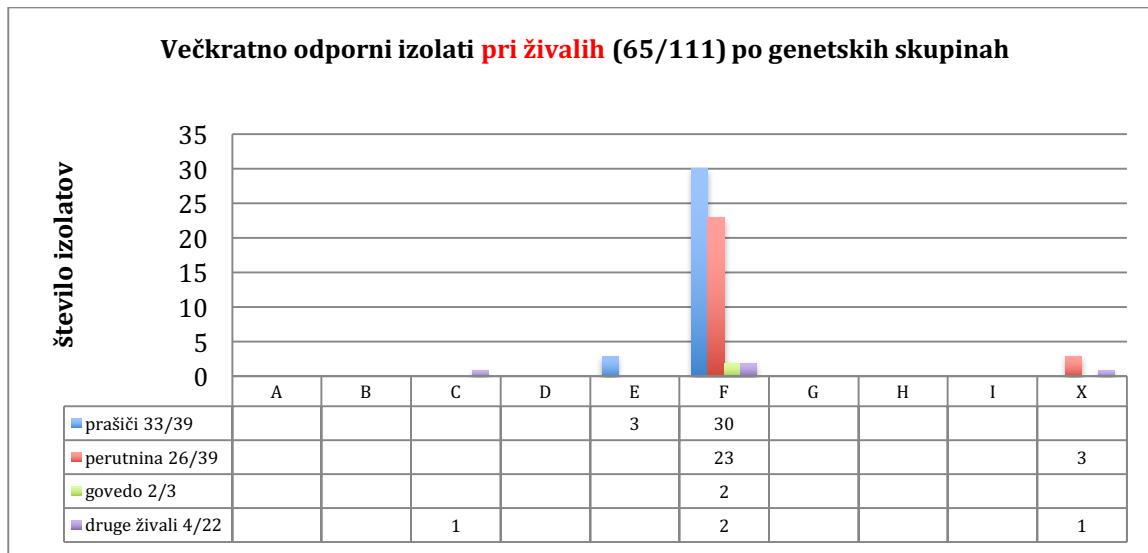
Večkratno odpornost (MDR) smo ugotovili pri 55,6 % (158/284) vseh izolatov. Pri ljudeh so bili ti izolati uvrščeni v 5 genetskih skupin, največ v skupini F in E (tabela 36 v prilogi). Pri živalih so bili ti izolati večinoma v skupini F. Pri živilih so bili MDR v 6 genetskih skupinah, od tega največ v skupini F in E.

Če primerjamo deleže MDR po genetskih skupinah, je bil velik delež MDR v genetskih skupinah E (78,1 %, 25/32) in F (67,1 %, 110/164). Zelo majhen delež MDR pa je bil v genetskih skupinah G (5 %, 1/20) in I (12,5 %, 2/16). V genetski skupini H nismo ugotovili MDR izolatov (0,0 %, 0/12). Rezultati niso zanesljivi za genetske skupine z manj kot 10 izolatov: A (75,0 %, 3/4), B (25,0 %, 1/4), C (66,7 %, 6/9) in D (100 %, 2/2).



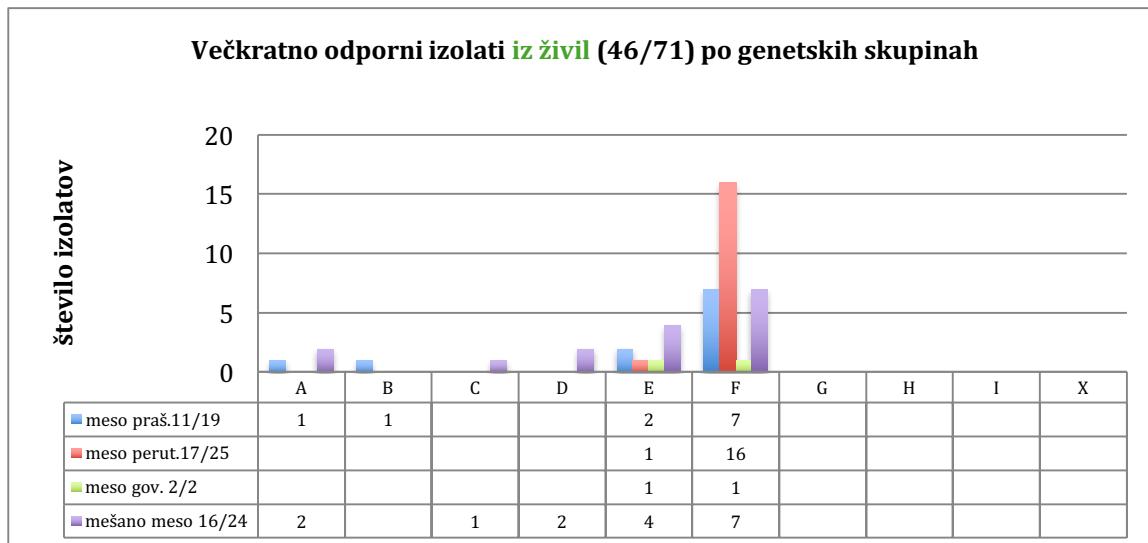
Slika 17: Število MDR izolatov po genetskih skupinah in kategorijah (št. MDR izolatov/št. vseh izolatov)

Figure 17: Number of MDR isolates regarding genetic groups and categories (No. of MDR isolates/No. of all isolates)



Slika 18: Število MDR izolatov po genetskih skupinah pri živalih (št. MDR izolatov/št. vseh izolatov)

Figure 18: Number of MDR isolates from animals regarding genetic groups (No. of MDR isolates/No. of all isolates)



Slika 19: Število MDR izolatov po genetskih skupinah iz živil (št. MDR izolatov/št. vseh izolatov)

Figure 19: Number of MDR isolates from foodstuffs regarding genetic groups (No. of MDR isolates/No. of all isolates)

4.3.3 Število izolatov posameznih rezistotipov po kategorijah in genetskih skupinah.

Po pogostosti so izstopali štirje rezistotipi (tabela 37). Najpogosteji je bil rezistotip ACNaSuT, kjer so bili vsi izolati v genetski skupini F (100 %). Rezistotip ACSuT smo ugotovili v dveh genetskih skupinah F in G, največ v genetski skupini F (87,9 %). Rezistotip ASuT smo ugotovili v štirih genetskih skupinah C, D, E in I z največjim deležem v skupini E (66,7 %). Večina izolatov z rezistotip Su je bila skupini F (93,3 %).

Tabela 37: Število izolatov posameznih rezistotipov po kategorijah in genetskih skupinah

Table 37: Number of isolates of individual resistotypes regarding categories and genetic groups

Odporni na št. skupin antibiotikov	Rezistotip	Človek	Žival	Živilo	Drugo	SKUPAJ	Genetska skupina	A	B	C	D	E	F	G	H	I	X ^a
6	ACGNaSuT		6			6	F						6				
6	ACGNaSuTTm		3	1		4	FX ^a						2				2
5	ACGSuT	1		1		2	FE						1	1			
5	ACNaSuT	15	25	13	2	55	F						55				
5	ACNaSuTTm	1	5	1	2	9	FX ^a						8				1
4	ACSuTTm	1				1	F						1				
4	ANaSuT			1		1	F						1				
4	CGNaSuTm		1			1	F						1				
4	ACSuT	3	17	13		33	FX ^a G						29	1			3
3	GNaSuTm				1	1	F						1				
3	ACSu		1			1	F						1				
3	AGT		1			1	E						1				
3	ANaSu			1		1	F						1				
3	ANaSuTm		1			1	E						1				
3	ASuT	18	3	10	2	33	C D E I X ^a						6	2	22	2	1
3	ASuTTm	1		3		4	AX ^a						3				1
3	ATTm			1		1	B						1				
3	GNaSu		2			2	F						2				
3	GSuT		1			1	F						1				
2	ASu	3	1	2		6	E F G X ^a						2	1	1		2
2	AT			1	1	2	CX ^a						1				1
2	GSu		1			1	F						1				
2	NaSu	1	6			7	F						7				
2	SuT	2		1		3	GH						1	2			
1	G	2	1			3	G						3				
1	Na		1	3		4	FX ^a						3				1
1	Su	1	5	9		15	FI						14				1
1	T	4	1	1		6	ACGEH	1	2				1		1	1	
0	dobro občutljivi	40	30	8	1	79	B E F G H I X ^a	4	1	9	2	28	4	28	13	9	13
	SKUPAJ	53	81	63	8	284		4	1	9	2	28	136	7	3	3	12

X^a unikatni genotipi

4.3.4 Odpornost izolatov, najpogosteji rezistotipi in genetske skupine

Za lažjo primerjavo smo oblikovali štiri večje skupine, kjer smo združili nekatere genetske skupine, pri čemer smo upoštevali statistično značilost za kategoriji človek in žival:

- skupina I: izolati iz genetskih skupin A, B, C, D in H (skupine z manjšim številom izolatov);
- skupina II: izolati iz skupine F, ki je bila statistično značilna za živali;
- skupina III : izolati iz skupin E, G in I, ki so bile statistično značilne za ljudi;
- skupina IV: unikatni genotipi (X).

Tabela 38: Število in odstotek izolatov po skupinah I do IV glede na število skupin antibiotikov, proti katerim so odporni

Table 38: Number and percentage of the isolates in the groups I to IV regarding the number of antibiotic groups to which they are resistant

Odporni proti št. skupin antibiotikov	Vsí izolati genetske skupine	Skupina I manjše št. izolatov				Skupina II značilni za živali				Skupina III značilni za ljudi				Skupina IV unikatni genotipi			
		A-I in X ^a	Št. (%)	A	B	C	D	H	F	Št. (%)	E	G	I	Št. (%)	X ^a	Št. (%)	
6	10 (3,5)								8 (4,9)						2 (9,5)		
5	66 (23,2)								64 (39,0)					1 (1,5)		1 (4,8)	
4	36 (12,7)								32 (19,5)					1 (1,5)		3 (14,3)	
3	46 (16,2)			12 (38,7)					6 (3,7)			26 (38,2)			2 (9,5)		
2	19 (6,7)			3 (9,7)					9 (5,5)			4 (5,9)			3 (14,3)		
1	28 (9,9)			4 (12,9)					17 (10,4)			6 (8,8)			1 (4,8)		
0	79 (27,8)			12 (38,7)					28 (17,1)			30 (44,1)			9 (42,9)		
SKUPAJ	284 (100,0)			31 (100,0)					164 (100,0)			68 (100,0)			21 (100,0)		
MDR >3	158 (55,6)			12 (38,7)					110 (67,1)			28 (41,2)			8 (38,1)		

X^a unikatni genotipi

V skupini I (tabela 38) so bili izolati, odporni proti največ trem skupinam antibiotikov. Dobro občutljivih izolatov je bilo največ v skupini III, značilni za ljudi, najmanj pa v skupini II, značilni za živali. Večkratno odpornih izolatov je bilo največ v skupini II, v ostalih treh skupinah pa je bil delež MDR podoben. V skupini II, značilni za živali, je bilo največ izolatov odpornih proti širim in petim skupinam antibiotikov. V skupini III, značilni za ljudi, pa je bilo največ izolatov odpornih proti trem skupinam antibiotikov.

Izolate z rezistotipom ACNaSuT (tabela 39), ki je bil statistično značilno ($p < 0,05$) najbolj pogost pri živalih in med njimi najbolj pogost pri prašičih, smo ugotovili samo v II. skupini, statistično značilni za živali.

Tabela 39: Razporeditev izolatov s tremi najpogostejšimi rezistotipi po skupinah I do IV

Table 39: Allocation of isolates with the three most frequent resistotypes into groups I to IV

Rezistotip	Genetska skupina	Skupaj št.	I. skupina	II. skupina	III. skupina	IV. skupina
			genetske skupine A B C D H	genetska skupina F	genetske skupine E G I	genotipi X^a
ASuT	C D E I X ^a	33	8 (24,2)		24 (72,7)	1 (3,0)
ACSuT	F G X ^a	33		29 (87,9)	1 (3,0)	3 (9,1)
ACNaSuT	F	55		55 (100,0)		

X^a unikatni genotipi

Izolate z rezistotipom ACSuT, ki je bil statistično značilno ($p < 0,05$) najbolj pogost pri živalih in med njimi najbolj pogost pri perutnini, smo ugotovili večinoma v II. skupini, statistično značilni za živali. V III. skupini je bil en izolat pri človeku in v IV. skupini trije izolati (iz človeka, iz prašiča in iz drugih živali – kanarčka).

Izolate z rezistotipom ASuT, ki je statistično značilen ($p < 0,05$) za ljudi, smo ugotovili večinoma v III. skupini, statistično značilni za ljudi (15 izolatov iz ljudi, dva iz proizvodnih živali in 7 iz živil). Iz I. skupine sta bila dva izolata iz ljudi, trije iz živil, eden iz drugih živali (pes) in dva iz kategorije drugo (mesno-kostna moka).

4.3.5 Odpornost proti posameznim antibiotikom v posameznih genetskih skupinah glede na izvor izolatov

Pri izolatih iz ljudi (tabela 40) je bila v genetski skupini E ekstremno visoka odpornost proti ampicilinu, sulfometoksazolu in tetraciklinu. V genetski skupini F je bila zelo velika odpornost proti ampicilinu, kloramfenikolu, nalidiksinski kislini, sulfometoksazolu in tetraciklinu. V skupinah G in I je bila odpornost proti posameznim antibiotikom srednja (tudi proti gentamicinu). V genetski skupini C so bili le 4 izolati, vendar so imeli podobno odpornost kot v skupini E.

Tabela 40: Število in odstotek izolatov, odpornih proti posameznim antibiotikom, iz posameznih genetskih skupin iz ljudi

Table 40: Number and percentage of isolates from humans resistant to individual antibiotics from individual genetic groups

Genetska skupina	Št. vseh izolatov	Antibiotik (št. in % odpornih iz genetske skupine)						
		Človek		Ampicilin	Kloramfenikol	Gentamicin	Nalidiksinska kislina	Sulfometoksazol
		št. Izolatov	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)
A	4	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
B	4							
C	9	4	2 (50,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (50,0)	4 (100,0)
D	2							
E	32	19	14 (73,7)	1 (5,3)	1 (5,3)	0 (0,0)	14 (73,7)	15 (78,9)
F	164	32	18 (56,3)	18 (56,3)	0 (0,0)	17 (53,1)	19 (59,4)	18 (56,3)
G	20	12	2 (16,7)	1 (8,3)	2 (16,7)	0 (0,0)	2 (16,7)	1 (8,3)
H	12	4	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (50,0)	2 (50,0)
I	16	14	2 (14,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (21,4)	2 (14,3)
X ^a	21	7	5 (71,4)	1 (14,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	5 (71,4)	3 (42,9)
Skupaj	284	93	43 (46,2)	21 (22,6)	3 (3,2)	17 (18,3)	47 (50,5)	46 (49,5)

X^a unikatni genotipi

Pri izolatih iz živali (tabela 41) je bila odpornost v genetski skupini F ekstremno visoka proti sulfometoksazolu ter zelo visoka proti ampicilinu, kloramfenikolu, nalidiksinski kislini in tetraciklinu. Ugotovljena pa je tudi srednja odpornost proti gentamicinu.

Tabela 41: Število in odstotek izolatov, odpornih proti posameznim antibiotikom, iz posameznih genetskih skupin iz živali

Table 41. Number and percentage of isolates from animals resistant to individual antibiotics from individual genetic groups

Genetska skupina	Št. vseh izolatov	Antibiotik (št. in % odpornih iz genetske skupine)						
		Žival		Ampicilin	Kloramfenikol	Gentamicin	Nalidiksinska kislina	Sulfometoksazol
		št. Izolatov	št. (%)	št. (%)				
A	4							
B	4	1	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
C	9	1	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)
D	2							
E	32	3	3 (100,0)	0 (0,0)	1 (33,3)	0 (0,0)	2 (66,7)	3 (100,0)
F	164	86	54 (62,8)	54 (62,8)	12 (14,0)	47 (54,7)	70 (81,4)	53 (61,6)
G	20	5	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
H	12	4	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (25,0)
I	16	2	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
X ^a	21	9	4 (44,4)	4 (44,4)	2 (22,2)	2 (22,2)	4 (44,4)	4 (44,4)
Skupaj	284	111	62 (55,9)	58 (52,3)	16 (14,4)	49 (44,1)	77 (69,4)	62 (55,9)

X^a unikatni genotipi

Pri izolatih iz živil (tabela 42) je bila odpornost v skupini E in F ekstremno visoka proti ampicilinu, sulfometoksazolu in tetraciklinu. V skupini F je bila odpornost zelo visoka proti kloramfenikolu in visoka proti nalidiksinski kislini ter nizka proti gentamicinu.

Tabela 42: Število in odstotek izolatov, odpornih proti posameznim antibiotikom, iz posameznih genetskih skupin iz živil

Table 42: Number and percentage of isolates from foodstuffs resistant to individual antibiotics from individual genetic groups

Genetska skupina	Št. vseh izolatov	Živilo št. Izolatov	Antibiotik (št. in % odpornih iz genetske skupine)					
			Ampicilin	Kloramfenikol	Gentamicin	Nalidiksinska kislina	Sulfometoksazol	Tetraciklin
		št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)
A	4	3	3 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	3 (100,0)
B	4	3	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)
C	9	1	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)
D	2	2	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (100,0)	2 (100,0)
E	32	10	10 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (10,0)	10 (100,0)	7 (70,09)
F	164	42	31 (73,8)	29 (69,0)	2 (4,8)	19 (45,2)	40 (95,2)	30 (71,4)
G	20	3	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)	2 (66,7)
H	12	4	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
I	16							
X ^a	21	3	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)	0 (0,0)	1 (33,3)
Skupaj	284	71	49 (69,0)	29 (40,8)	2 (2,8)	21 (29,6)	57 (80,3)	47 (66,2)

X^a unikatni genotipi

Izolatov iz kategorije drugo (okolje in krmila) (tabela 43) je bilo samo 9. V genetski skupini C smo ugotovili ekstremno visoko odpornost proti ampicilinu in tetraciklinu ter zelo visoko odpornost proti sulfometoksazolu. V genetski skupini F je bila odpornost ekstremno visoka proti ampicilinu, kloramfenikolu, nalidiksinski kislini, sulfometoksazolu in tetraciklinu ter visoka odpornost proti gentamicinu.

Tabela 43: Število in odstotek izolatov, odpornih proti posameznim antibiotikom, iz posameznih genetskih skupin iz kategorije drugo

Table 43: Number and percentage of isolates from the category other resistant to individual antibiotics from individual genetic groups

Genetska skupina	Št. vseh izolatov	Drugο št. Izolatov	Antibiotik (št. in % odpornih iz genetske skupine)					
			Ampicilin	Kloramfenikol	Gentamicin	Nalidiksinska kislina	Sulfometoksazol	Tetraciklin
		št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)
A	4							
B	4							
C	9	3	3 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (66,7)	3 (100,0)
D	2							
E	32							
F	164	4	3 (75,0)	3 (75,0)	1 (25,0)	4 (100,09)	4 (100,0)	3 (75,0)
H	12							
I	16							
X ^a	21	2	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	1 (50,0)
Skupaj	9	7 (77,8)	4 (44,4)	1 (11,1)	5 (55,6)	7 (77,8)	7 (77,8)	

X^a unikatni genotipi

4.3.6 Primer prikaza rezultatov za epizootiološko analizo izolatov s prašičje farme

Če se ugotovi klinična slika na farmi, se odvzamejo vzorci pri bolnih ali poginulih oz. žrtvovanih živalih. Iz tukih teh živali se z bakteriološko preiskavo ugotavljajo bakterijski povzročitelji. Imeli smo priložnost spremljati situacijo na farmi A, kjer smo v osmih letih pri desetih odvzemih vzorcev iz klinično bolnih prašičev izolirali *S. Typhimurium* (tabela 44). V našo raziskavo smo vključili 16 izolatov, ki so imeli v istem odvzemu različen genotip in/ali rezistotip. Samo en izolat je bil dobro občutljiv, ostalih petnjst pa je bilo večkratno odpornih in je imelo 5 različnih rezistotipov. Najpogostejsa sta bila rezistotipa ACNaSuT (4 izolati, 3 odvzemi), značilen za izolate iz prašičev, in ACGNaSuT (6 izolatov, 4 odvzemi). Ugotovili smo tudi dva od štirih najbolj odpornih izolatov v naši raziskavi z rezistotipom ACGNaSuTTm.

Tabela 44: Primer epizootiološke analize izolatov s prašičje farme

Table: 44: Example of epizootiologic analysis of isolates from a pig farm

Genotipi farmi A	Št. izolatov (št. rezistotipov)	Leto					1. odvzem	2. odvzem	1. odvzem	2. odvzem	1. odvzem	2. odvzem
		2000	2001	2002	2007							
		1. odvzem	2. odvzem	3. odvzem	4. odvzem	5. odvzem						
F5	1(1 ^a)											
F7	2 (2)											
F9	2 (2)	ACNaSuT		GNaSu								
F11	3 (1)	ACNaSuT					ACGNaSuT	GNaSu				
F13	1 (1)		ACGNaSuTTm									
F14	1 (1)				ACGNaSuT							
F18	1 (1)		ACGNaSuT									
F22	1 (1)			ACGNaSuT								
F23	1 (1)		CGNaSuTm									
F33	1 (1)		ACGNaSuT									
F34	1 (1)			ACGNaSuT								
X 14	1 (1)											ACGNaSuTTm

^adobro občutljiv

Ugotovili smo 11 genotipov iz genetske skupine F, od katerih so bili trije ugotovljeni več kot enkrat (F7, F9 in F11). To so bili v naši raziskavi najpogostejsi genotipi pri izolatih iz prašičev. Pri genotipih F7 in F9 smo ugotovili po dva različna rezistotipa, pri ostalih genotipih pa po en rezistotip.

5 RAZPRAVA

Salmoneloza je zoonoza, ki predstavlja resen zdravstveni problem v svetovnem merilu. Nadzor nad salmonelozami je obvezen in reguliran na ravni držav in EU. Usklajujejo se metode za izolacijo, serotipizacijo, molekularno tipizacijo ter ugotavljanje odpornosti za učinkovit nadzor, odkrivanje virov in načrtovanje ukrepov za zmanjšanje okužb pri ljudeh. *Salmonella Typhimurium* je drugi najpogosteje izoliran serovar pri humanih salmonelozah v Sloveniji (od leta 2000 do 2016 povprečno 46 primerov na leto; NIJZ, 2017) in EU (v letu 2015 10.997 primerov), v nekaterih državah EU pa celo najpogostejši (EFSA, 2015; Lienemann 2015). Čeprav večina salmoneloz pri ljudeh izzveni sama po sebi, lahko nastopijo resni zapleti in tudi smrt, pri čemer sodi serovar *Typhimurium* med najpogosteje izolirane serovare pri rizičnih skupinah ljudi (Hugas in sod., 2014; Lienemann in sod., 2015). *S. Typhimurium* spada hkrati tudi med najbolj odporne serovare, pri katerih se število večkratno odpornih izolatov povečuje (32,5 % v letu 2014 in 44,4 % v letu 2015) (EFSA 2017), k temu pa prispevajo povečana raba antibiotikov v humani in veterinarski medicini, večja mobilnost ljudi in živali ter večja industrializacija (Kuang in sod. 2015).

EFSA in ECDC na ravni EU vsako leto pripravita skupna poročila o trendih in virih zoonoz, izbruhovalih s hrano, ter skupna poročila o odpornosti proti protimikrobnim zdravilom pri zoonotičnih in indikatorskih bakterijah. Zaradi različnega števila vključenih držav, različnih nacionalnih programov nadzora, po katerih se poročajo rezultati, različnih uporabljenih metod in načinov interpretacije je primerjava podatkov med leti otežena. Odpornost proti antibiotikom in trendi so vezani na državo, njeno kulturo, na dovoljene in uporabljene antibiotike ter serovar, zato so rezultati znotraj EU pričakovano različni. Medicinski in veterinarski laboratoriji postopoma usklajujejo metode in interpretacijo rezultatov. Tudi število držav, ki usklajeno poročajo svoje rezultate, se povečuje (EFSA, 2017).

Samo podatki, ki so pridobljeni in interpretirani po enotnem protokolu, so primerljivi in omogočajo analize trendov ter so lahko podlaga za smernice in ukrepe. Vzpostavitev baze podatkov na državni in mednarodni ravni je osnova za dobro epidemiološko analizo pri izbruhu ter posledično boljši nadzor, hkrati pa omogoča ugotavljanje obsega izbruha v širšem

merilu. V Sloveniji zbiramo podatke o odpornosti salmonel ločeno v medicinskih in veterinarskih laboratorijih glede na zahteve ECDC in EFSA, nimamo pa združenih podatkov, to je nacionalne baze, ki bi bila lahko v veliko pomoč pri epidemioloških analizah.

Z našo raziskavo smo med drugim žeeli oblikovati nacionalno bazo za izolate *S. Typhimurium*, zato smo primerjali rezistotipe in genotipe 284 izolatov iz ljudi, živali, živil in okolja iz obdobja 2000–2012, shranjenih v zbirkah medicinskih in veterinarskih laboratorijev.

5.1 GENOTIPI

Razpravo o genotipih PFGE, ugotovljenih v različnih raziskavah, ovira dejstvo, da zanesljivo primerjavo lahko dosežemo le z uporabo skupnih podatkovnih baz genotipov PFGE (Long in sod., 2010). Vzpostavitev skupne zbirke podatkov za patogene bakterije iz živil na ravni EU bo po vzorcu PulseNet nedvomno olajšala medlaboratorijsko primerjavo rezultatov tipizacije in okreplila nadzor nad patogeni, ki se prenašajo s hrano

Z analizo PFGE smo dobili vpogled v genetsko raznovrstnost naših izolatov ($n = 284$). Ugotovljenih je bilo 96 genotipov, ki smo jih razvrstili v devet genetskih skupin (A-I) in 21 unikatnih genotipov s 64,9%-stopnjo podobnosti. V raziskavi izolatov *S. Enteritidis* iz ljudi, živali in živil v Sloveniji, kjer je bil uporabljen enak kriterij za razvrstitev v genetske skupine, je Podpečan (2014) ugotovil pri 368 izolatih 60 genotipov in štiri genetske skupine. Tako smo potrdili prvo hipotezo, da imajo v Sloveniji sevi *S. Typhimurium* večjo genetsko raznolikost kot sevi *S. Enteritidis*.

Tudi drugi raziskovalci ugotavljajo, da ima *S. Enteritidis* visoko genetsko homogenost v primerjavi s *S. Typhimurium*, kjer pa so mnenja deljena (Fadlallah in sod., 2017). Almedia in sod. (2016) poročajo, da so ugotovitve avtorjev zelo različne glede na vir izolatov, ki jih primerjajo, in glede kriterijev za razvrščanje v genetske skupine. V Braziliji so pri primerjavi med rejami prašičev ugotovili veliko genetsko homogenost (več kot 90%-podobnost), pri primerjavi izolatov iz ljudi in drugih vrst pa veliko genetsko raznovrstnost ($\geq 40\%$ -podobnost). Pri primerjavi izolatov iz prašičev in ljudi so ugotovili 55%-podobnost. Pri 70 izolatih so ugotovili 62 različnih genotipov, dve genetski skupini (58,2% in 60,3%-podobnost) in v drugi dve podskupini. V Maleziji so pri primerjavi izolatov iz ljudi in živali

ugotovili veliko genetsko raznolikost (45-% podobnost), pri 47 izolatih so ugotovili 39 genotipov (Benacer in sod., 2010).

Potrdili smo tudi drugo hipotezo, da so posamezni genotipi stalno prisotni (v letih 2000 do 2012). Prevladujoči genotip F9 smo ugotovili pri polovici izolatov iz najpogostejše genetske skupine F (50,6 %; 83/164) oziroma pri skoraj tretjini vseh izolatov (29,2 %; 83/284). Prisoten je bil v vseh kategorijah in v vseh letih. Genotip F9 je verjetno razširjen zaradi genetske in časovne stabilnosti, kot opisuje Ke s sod. (2014). Podobno kot v naši raziskavi so posamezne prevladujoče genotipe ugotavljalci tudi drugi avtorji. Na Finskem so v šestletnem obdobju pri 375 izolatih iz ljudi ugotovili prevladujoči genotip PFGE v 39,2 % (Lienemann in sod., 2015). Na Kitajskem so v šestletnem obdobju pri 702 izolatih iz ljudi ugotovili prevladujoči genotip PFGE v 21,4 % izolatov (Ke in sod., 2012). V Minnesoti so v sedemletnem obdobju pri izolatih iz ljudi ($n = 1004$) ugotovili prevladujoči genotip PFGE v 11 % (Rounds, 2010). Na Japonskem so v 33-letnjem obdobju pri izolatih iz goveda ($n = 545$) ugotovili prevladujoči genotip PFGE v 37,6 % (Tamamura in sod., 2011). V ZDA so ugotovili prevladujoči genotip PFGE pri 29,1 % izolatov ($n = 128$) iz različnih proizvodnih živali (prašičev, goveda, piščancev in puranov), kar nakazuje, da ta genotip verjetno kroži med njimi (Foley in sod., 2006).

Epidemioloških povezav nismo mogli ugotavljati, ker so bili izolati časovno in geografsko razpršeni. Pet od skupno devetih genetskih skupin je vključevalo izolate iz ljudi, živali in živil. Pri vseh omenjenih kategorijah smo ugotovili genotipe F1, F7 in F9. Izolate s podobnimi genotipi so ugotovili v klavnici in trgovinah v epidemiološki raziskavi, kjer so primerjali genotipe izolatov iz prehranske verige (Chai in sod., 2016).

Delno smo potrdili tretjo hipotezo, da se večina sevov, izoliranih iz različnih vrst živali, genetsko razlikuje. Pri izolatih iz prašičev ($n = 47$) smo tako ugotovili 24 genotipov, pri izolatih iz perutnine ($n = 39$) pa 9 genotipov, od katerih so bili samo trije prisotni pri obeh vrstah. Pri izolatih iz ljudi ($n = 93$) smo ugotovili 38 genotipov, od katerih je bilo 26 genotipov ($n = 32$) ugotovljenih le pri ljudeh. Večja pestrost genotipov pri izolatih iz prašičev v primerjavi z izolati iz perutnine bi lahko bila povezana z daljšo življensko dobo prvih in tehnologijo reje pri vzreji brojlerjev in puranov, kjer sta običajni depopulacija in razkuževanje

objektov. Pri ostalih vrstah živali je bilo za primerjavo premajhno število izolatov. Pri ljudeh lahko k večji pestrosti prispevata globalizacija prehranskega trga in večja mobilnost.

Da se sevi, izolirani iz različnih živalskih vrst, razlikujejo, navaja tudi Foley s sod. (2006). Pri primerjavi izolatov iz različnih proizvodnih živalih so ugotovili veliko pestrost genotipov PFGE, med katerimi je bil samo en genotip prisoten pri vseh štirih živalskih vrstah in dva pri dveh.

Število genotipov je verjetno povezano tudi s prevalenco pri posameznih vrstah živali. V EU je bil v letu 2012 ugotavljen delež serovara *S. Typhimurium* pri vzorcih, pozitivnih na salmonelo, pri prašičih v 35,4 % (n = 515), pri govedu v 55,3 % (n = 166), pri puranih v 2,5 % (n = 17) in pri kokoših v 3,7 % (n = 161) (EFSA, 2014).

Potrdili smo četrto hipotezo, da imajo sevi izolirani iz živil širši spekter genotipov, kot sevi, izolirani iz posameznih živalskih vrst.

Pri izolatih iz živil (n = 71) smo ugotovili 28 genotipov. Pri izolatih iz mesa prašičev (n = 19) smo ugotovili 14 genotipov, v primerjavi z izolati iz prašičev (n = 47), kjer smo ugotovili 24 genotipov. Razmerje med številom genotipov in številom izolatov je v živilih 0,74, pri prašičih pa 0,51. To pomeni, da je pestrost izolatov v živilih prašičjega izvora večja.

Pri izolatih iz mesa perutnine (n = 25) smo ugotovili 9 genotipov, v primerjavi z izolati iz perutnine (n = 39), kjer smo ugotovili 9 genotipov. Razmerje med številom genotipov in številom izolatov je v živilih 0,36, pri perutnini pa 0,23. To pomeni, da je pestrost izolatov večja tudi v živilih perutninskega izvora. S tem smo potrdili 4. hipotezo.

Pri izolatih iz živil (n = 71) smo ugotovili 28 genotipov. Od tega je bilo 20 genotipov (25 izolatov) ugotovljenih samo v živilih, 2 genotipa (19 izolatov) v živilih in pri živalih, 2 genotipa (13 izolatov) v živilih in pri ljudeh ter 4 genotipi (195 izolatov) v živilih, pri ljudeh in živalih. Genotipi, ki jih nismo ugotovili pri izolatih iz ljudi in živali v Sloveniji, bi lahko izvirali iz uvoženih živil ali od kontaminacije klinično zdravih klicenoscev v živilski industriji, kjer za razliko od proizvodnih živali od leta 2003 ni več monitoringa.

5.2 ODPORNOST IZOLATOV

V naši raziskavi smo ugotovili 27,8 % (79/284) izolatov, ki so bili občutljivi za vse testirane antibiotike. Največji delež (43,0 %, 40/93) smo ugotovili pri izolatih iz ljudi, sledijo izolati iz živali (27,0 %, 30/111), najmanj pa pri izolatih iz živil (11,3 %, 8/71) in izolatih iz drugih vzorcev (11,1 %, 1/9). Podatki iz literature o deležu občutljivih izolatov *S. Typhimurium* iz ljudi so zelo različni, od 7,4 % v Belgiji do 50,0 % na Danskem, s povprečjem 38,5 % v EU (Van Boxstael in sod., 2012; Torpdahl in sod., 2013; EFSA, 2017). Tudi pri izolatih iz živali se podatki zelo razlikujejo, odvisno od države in živalske vrste. O najmanjšem deležu (7,7 %) poročajo pri puranih v Italiji, o največjem deležu pa pri proizvodnih živalih na Švedskem (74,0 %) (Graziani in sod., 2008; Swedres-Swarm, 2012). Pri živalih smo ugotovili velike razlike v deležu občutljivih izolatov med proizvodnimi (15,7 %, 14/89) in drugimi živalmi (72,7 %, 16/22). Da so izolati iz drugih živali večinoma dobro občutljivi na antibiotike, so ugotovili tudi pri golobih v Italiji (Graziani in sod., 2008) in pri divjih pticah v severni Angliji (Hughes in sod., 2008). Sklepamo lahko, da prostoživeče živali, podobno kot navaja Hughes s sod. (2008), in živali iz živalskega vrta, ki imajo večinoma dobro občutljive seve, ne predstavljajo velikega tveganja za prenos odpornih izolatov na ljudi.

Izolatov z razširjenim spektrom beta laktamaz (ESBL), ki jih ugotavljamo z občutljivostjo na indikatorska antibiotika cefotaksim in ceftazidim, nismo ugotovili. V EU je delež odpornih izolatov proti cefotaksimu in ceftazidimu nizek (1,1 % in 0,8 %), na Kitajskem in Tajvanu pa so deleži pri izolatih iz ljudi že več kot 10 % (EFSA, 2017; Ke in sod., 2014; Torpdahl in sod., 2013). Glede na majhno število ugotovljenih odpornih izolatov so podatki skopi. Pri tem je treba omeniti, da pri rutinski preiskavi na salmonelle sevov z razširjenim spektrom beta laktamaz ne iščemo usmerjeno. Predvidevamo, da bi z uporabo selektivnih gojišč s cefalosporini 3. generacije našli tudi salmonelle z ESBL.

V naši raziskavi smo ugotovili 43 % večkratno odpornih izolatov pri ljudeh, kar nas uvršča med države z visoko stopnjo večkratno odpornih izolatov. Deleži večkratno odpornih izolatov so po podatkih iz literature zelo različni; od 11 % na Finskem (Lienemann in sod., 2015) do 86,8 % na Kitajskem (Ke in sod., 2014). Slovenija ima s 43 % bistveno večji delež MDR od

ZDA (29 %) in je primerljiva z Belgijo (43,9 %) (Wedel in sod., 2005; Torpdahl in sod., 2013).

Pri živalih smo ugotovili še višji delež MDR izolatov kot pri ljudeh, in sicer 58,6 %, pri čemer je bila ugotovljena statistično pomembna razlika v deležu večkratno odpornih izolatov med proizvodnimi (68,5 %) in drugimi živalmi (18,2 %). V tehnologiji proizvodnje bi zato morali sprejeti ukrepe za preprečevanje izbruhovalnih bolezni in širjenja bakterijskih patogenov ter izvajati redno laboratorijsko diagnostiko, ki bi pripomogla k zmanjšanju rabe antibiotikov in empiričnega zdravljenja. Večkratna odpornost proti petim in več skupinam antibiotikov je bila ugotovljena izključno pri proizvodnih živalih, z izjemo enega izolata iz miške, ki pa je bila ulovljena na perutninski farmi in je imela enak rezistotip in enak genotip (F9) kot izolati iz perutnine v istem časovnem obdobju. To je bilo lahko naključje, bolj verjetno pa je, da so glodalci vir okužbe in prenosa salmonel na farmah. Enak rezistotip in genotip smo ugotovili tudi pri izolatih iz živil perutninskega izvora in iz ljudi v letu 2011.

Največji delež večkratno odpornih izolatov smo ugotovili pri izolatih iz živil (64,8 %). Nismo pa ugotovili velike razlike glede na izvor živila. Pri izolatih iz mesa prašičev je bil delež 57,9 %, iz mesa perutnine pa 68,0 %. Delež večkratno odpornih pri izolatih iz mesa prašičev je večji od deleža v Belgiji (26,7 %) in povprečja EU (54,1 %) (Van Boxstael in sod., 2012; EFSA, 2017). Po nam znanih podatkih v literaturi ni podatkov o večkratno odpornih izolatih pri perutnini.

V naši raziskavi so bili najbolj pogosto ugotovljeni izolati z rezistotipi ACNaSuT (19,4 %), ACSuT (11,6 %), ASuT (11,6 %) in Su (5,3 %). Izolati z rezistotipoma ACNaSuT in ACSuT so bili statistično značilno ($p < 0,05$) pogostejši pri živalih (47,2 % in 51,5 %), izolati z rezistotipom ASuT pa pri ljudeh (58,1 %).

Najpogostejši rezistotip pri izolatih iz ljudi je bil ASuT (54,5 %), drugi najpogostejši pa ACNaSuT (27,3 %). Rezistotip ACSuT smo ugotovili samo pri 9,1 % izolatov, medtem ko so v drugih raziskavah poročali, da je bil rezistotip ACSSuT najpogostejši pri izolatih iz ljudi (npr. Kitajska 27,0 %) (Lienemann in sod., 2015; Wedel in sod., 2005; Torpdahl in sod., 2013; Ke in sod., 2014). Dodatno so namreč testirali tudi občutljivost za streptomicin, ki ga v našem naboru antibiotikov na komercialni mikrotitrski plošči ni bilo.

Izolati z rezistotipom ACNaSuT so bili statistično pomembno pogosteji pri prašičih (85,7 %), izolati ACSuT pa pri perutnini (75,0 %). Edina razlika je bila pri fluorokinoloni. Rezistotip odseva običajno izbiro antibiotikov za določeno živalsko vrsto. S tem smo potrdili peto hipotezo, da je vzorec rezistence vezan na določeno živalsko vrsto zaradi usmerjene uporabe antibiotikov.

Primerjali smo odpornost pri izolatih iz ljudi, živil, prašičev in perutnine v treh obdobjih: od 2000 do 2004, od 2005 do 2008 in od 2009 do 2012. Ugotovili smo, da se je delež odpornih izolatov povečal samo pri izolatih iz živil in s tem delno potrdili šesto hipotezo, da se obseg rezistence z leti povečuje. Pri izolatih iz živil se je najbolj povečala odpornost proti ampicilinu, sulfonamidom in tetraciklinu, to je proti največkrat uporabljenim antibiotikom pri zdravljenju živali in ljudi v EU. Povečala se je tudi odpornost proti nalidiksinski kislini in trimetoprimu. Povečal se je delež rezistotipov ASuT in ACNaSuT, delež MDR izolatov in tudi delež MDR ≥ 5 . Nasprotno pa smo ugotovili, da se je povečal delež dobro občutljivih izolatov iz ljudi in perutnine. Pri izolatih iz ljudi se je povečal le delež rezistotipov ASuT in ACSuT, pri izolatih iz prašičev pa delež rezistotipa ACNaSuT (slike 10 do 13). Razlog za povečanje odpornosti izolatov iz živil bi lahko bil v večjem uvozu živil, predvsem mesa prašičev, zaradi nezadostne samooskrbe (podatki o izvoru uvoženega mesa niso na voljo). Po podatkih MKGP se je stopnja samooskrbe s prašičjim mesom v Sloveniji gibala od 80 % v obdobju 2000 do 2004, okoli 70 % v obdobju 2005 do 2008, pod 55 % v letu 2009 in 34,7 % v letu 2016. Samooskrba s perutninskim mesom po letu 1997 niha med 103 in 117 % – stalni presežki (MKG, 2017).

Ugotovili smo, da je odpornost izolatov (pogostnost in rezistotipi) povezana z antibiotiki, ki se uporabljajo pri zdravljenju ljudi, proizvodnih in drugih živali oz. pri različnih vrstah proizvodnih živali (prašiči in perutnina). Pogostost uporabe in nabor antibiotikov se med državami razlikujeta. Ocena odpornosti je odvisna tudi od uporabljenih mejnih vrednosti (klinične in epidemiološke mejne vrednosti).

V veterinarski medicini so že vrsto let pri zdravljenju proizvodnih živali med najpogosteje uporabljenimi antibiotiki ampicilin, tetraciklin in sulfonamidi. Večina držav članic EU poroča o visokem do zelo visokem deležu odpornosti proti tem antibiotikom pri izolatih iz proizvodnih živali in živil živalskega izvora, kar smo potrdili tudi v naši raziskavi. V

Sloveniji se za zdravljenje pogosto uporablja tudi florokinoloni. Po podatkih Evropske agencije za zdravila EMA (angl. European Medicines Agency) (EMA, 2014) je Slovenija v evropskem vrhu po porabi fluorokinolonov za zdravljenje pri proizvodnih živalih, kar bi lahko bil razlog za visoko odpornost proti nalidiksinski kislini in ciprofloksacinu pri izolatih iz proizvodnih živali.

Pri izolatih iz prašičev smo ugotovili 76,6 % večkratno odpornih izolatov, med katerimi je imelo 29,8 % rezistotip ACNaSuT. Podobno je bilo tudi v EU pri izolatih iz prašičev pitancev ugotovljena zelo visoka odpornost proti ampicilinu, tetraciklinu in sulfonamidom. V letu 2015 je bilo 52,4 % izolatov iz prašičev pitancev MDR z najpogostejšim rezistotipom ASuT (EFSA, 2017). V naši raziskavi (tabela 34) je bil ta rezistotip z 11,6 % izolatov šele tretji najpogostejši. Največji delež (54,5 %) izolatov s tem rezistotipom smo ugotovili pri ljudeh, medtem pri živalih pa samo v 9,1 %. Ta rezistotip z dodatno odpornostjo proti kloramfenikolu in nalidiksinski kislini (ACNaSuT) je bil najpogostejši (19,4 %) med vsemi rezistotipi. Najbolj pogost je bil pri izolatih iz živali (45,5 %). V Belgiji je bilo pri prašičih pitancih 31,2 % večkratno odpornih izolatov s tretjim napogostejšim rezistotipom ACSSuT (Van Boxstaet in sod., 2013). V skandinavskih državah je situacija še boljša. Na Švedskem je bilo tako samo 11 % večkratno odpornih izolatov iz živali z najpogostejšim rezistotipom ACSSuT (Swedes-Swarm, 2016).

Pri perutnini smo v naši raziskavi ugotovili v primerjavi s prašiči nekoliko manjši delež večkratno odpornih izolatov (59 %) z najpogostejšim rezistotipom ACSuT.

Ciprofloksacin je antibiotik izbora pri zdravljenju invazivnih okužb s salmonelami pri odraslih. V naši raziskavi smo ugotovili, da je bilo 18,3 % izolatov iz ljudi odpornih proti ciprofloksacinu. Podatki v literaturi za odpornost proti ciprofloksacinu pri izolatih iz ljudi niso primerljivi, ker niso bili uporabljeni enotni kriteriji za interpretacijo rezultatov (EFSA, 2014). Večina rezultatov je interpretirana skladno s kliničnimi mejnimi vrednostimi (CLSI), ki se od epidemioloških mejnih vrednosti (EUCAST ECOFFs), ki smo jih uporabili v naši raziskavi, razlikujejo po precej višjih mejnih vrednostih (CLSI 4 mg/L, EUCAST CBP 1 mg/L in EUCAST ECOFFs 0,125mg/L). Če bi uporabili za interpretacijo rezultatov mejne vrednosti CLSI, bi bili vsi naši izolati dobro občutljivi. Pri vseh izolatih smo ugotovili enak delež odpornih proti ciprofloksacinu in nalidiksinski kislini.

Odpornost proti ciprofloksacinu in nalidiksinski kislini (zadnja je pokazatelj odpornosti proti fluorokinolonom) je bila v naši raziskavi ugotovljena pri izolatih iz perutnine v 33,3 %, pri izolatih iz prašičev pa v 70,2 % (tabela 30 v prilogi). V Belgiji so pri prašičih pitancih ugotovili 3,4 % odpornih izolatov proti nalidiksinski kislini, kar je skladno z rezultati pri izolatih iz mesa prašičev (Van Boxstael in sod., 2013). Tudi v naši raziskavi smo pri izolatih iz mesa prašičev pričakovali podobno visok delež odpornih izolatov, ugotovili pa smo jih samo v 31,6 %. Podobno razmerje med izolati iz prašičev in mesa prašičev smo ugotovili tudi pri odpornosti proti kloramfenikolu (63,8 % proti 31,6 %). Pri izolatih iz perutnine in govedi pa so bili rezultati iz živali in pripadajočih živil primerljivi. Razlog za drugačno razmerje pri prašičih bi bil lahko posledica uporabe antibiotikov za zdravljenje, saj je bilo 59,6 % izolatov iz kliničnih primerov v primerjavi z izolati iz perutnine, kjer so skoraj vsi izolati iz klinično zdravih živali (monitoring).

Pri primerjavi izolatov iz prašičev in perutnine smo ugotovili pri izolatih iz prašičev večjo odpornosti proti gentamicinu, nalidiksinski kislini in trimetoprimu ($p < 0,05$). Pri piščancih in puranih se za zdravljenje največkrat uporablajo amoksicilin, sulfonamidi, florokinoloni in trimetoprim, manj pogosto pa tetraciklini, florfenikol in kolistin (večinoma peroralno v krmi ali raztopljeni vodi za pitje). Pri matičnih jatah in nesnicah se uporablajo antibiotiki izjemoma (v vzrejnih jatah). Pri piščancih je glede na kratko življensko dobo in upoštevanje karence v primerjavi s purani manjša uporaba antibiotikov. Pri prašičih se za zdravljenje uporablajo amoksicilin, florokinoloni, sulfonamidi, trimetoprim, tetraciklini, florfenikol, v manjši meri pa tudi gentamicin. Izbera zdravil je odvisna tudi razpoložljivosti zdravil na trgu (registracije).

5.3 GENOTIPI IN REZISTOTIPI

V naši raziskavi smo žeeli ugotoviti tudi, ali obstajajo povezave med genotipi in rezistotipi. Dionisi in sod. (2009) so pri izolatih *S. Typhimurium* iz ljudi ugotovili, da je bilo 90 % rezistotipov ASSuT in ACSSuT vključenih v dve genetski skupini (s 73-% stopnjo podobnosti). To bi lahko nakazovalo, da je rezistotip povezan z določeno klonalno linijo. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi v naši raziskavi.

V genetski skupini F je bilo največ izolatov iz živali ($p < 0,5$). Večkratno odpornih izolatov je bilo 67,1 % (110/164). Najpogostejsa vzorca odpornosti sta bila s 17,7 % ACSuT (29/164) in s 33,5 % ACNaSuT (55/164). Prvi je značilen za izolate iz perutnine in drugi za izolate iz prašičev ($p < 0,05$). V naši raziskavi smo v genetski skupini F ugotovili, da so bili v njej vsi izolati rezistotipa ACNaSuT (100 %) ter večina izolatov rezistotipov ACSuT (87,9 %) in Su (93,3 %), kar nakazuje, da verjetno pripadajo trem klonalnim linijam.

Ugotovili smo klonsko razširjenost najpogostejsega genotipa F9 ($n = 83$), ki smo ga ugotovili v vseh letih in vseh kategorijah. Najbolj sta bila razširjena rezistotipa ACNaSuT ($n = 34$) in ACSuT ($n = 23$). Rezistotipa ASuT nismo ugotovili. Podobno razmerje smo ugotovili tudi pri genotipu F11 ($n = 17$; ACNaSuT $n = 9$, ACSuT $n = 3$).

Rezistotip ASuT je bil statistično značilen za ljudi ($p < 0,05$). Dve tretjini (66,6 %) izolatov je bilo v genetski skupini E, tretjina pa v genetskih skupinah C, D in I, nismo pa ga ugotovili v genetski skupini F statistično značilni za živali ($p < 0,05$).

Genetske skupine E, G in I smo najpogosteje ugotovili pri izolatih iz ljudi ($p < 0,5$), od katerih je bilo skupno 41,2 % večkratno odpornih izolatov z najpogostejsim vzorcem odpornosti ASuT (35,3 %). V genetskih skupinah z manjšim številom izolatov (A, B, C, D in H) je bilo skupno 38,7 % večkratno odpornih izolatov, z najpogostejsim rezistotipom ASuT (25,8 %).

Pri genetskih skupinah z več kot 12 izolati smo ugotovili velik delež večkratno odpornih izolatov v genetskih skupinah E in F (70,1 % in 67,1 %) ter velik delež dobro občutljivih izolatov v genetskih skupinah I, H in G (81,3 %, 75 % in 65 %).

Glede na pogostost ugotovljenih genotipov in rezistotipov ter njihove kombinacije kaže, da so glavni vir večkratno odpornih izolatov proizvodne živali in človek. Vir okužbe z izolati s kombinacijo genetska skupina F in rezistotip ACNaSuT bi lahko bile živali, predvsem prašiči, z izolati s kombinacijo genetska skupina F in rezistotip ACSuT pa perutnina. Ljudje bi bili lahko vir okužbe z izolati s kombinacijo genetskih skupin E in I z rezistotipom ASuT ter I in G z dobro občutljivimi izolati. Iz prostoživečih in zoo živali ($n = 14$) je bil samo en izolat

odporen proti tetraciklinu, vsi ostali pa dobro občutljivi. Uvrščeni so bili v genetske skupine B, F, G in H. Te živali ne predstavljajo tveganja za okužbo ljudi in živali z odpornimi izolati. V kategoriji drugih vzorcev ($n = 9$) je bilo 5 vzorcev iz okolja (odpadna voda, kompost in gnojevka). Vsi izolati so imeli različne genotipe (C3, F1, F12, F32, X18). Razen enega so bili vsi izolati večkratno odporni, od tega dva $MDR \geq 5$. V tem okolju so pogosto ekstremne razmere, pogosto pa si ekološko nišo delijo bolj ali manj odporni mikroorganizmi. V takih razmerah preživijo le najbolj odporni, kar je lahko razlog za prisotnost MDR. Glede na genotipe in rezistotipe so izolati iz skupine F verjetno izvirali iz živali. Za podrobnejšo analizo je bilo premalo vzorcev.

V eni epizootiološki enoti so lahko prisotni sevi z različnimi genotipi in rezistotipi, od katerih posamezni lahko perzistirajo več let, kot je razvidno iz primera prašičje farme A (tabela 44). V obdobju 8 let v 10 odvzemih vzorcev klinično bolnih prašičev smo ugotovili 11 genotipov iz genetske skupine F in en neopredeljen genotip ter 5 različnih rezistotipov z večkratno odpornostjo. Samo rezistotip ACNaSuT z genotipom F11 smo ugotovili v treh odvzemih v obdobju treh let. V enem odvzemu smo ugotovili izolate, ki so izkazovali tri rezistotipe in 4 genotipe. Na farmah z intenzivnim antibiotičnim zdravljenjem je lahko hud selekcijski pritisk, kar je lahko vzrok za preživetje sevov MDR. Hoelzer in sod. (2010) so pri preučevanju izolatov salmonel ugotovili, da tudi na posameznih govejih farmah istočasno najdemo različne genotipe in rezistotipe, od katerih posamezni perzistirajo dlje časa. Le-ti pa se lahko s časom spreminja, kar privede do novih sorodnih genotipov.

Zbrani podatki (baza) o tipiziranih izolatih lahko olajšajo in usmerijo epidemiološke raziskave izbrufov pri ljudeh in živalih, da lažje odkrijemo vir in preprečimo večje izbruhe. Hkrati lahko podatki o večkratno odpornih izolatih pripomorejo k ozaveščanju veterinarjev in rejcev živali, da je nujna zmernejša in bolj racionalna raba antibiotikov. Da služi svojemu namenu, je treba bazo stalno dopolnjevati z novimi izolati, zato bi bilo treba zagotoviti sredstva za minimalni monitoring pri vseh proizvodnih živalih in ugotavljanje lastnosti najpomembnejših serovarov. Za pridobitev kliničnih izolatov bi bilo treba tudi posodobiti pravilnike o ukrepih pri prašičih in govedu, kadar so živali iz monitoringa pozitivne, in pri pozitivnih kliničnih primerih v čredi oz. če pride do izbruha bolezni. Prav tako pa na žalost ni več monitoringa pri

delavcih v živilski industriji, kar prav tako predstavlja vrzel v poznavanju klicenoštva pri ljudeh.

V raziskavi smo pridobili dragocene podatke o odpornosti in genotipih bakterije *S.Typhimurium* na državni ravni. Za uspešen nadzor izbruhov salmoneloze in spremeljanja odpornosti proti protimikrobnim zdravilom je zelo pomembno globalno poznavanje te tematike, zato so podatki iz te raziskave pomemben prispevek k nacionalnemu in mednarodnemu preiskovanju izbruhov.

6 ZAKLJUČKI

6.1 HIPOTEZE

1. hipoteza: sevi *S. Typhimurium* imajo večjo genetsko raznolikost kot *S. Enteritidis*.

Pri 284 izolatih *S. Typhimurium* iz ljudi, živali, živil in drugih vzorcev smo ugotovili 96 genotipov, ki smo jih razvrstili v 9 genetskih skupin (A–I) in 21 unikatnih genotipov (s 64,9% stopnjo podobnosti). S tem sмо potrdili našo prvo hipotezo, da ima *S. Typhimurium* večjo genetsko raznolikost kot *S. Enteritidis*, za katero je bilo v drugi študiji v Sloveniji pregledanih 368 izolatov, razvrščenih v 60 genotipov in 4 genetske skupine (Podpečan, 2014).

2. hipoteza: posamezni genotipi so stalno prisotni (v letih 2000–2012).

Ugotovili smo, da je bil najpogosteji genotip F9 ($n = 83$) prisoten v vseh trinajstih letih. Drugi najpogosteji genotip F7 ($n = 14$) je bil z izjemo treh let prisoten v celotnem preiskovanem obdobju. Ostale genotipe smo ugotavljali pri manjšem številu izolatov. S tem sмо potrdili drugo hipotezo, da so posamezni genotipi stalno prisotni.

3. hipoteza: sevi, izolirani iz različnih živali, se genetsko razlikujejo.

Pri izolatih iz prašičev ($n = 47$) smo ugotovili 24 genotipov, od tega 19 samo pri prašičih. Pri izolatih iz perutnine ($n = 39$) smo ugotovili 9 genotipov, od tega 6 samo pri perutnini. Pri izolatih iz ljudi ($n = 93$) smo ugotovili 38 genotipov, od tega 26 samo pri ljudeh. Pri drugih (neproizvodnih) živalih, iz katerih smo imeli samo posamezne izolate, smo ugotovili večinoma unikatne genotipe.

S tem sмо delno potrdili tretjo hipotezo, da se genotipi izolatov iz različnih živalskih vrst razlikujejo. Večina genotipov je vezana samo na posamezno vrsto, ugotovili pa smo tudi genotipe, ki so bili skupni različnim živalskim vrstam in ljudem.

4. hipoteza: sevi, izolirani iz živil, imajo širši spekter genotipov kot sevi, izolirani iz posameznih živalskih vrst.

Razmerje med številom genotipov in številom izolatov v živilih prašičjega izvora je bilo večje kot pri prašičih (0,74 proti 0,51). Tudi razmerje med številom genotipov in številom izolatov v živilih perutninskega izvora je bilo večje kot pri perutnini (0,36 proti 0,23). To pomeni, da

je bila pestrost izolatov v živilih večja kot pri izolatih posameznih živalskih vrst. S tem sмо potrdili četro hipotezo.

5. hipoteza: vzorec rezistence je vezan na določeno živalsko vrsto zaradi usmerjene uporabe antibiotikov.

Izolati z rezistotipoma ACNaSuT (47,2 %) in ACSuT (51,5 %) so bili statistično značilno pogostejši pri živalih, izolati z rezistotipom ASuT (58,1 %) pa pri ljudeh. Izolati z vzorcem odpornosti ACNaSuT so bili statistično pomembno pogostejši pri prašičih (85,7 %), izolati ACSuT pa pri perutnini (75,0 %). Edina razlika je bila pri fluorokinolonih. Rezistotip odseva običajno izbiro antibiotikov za zdravljenje živali določene vrste.

S tem sмо potrdili peto hipotezo, da je vzorec rezistence vezan na določeno živalsko vrsto zaradi usmerjene uporabe antibiotikov.

6. hipoteza: obseg rezistence se z leti povečuje.

Primerjali smo odpornost pri izolatih iz ljudi, živil, prašičev in perutnine v treh obdobjih: od 2000 do 2004, od 2005 do 2008 in od 2009 do 2012. V tretjem obdobju nismo več ugotovili dobro občutljivih izolatov iz živil, medtem ko se je ta delež pri izolatih iz ljudi in perutnine povečal. Pri izolatih iz živil se je najbolj povečal delež izolatov, odpornih proti ampicilinu, sulfonamidom in tetraciklinu, to je proti največkrat uporabljenim antibiotikom pri zdravljenju v EU, ter delež večkratno odpornih izolatov in delež MDR ≥ 5 . S tem sмо delno potrdili šesto hipotezo, da se obseg rezistence z leti povečuje.

6.2 SKLEPI

Odpornost izolatov (pogostost in rezistotipi) je povezana z antibiotiki, ki se uporabljajo pri zdravljenju ljudi, proizvodnih in drugih živalih ter s posebnostimi zdravljenja posameznih vrst proizvodnih živali.

Naši izolati imajo visoko do zelo visoko odpornost proti ampicilinu, tetraciklinu in sulfonamidom, podobno kot pri večini članic EU.

Naši izolati so bolj odporni proti fluorokinolonom, kot je povprečje v EU. Največji delež le-teh (70,2 %) je bil pri izolatih iz prašičev.

Najpogostejsi rezistotip pri izolatih iz prašičev je bil ACNaSuT, za razliko od EU, kjer sta bila najpogostejsa rezistotipa ASuT in ACSuT.

Izolati iz proizvodnih živalih imajo srednje velik delež dobro občutljivih izolatov (15,1 %), izolati iz drugih živali pa ekstremno velik delež (72,7 %).

Razlika v številu večkratno odpornih izolatov med proizvodnimi (68,5 %) in drugimi živalmi (18,2 %) je statistično značilna. Prostoživeče in živali iz živalskega vrta ne predstavljajo velikega tveganja za prenos odpornih izolatov.

Pri izolatih iz živil smo ugotovili 20 genotipov, ki so bili ugotovljeni samo v živilih. Osem genotipov je bilo skupnih živilom in živalim in/ali ljudem. Genotipi, ki jih nismo ugotovili pri izolatih iz ljudi in živali v Sloveniji, bi lahko izvirali iz uvoženih živil ali od kontaminacije klinično zdravih klicenoscev v živilski industriji.

V posamezni epidemiološki enoti se lahko hkrati pojavlja več genotipov in rezistotipov, zato je v epidemioloških raziskavah treba odvzeti in analizirati več vzorcev in preučiti lastnosti več izolatov.

Vzpostaviti je treba stalne skupne baze podatkov o pomembnejših serovarih salmonel (npr. Typhimurium, Enteritidis, Infantis) za potrebe epidemioloških raziskav v veterinarski in humani medicini ter za preprečevanje in omejevanje izbruhot salmoneloze.

V prihodnosti je treba vzpostaviti povezavo s skupno bazo podatkov na ravni EU, saj bo le tako mogoče naše rezultate primerjati z rezultati v drugih državah in slediti mednarodnim izbruhom salmoneloze, kar bo pripomoglo h globalnemu zagotavljanju javnega zdravja.

Posodobiti je treba pravilnike o ukrepih pri prašičih in govedu pri kliničnih primerih salmoneloze v čredi. Pri rednem sistematičnem ugotavljanju vzroka pogina je smiselno izvajati preiskave na salmonele pri reprezentativnem številu pognulih proizvodnih živali, predvsem pri teletih, saj v Sloveniji pri govedu ni aktivnega monitoringa.

Smiselno bi bilo ponovno redno sistematično ugotavljanje prevalence pri ljudeh, ker so samo tako podatki lahko primerljivi.

7 POVZETEK

Salmoneloza je za kampilobakteriozo druga najpogosteje poročana zootnoza v EU. *Salmonella Typhimurium* je pomemben povzročitelj s hrano povezanih okužb pri ljudeh in ima zaskrbljujoče visok delež proti protimikrobnim zdravilom (antibiotikom) odpornih sevov.

V raziskavi smo pregledali 284 izolatov *S. Typhimurium*: 93 iz ljudi, 111 iz živali, 71 iz živil in 9 iz vzorcev okolja in krmil, ki so bili pridobljeni v medicinskih in veterinarskih laboratorijih v obdobju od leta 2000 do leta 2012.

V naši raziskavi smo določili genetsko raznolikost in odpornost proti antibiotikom pri izolatih *S. Typhimurium* v Sloveniji. V ta namen smo uporabili metodo elektroforeze v pulzirajočem električnem polju (PFGE) in mikrodilucijsko metodo določanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).

S tipizacijo izolatov *S. Typhimurium* z metodo PFGE smo ugotovili 96 različnih genotipov. Petinsedemdeset genotipov smo uvrstili v 9 genetskih skupin (A do I), 21 pa je bilo unikatnih. Od najpogostejših štirih genetskih skupin je bila skupina F značilna za izolate iz živali ($p < 0,05$), medtem ko so bile skupine E, G in I značilne za izolate iz ljudi ($p < 0,05$). Genetska skupina F je bila največja z 31 genotipi, ki so predstavljal 57,7 % vseh izolatov (52,4 % iz živali, 25,6 % iz živil, 19,5 % iz ljudi in 2,4 % iz drugih vzorcev). Najpogostejši genotip F9, ki je zajemal skoraj 30 % vseh izolatov, smo ugotovili pri vseh skupinah (izolati iz ljudi, živali, živil in drugih vzorcev) in v vseh letih. Druga največja je bila genetska skupina E z 11,3 % vseh izolatov (12 genotipov), od tega 59,4 % iz ljudi, 31,3 % iz živil in 9,4 % iz živali. V genetski skupini G (7,0 % izolatov, 6 genotipov) je bilo 60 % izolatov iz ljudi, 25 % iz živali in 15 % iz živil. V genetski skupini I (5,6 % izolatov, 2 genotipa) je bilo 87,5 % izolatov iz ljudi in 12,5 % izolatov iz živali.

Z mikrodilucijsko metodo smo ugotovili visok delež odpornih izolatov (72,2 %). Večkratno odpornih (MDR) je bilo več kot polovica izolatov, največ pri živilih, pri živalih in najmanj pri ljudeh. Od skupno 28 fenotipskih rezistotipov so bili najpogostejši ACNaSuT, ACSuT in ASuT. Prva dva sta bila značilno najpogostejša pri živilih, medtem ko so bili izolati z

rezistotipom ASuT najpogosteji pri ljudeh. Ugotovili smo visok delež (32,4 %) odpornih izolatov proti florokinolonom. Odpornost proti ampicilinu, tetraciklinu in sulfonamidom je bila najvišja pri izolatih iz živil.

V primerjavi rezistotipov in genotipov smo ugotovili, da je bil najpogosteji rezistotip ACNaSuT, ki je bil značilen za živali, še posebej za prašiče ($p < 0,05$), ugotovljen le v genetski skupini F. Drugi najpogosteji rezistotip ACSuT, ki je bil tudi značilen za izolate iz živali in še posebej iz perutnine ($p < 0,05$), je bil prav tako večinoma v genetski skupini F. Tretji rezistotip ASuT, ki je bil značilen za izolate iz ljudi ($p < 0,05$), smo ugotovili večinoma v genetskih skupinah značilnih za ljudi (E, G in I). Izolati, odporni proti kloramfenikolu in nalidiksinski kislini, so bili večinoma iz skupine F, značilne za živali.

V genetski skupini E je bilo največ večkratno odpornih izolatov (78,1 %) z najpogostešim vzorcem odpornosti ASuT. V genetski skupini F je bilo dve tretjini (67,1 %) izolatov večkratno odpornih z najpogostešima vzorcema odpornosti ACNaSuT in ACSuT. V genetski skupini I je bila večina izolatov (81,3 %) dobro občutljiva za vse testirane antibiotike, medtem ko so večkratno odporni izolati (12,5 %) imeli vzorec ASuT. V genetski skupini G je bil večkratno odporen samo en izolat (0,6 %) z vzorcem ACSuT.

Zbrani podatki (baza) o tipiziranih izolatih lahko olajšajo in usmerijo epidemiološke raziskave izbruhotvori pri ljudeh in živalih, da lažje odkrijemo vir okužbe in preprečimo večje izbruhe. Hkrati lahko podatki o večkratno odpornih izolatih pripomorejo k ozaveščanju veterinarjev in rejcev živali, da je nujna zmernejša in bolj racionalna raba antibiotikov. Zagotoviti bi bilo treba sredstva za delovanje baze (ugotavljanje lastnosti najpomembnejših serovarov) in minimalni monitoring pri vseh proizvodnih živalih.

V raziskavi smo pridobili dragocene podatke o odpornosti in genotipih bakterije *S. Typhimurium* na državni ravni. Za uspešen nadzor izbruhotvori salmoneloze in spremeljanja odpornosti proti protimikrobnim zdravilom je zelo pomembno globalno poznavanje te tematike, zato so podatki iz te raziskave pomemben prispevek k nacionalnemu in mednarodnemu preiskovanju izbruhotvori.

8 SUMMARY

Salmonellosis is, following campylobacteriosis, the second most commonly reported zoonotic disease in the EU. *Salmonella* Typhimurium is one of the important causative agents of food-borne infections in humans and bears a worryingly high proportion of strains resistant to antimicrobial drugs (antibiotics).

In the scope of this study, a total of 284 *S. Typhimurium* isolates from humans (n = 93), animals (n = 111), food (n = 71) and environment and foodstuff (n = 9) were investigated. The isolates were collected in human and veterinary laboratories between 2000 and 2012.

Genetic diversity and antimicrobial resistance of *S. Typhimurium* isolates in Slovenia were assessed by using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and microdilution method to determine minimal inhibitory concentration (MIC).

PFGE-based typing of *S. Typhimurium* isolates revealed 96 distinct genotypes. Seventy-five genotypes were grouped into nine clusters (A to I) while 21 genotypes were unique. Among four the most common clusters, cluster F was significant ($p<0,05$) for isolates from animals and clusters E, G and I for isolates from humans. Cluster F was the largest, comprising 31 genotypes and 57.7% of all isolates (52.4% from animals, 25.6% from food, 19.5% from humans and 2.4% from other samples). The most common genotype F9 encompassed almost 30% of all isolates and was found in all sample groups (isolates from humans, animals, food and other samples) during the entire time period studied. The second largest cluster was cluster E with 11.3% of all isolates (12 genotypes); 59.4% originated from humans, 31.3% from food and 9.4% from animals. Cluster G (7.0% of isolates, 6 genotypes) contained 60% of isolates from humans, 25% of isolates from animals and 15% of isolates from food. Cluster I (5.6% isolates, 2 genotypes) comprised 87.5% of isolates from humans and 12.5% of isolates from animals.

A high proportion (72.2%) of resistant isolates was determined by the microdilution method. More than half of the isolates were MDR, mostly isolates from food and animals and less frequently isolates from humans. Among 28 phenotypic resistotypes, ACNaSuT, ACSuT and

ASuT were the most common. The first two were characteristic for isolates from animals while isolates with ASuT resistotype were most frequently found in humans. A high proportion (32.4%) of isolates was resistant against fluoroquinolones. The resistance against ampicillin, tetracycline and sulfonamides was most prominent in food isolates.

By comparing resistotypes and genotypes we found out that the most common resistotype ACNaSuT was confined to cluster F. This resistotype was significant ($p<0,05$) for animals, in particular pigs. The second most common resistotype ACSuT was also most frequently related to cluster F and was also significant ($p<0,05$) for animals, especially poultry. The third most common resistotype ASuT, significant ($p<0,05$) for humans, was mostly found in clusters E, G and I, characteristic for humans. Isolates resistant against chloramphenicol and nalidixic acid were gathered mostly in animal-characteristic cluster F.

Cluster E comprised the majority (78.1%) of MDR isolates with the most common resistotype ASuT. Two thirds (67.1%) of isolates within the cluster F were MDR with the most frequent resistotypes ACNaSuT and ACSuT. The majority (81.3%) of isolates in cluster I was susceptible to all antimicrobials tested; MDR isolates (12.5%) exhibited ASuT resistotype. Cluster G contained only one (0.6%) MDR (ACSuT) isolate.

Database containing data on typed isolates facilitates and directs epidemiological investigation of outbreaks in humans and animals so that source tracking is more efficient and larger outbreaks are prevented. Data on MDR isolates contribute to increasing the awareness of veterinarians and animal breeders that antibiotics should be used in a moderate and cautious way. Finances should be provided both for the database management (characterization of the most important serovars) and for the minimal monitoring of all production animals.

The study enabled us to collect valuable data on *S. Typhimurium* resistance and genotypes at the national level. Global knowledge on these topics is of utmost importance to successfully control salmonellosis outbreaks and to monitor the antimicrobial resistance. Therefore, the data gathered in the scope of the present study add an important piece to outbreak investigations on the national and international level.

9 ZAHVALE

Zn. svet. dr. Matjažu Ocepku se zahvaljujem za mentorstvo, podporo in vse nasvete.

Dr. Vojki Bole-Hribovšek in viš. zn. sod. dr. Mateji Pate, mojima neuradnima somentoricama, za vso pomoč, nasvete, spodbudo in neskončno potrpežljivost.

Zahvaljujem se predsednici in članoma komisije izr. prof. dr. Ireni Zdovc, zn. sod. dr. Igorju Gruntarju in prof. dr. Borisu Habrunu za natančen in hiter pregled naloge ter vse podane pripombe.

Hvala kolegom iz NLZOH (nekdanji IVZ in ZZV), ki so mi posredovali izolate iz ljudi: Ingrid Berce, Tatjani Harlander, mag. Mariji Lušicky, mag. Mateji Ravnik, Heleni Ribič, Tatjani Rupel, Alenki Štorman, dr. Mariji Trkov in mag. Tjaši Žohar Čretnik.

Mag. Brigit Grečs-Smole se zahvaljujem za natančen pregled citirane literature.

Med pripravo disertacije so mi ob strani stali sodelavci na Enoti za bakteriologijo in mikologijo IMP: Brane, Majda, Urška, Bojan, Milojka, Aleksandra, Alenka, Olga, Maja L., Magda, Irena K., Helena in Evelina. Hvala za spodbudo! Jani in Tini hvala za vse velike in male nasvete in reševanje nerešljivih problemov. Darji in Špeli P. hvala za pomoč pri metodi PFGE. Nenazadnje hvala Nataši in Maji K. najtesnejšima sodelavkama v laboratoriju.

Hvala Maji Bajt, Branku Podpečanu in Mateji Stvarnik za učinkovito sodelovanje.

Mojim prijateljem Darji, Sabini, Saši, Aniti, Martini, Saši R. in Marjetki.

Mojima najdražjima Sari in Mihu HVALA ZA VSE!

10 LITERATURA

- Almeida F, Medeiros MI, Kich JD, Falcão JP. Virulence-associated genes, antimicrobial resistance and molecular typing of *Salmonella Typhimurium* strains isolated from swine from 2000 to 2012 in Brazil. *J Appl Microbiol* 2016; 120(6): 1677–90.
- Andlović A. Salmonele in šigele. In: Gubina M, Ihan A. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana: Medicinski razgledi, 2002: 189–200.
- Antunes P, Mourao J, Campos J, Peixe L. Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22: 110–21.
- Barco L, Barrucci F, Olsen JE, Ricci A. Salmonella source attribution based on microbial subtyping. *Int J Food Microbiol* 2013; 163: 193–203.
- Barza M. Potential mechanisms of increased disease in humans from antimicrobial resistance in food animals. *Clinical Infect Dis* 2002; 34(3): 123–5.
- Benacer D, Thong KL, Watanabe H, Puthucheary SD. Characterization of drug resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium by antibiograms, plasmids, integrons, resistance genes and PFGE. *J Microbiol Biotechnol* 2010; 20(6): 1042–52.
- Bender JB, Hedberg CW, Boxrud DJ, et al. Use of subtyping in surveillance for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *N Engl J Med* 2001; 344(3): 189–95.
- Bole-Hribovšek V. Odpornost proti antibiotikom in kemoterapevtikom pri salmonelah, izoliranih v Sloveniji. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 1993. Doktorska disertacija.
- Boyen F, Haesebrouck F, Mayes D, Van Immerseel F, Ducateller, Pasmans F. Non-typhoidal infections in pigs: a closter look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet Microbiol* 2008; 130: 1–19.
- Busani L, Graziani C, Battisti A, et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Enteritidis and Infantis from human infection, foodstuffs and farm animals. *Epidemiol Infect* 2004; 132: 245–51.
- Cai Y, Tao J, Jiao Y, et al. Phenotypic characteristics and genotypic correlation between *Salmonella* isolates from a slaughterhouse and retail markets in Yangzhou, China. *Int J Food Microbiol* 2016; 222: 56–64.
- CDC, 2015. CDC FoodNet Surveillance: active laboratory surveillance. Clifton Road Atlanta: CDC, 2015.
<https://www.cdc.gov/foodnet/surveillance.html> (5. 8.2 017)
- Chen H-M, Wang Y, Su L-H, Chiu C-H. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. *Pediatr Neonatol* 2013; 54: 147–52.

Cosby DE, Cox NA, Harrison MA, et al. Salmonella and antimicrobial resistance in broilers: a review. *J Appl Poult Res* 2015; 24: 408–26.

Davis MA, Besser TE, Eckmann K, et al. Multidrug- resistant *Salmonella Typhimurium*, Pacific Northwest, United States. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(10): 1583–6.

Dionisi AM, Graziani C, Lucarelli C, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and monophasic variant (S. 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. *Foodborne Pathog Dis* 2009; 6(6): 711–7.

EFSA, 2012. EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA J* 2012; 10(3): e2598 (233 str.)

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsjournal/pub/2598> (15. 3. 2017)

EFSA, 2014. EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *EFSA* 2014; 12(3): e3590 (366 str.)

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsjournal/pub/3590> (15. 3. 2017)

EFSA, 2017. EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA J* 2017;15(2): e4694 (212 str.)

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsjournal/pub/4694> (15. 3. 2017)

EUCAST, 2017. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017.

<http://www.eucast.org> (14. 3. 2017)

EFSA, 2007 a. Report of the task force on zoonoses data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in broiler flocks of *Gallus gallus*, Part A. *EFSA J* 2007; 98: e32.

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsjournal/pub/rn-98> (15. 3. 2017)

EFSA, 2007 b. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline study on the prevalence of *Salmonella* in holdings of laying hen flocks of *Gallus gallus*, *The EFSA Journal* (2007) 97: 18.

www.efsa.europa.eu/en/efsjournal/pub/rn-97 (15. 3. 2017)

EFSA, 2008 a. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, Part A, *The EFSA Journal* (2008) 135, 31-34.

[https://www.efsa.europa.eu/en/efsjournal/pub/rn-135](http://www.efsa.europa.eu/en/efsjournal/pub/rn-135) (15. 3. 2017)

EFSA, 2008 b. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in turkey flocks, Part A, The EFSA Journal (2008), 134: 26-27.

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/rn-134> (15. 3. 2017)

EFSA, 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008, Part A: *Salmonella* prevalence estimates, EFSA Journal (2009); 7(12): 30-33.

EFSA, 2015. EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA J 2015;13(12): e4329 (191 str.)

<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4329> (15. 3. 2017))

ECDC, EFSA, 2017. European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Multi-country outbreak of *Salmonella Enteritidis* infections linked to Polish eggs, 12 December 2017. Stockholm, Parma: ECDC, EFSA, 2017.

<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/multi-country-outbreak-salmonella-enteritidis-infections-linked-polish-eggs> (10. 1. 2018)

EMA, 2014. European Medicines Agency. Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012: fourth ESVAC report. EMA/333921/2014. London: European Medicines Agency, 2014.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2014/10/WC500175671.pdf (10. 9. 2017)

Fadlallah MS, Shehab M, Cheaito K, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Salmonella* species from clinical specimens and food Items in Lebanon. J Infect Dev Ctries 2017; 11(1): 19–27.

Foley LS, White GD, McDERMOTT FP, et al. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. J Clin Microbiol 2006; 44(10): 3569–77.

Graziani C, Busani L, Dionisi AM, et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy. Vet Microbiol 2008; 128(3/4): 414–8.

Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars: 2007. 9th ed. Paris: WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, 2007: 166 str.

<http://nih.dmsc.moph.go.th/aboutus/media/antigenic formula of Salmonella.pdf> (15. 2. 2017)

Habrun B. Klinička veterinarska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada Zagreb; Hrvatski veterinarski institut, 2014: 117–30, 217–25.

Hoelzer K, Soyer Y, Rodriguez-Rivera LD, Cummings KJ. The Prevalence of multidrug resistance is higher among bovine than human *Salmonella enterica* serotype Newport, Typhimurium, and 4,5,12:i: isolates in the United States but differs by serotype and geographic region. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(17): 5947–59.

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20804> (5. 8. 2017)

Hugas M, Beloeil PA. Controlling *Salmonella* along the food chain in the European Union: progress over the last ten years. *Euro Surveill* 2014; 19(19):pii=20804.

Hughes LA, Shopland S, Wigley W, et al. Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005–2006. *BMC Vet Res* 2008; 4: e4 (10 str.).

<https://bmccvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-4-4> (7. 9. 2017)

Kagambega A, Lienemann T, Aulu L, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* from the feces of cattle, poultry, swine and hedgehogs in Burkina Faso and their comparison to human Salmonella isolates. *BMC Microbiol* 2013; 13: e253. (9 str.)

<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-13-253> (7. 9. 2017)

Ke B, Sun J, He D, Li X, Liang Z, Ke CW. Serovar distribution, antimicrobial resistance profiles, and PFGE typing of *Salmonella enterica* strains isolated from 2007–2012 in Guangdong, China. *BMC Infect Dis* 2014; 14: e338 (10 str.)

<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-14-338> (15. 3. 2017)

Kuang X, Hao H, Dai M, et al. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolate from farm animals in China. *Front Microbiol* 2015; 6: e602 (11 str.)

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00602/full> (7. 9. 2017)

Leekitcharoenphon P, Nielsen EM, Kaas RS, Lund O, Aarestrup FM. Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. *PLoS ONE* 2014; 9(2): e87991 (11 str.)

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087991> (15. 7. 2017)

Lienemann T, Kyyhkynen A, Halkilahti J, Haukka K, Siitonen A. Characterization of *Salmonella* Typhimurium isolates from domestically acquired infections in Finland by phage typing, antimicrobial susceptibility testing, PFGE and MLVA. *BMC Microbiol* 2015; 15: e131 (11 str.)

<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-015-0467-8> (15. 7. 2017)

Ling ML, Goh KT, Wang GCY, Neo KS, Cua T. An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium, DT104L linked to dried anchovy in Singapore. *Epidemiol Infect* 2002; 128: 1–5.

Long SG, DuPont HL, Gaul L, et al. Pulsed-field gel electrophoresis for *Salmonella* infection surveillance, Texas, USA, 2007. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(6): 983–5.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard

definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012; 18(3): 268–81.

Majowicz SE, Musto J, Scallan E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clin Infect Dis 2010; 50(6): 882–9.

Mandilara G, Lambiri M, Polemis M, Passiotou M, Vatopoulos A. Phenotypic and molecular characterisation of multiresistant monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) in Greece, 2006 to 2011. Euro Surveill 2013; 18(22): pii=20496 (8 str.)
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20496> (5. 8. 2017)

Martin LJ, Fyre M, Dore K, et al. Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections. J Infect Dis 2004; 189(3): 377–84.

Michael GB, Schwarz S. Antimicrobial resistance in zoonotic nontyphoidal *Salmonella*: an alarming trend? Clin Microbiol Infect 2016; 22: 968–74.

MKGP, 2017. Prašičje meso. Ljubljana: Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, 2017.
http://www.mkgp.gov.si/delovna_področja/kmetijstvo/kmetijski_trgi/prasice_meso/ (2. 2. 2018)

Naglić T, Hajsig D, Mandić J, Pinter L. Veterinarska mikrobiologija: specjalna bakteriologija i mikologija. Zagreb: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; Hrvatsko mikrobiološko društvo, 2005: 71–8.

Newel GD, Koopmans M, Verhoef L, et al. Food-borne diseases: the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. Int J Food Microbiol 2010; 139: 3–15.

NIJZ, 2006. Epidemiološko spremjanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2006: letna in četrletna poročila. Ljubljana: Inštitut za varovanje zdravja, 2007.
http://www.niz.si/sites/www.niz.si/files/publikacije-datoteke/epidemiosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2006.pdf (3. 9. 2017)

NIJZ, 2015. Epidemiološko spremjanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2015. Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2016.
http://www.niz.si/sites/www.niz.si/files/datoteke/epidemiolosko_spremljanje_nb_v_letu_2015.pdf (7. 9. 2017)

NIJZ, 2017. Epidemiološko spremjanje nalezljivih bolezni: letna in četrletna poročila. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2017.
<http://www.niz.si/sl/epidemiolosko-spremljanje-nalezljivih-bolezni-letna-in-cetrletna-poročila> (3. 9. 2017)

Nygaard Jensen A, Dalsgaard A, Stockmarr A et al. Survival and transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in an outdoor organic pig farming environment. Appl Environ Microbiol 2006; 72(3): 1833–42.

OIE, 2016. World Health Organisation for Animal Health. (OIE). Salmonellosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: Office International des Epizooties, 2016: Chapter 2.9.8: e1–18.

<http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/> (3. 9. 2017)

Podpečan B. Epidemiološka raziskava povezave med okužbami z bakterijo *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pri živalih in ljudeh. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2014. Doktorska disertacija.

Pui CF, Wong WC, Chai LC, et al. *Salmonella*: a foodborne pathogen. Int Food Res J 2011; 18: 465–73.

PulseNet Europe, 2014. The International molecular subtyping network for foodborne diseases surveillance. PulseNet International, 2014.

<http://www.pulsenetinternational.org/networks/europe/> (5. 8. 2017)

Regulation (EC) No 2160/2003. EUR Lex. Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council and Regulation of 17 November 2003 on the control of *Salmonella* and other specified food-borne zoonotic agents. Off J EUR 2003; 46 L325(12.dec.2003): 1–15.

<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex:32003R2160> (15. 2. 2017)

Ribot EM, Fair MA, Gautam R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis 2006; 3: 59–67.

Rounds JM, Hedberg CW, Meyer S, Boxrud DJ, Smith KE. *Salmonella enterica* pulsed-field gel electrophoresis clusters, Minnesota, USA, 2001–2007. Emerg Infect Dis 2010; 16(11):1678–85.

SWEDRES-SVARM 2012. Use of antimicrobials and occurrence of antimicrobial resistance in Sweden. Solna/Uppsala, Sweden: Swedish Institute for Communicable Disease Control and National Veterinary Institute, 2013.

http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/publikationer/swedres_svarm2012.pdf (1. 8. 2017)

SWEDRES-SVARM 2016. Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden. Solna/Uppsala, Sweden: Swedish Institute for Communicable Disease Control and National Veterinary Institute, 2017.

http://www.sva.se/globalassets/redesign2011/pdf/om_sva/publikationer/swedres_svarm2016.pdf (1. 8. 2017)

Tamamura Y, Uchida I, Tanaka K, et al. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from cattle in Hokkaido, Japan: evidence of clonal replacement and characterization of the disseminated clone. Appl Environ Microbiol 2011; 77(5): 1739–50.

Taylor AJ, Lappi V, Wolfgang WJ, et al. Characterization of foodborne outbreaks of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with whole-genome sequencing single nucleotide polymorphism-based analysis for surveillance and outbreak detection. *J Clin Microbiol* 2015; 53(10): 3334–40.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233–9.

Threlfall JE. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26:141–8.

Torpdahl M, Lauderdale TL, Liang SY, Li I, Wei SH, Chiou CS. Human isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Taiwan displayed significantly higher levels of antimicrobial resistance than those from Denmark. *Int J Food Microbiol* 2013; 161(2): 69–75.

Tsolis RE, Adams LG, Ficht TA, Baumler AJ. Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect Immun* 1999; 67(9): 4879–85.

UVHVVR, 2017. Letna poročila monitoringa zoonoz in povzročiteljev zoonoz. Ljubljana: Uprava za varno hrano, varstvo rastlin in veterinarstvo, 2017.

http://www.uvhvvr.gov.si/si/delovna_podrocja/zivila/zoonoze/ (5. 9. 2017)

Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(Suppl. 3): 1–46.

Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(18): 5649–54.

Van Boxstaet S, Dierick K, van Huffel X, et al. Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of *Salmonella* Typhimurium isolated from pigs, pork and humans in Belgium between 2001 and 2006. *Food Res Int* 2012; 45: 913–8.

Wang J, Li Y, Xu X, et al. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Shanghai, China. *Front Microbiol* 2017; 8: 510.

Wedel SD, Bender JB, Leano FT, Boxrud DJ, Hedberg C, Smith KE. Antimicrobial-drug susceptibility of human and animal *Salmonella* Typhimurium, Minnesota, 1997–2003. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(12): 1899–906.

Winfield MD, Groisman EA. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(7): 3687–94.

Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-Garcia MT, et al. Integrated food chain surveillance system for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(3): 429–35.

11 Priloge

Tabela 2: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti ampicilinu

Table 2: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to ampicillin

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2012	EU	2010	človek	6466	64,0
EFSA, 2014	EU	2012	človek	4183	66,6
EFSA, 2017	EU	2015	človek	2262	56,3
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	človek	1870	50,3
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2006	človek	755	72,6
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek	158	39,9
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek (19 držav)	36	62,9
TorpdaHL in sod., 2013	Tajvan	2009-2010	človek	185	73,0
Fadlallah in sod., 2017	Libanon	2011-2012	človek	84	39,2
Ke in sod., 2014	Quandong (Kitajska)	2007-2012	človek	523	86,6
Wang in sod., 2017	Šanghaj (Kitajska)	2011-2014	človek	559	80,1
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek	87	79,3
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek (asimptomatski)	25	36,0
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	68,3
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	68,1
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči	581	48,5
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči meso	255	35,3
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	prašiči	632	70,3
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	prašiči	127	61,9
Swedres-Swarm, 2013	Švedska	2012	proiz. živali	51	15,7
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	53,8
Tamamura in sod., 2011	Japonska	1977-2009	govedo	545	81,0
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	govedo	122	80,3
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	govedo	53	47,2
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	piščanci	94	54,3
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	piščanci	22	100,0
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	purani	117	81,2
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	kunci	83	51,8
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	golobi	105	7,6

^a podatki iz 18 držav; razpon od Malta 40,0% do Litva 85,2%, Slovenija 36,7%

^b podatki iz 19 držav; razpon od Slovenija 28,1% do Madžarska 72,1%

^c podatki iz 22 držav; razpon od Estonija 25,0% do Portugalska 87,0%, Slovenija 60,4%

^d podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^e podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

^f podatki iz 4 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 3: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti kloramfenikolu

Table 3: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to chloramphenicol

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2012	EU	2010	človek	5041	20,2 ^a
EFSA, 2014	EU	2012	človek	3241	18,3 ^b
EFSA, 2017	EU	2015	človek	2088	18,0 ^c
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	človek	1870	28,8
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2006	človek	755	29,9
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek	158	10,1
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek (19 držav)	36	11,4
TorpdaHL in sod., 2013	Tajvan	2009-2010	človek	185	48,1
Ke in sod., 2014	Quandong (Kitajska)	2007-2012	človek	523	72,9
Wang in sod., 2017	Šanghaj (Kitajska)	2011-2014	človek	559	54,9
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek	87	80,5
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek (asimptomatski)	25	36,0
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	31,7 ^d
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	27,4 ^e
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči	581	26,3
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči meso	255	23,5
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	prašiči	632	32,9
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	prašiči	127	88,9
Swedres-Swarm, 2013	Švedska	2012	proiz. živali	51	7,9
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	23,1 ^f
Tamamura in sod., 2011	Japonska	1977-2009	govedo	545	55,0
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	govedo	122	58,2
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	govedo	53	71,7
Graziani 2008	Italija	2002-2004	piščanci	94	24,5
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	piščanci	22	86,4
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	purani	117	41,9
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	kunci	83	39,8
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	golobi	105	5,7

^a podatki iz 15 držav; razpon od Danska 9,4% do Luksemburg 56,1%, Slovenija 22,4%

^b podatki iz 16 držav; razpon od Italija 12,1% do Irska 45,8%, Slovenija 12,5%

^c podatki iz 18 držav; razpon od Finska 1,3% do Francija 57,1%, Slovenija 39,6%

^d podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^e podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

^f podatki iz 4 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 4: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti sulfonamidom

Table 4: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to sulphonamides

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2012	EU	2010	človek	4383	57,1 ^a
EFSA, 2014	EU	2012	človek	3182	62,4 ^b
EFSA, 2017	EU	2015	človek	1187	52,4 ^c
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	človek	1870	54,0
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2006	človek	755	75,4
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek	158	43,0
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek (19 držav)	36	65,7
TorpdaHL in sod., 2013	Tajvan	2009-2010	človek	185	89,2
Ke in sod., 2014	Quandong (Kitajska)	2007-2012	človek	523	87,0
Wang in sod., 2017	Šanghaj (Kitajska)	2011-2014	človek	559	77,1
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek	87	91,9
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek (asimptomatski)	25	60,0
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	66,7 ^d
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	58,5 ^e
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči	581	58,9
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči meso	255	42,3
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	prašiči	632	78,3
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	prašiči	127	92,9
Swedres-Swarm, 2013	Švedska	2012	proiz. živali	51	19,6
Tamamura in sod., 2011	Japonska	1977-2009	govedo	545	90,0
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	61,5 ^f
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	govedo	122	82,8
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	govedo	53	90,6
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	piščanci	94	71,3
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	piščanci	22	90,9
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	purani	117	84,6
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	kunci	83	57,8
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	golobi	105	15,2

^a podatki iz 13 držav; razpon od Avstrija 5,2% do Litva 80,7%, Slovenija 38,8%

^b podatki iz 15 držav; razpon od Slovenija 28,1% do Romunija 83,3%

^c podatki iz 14 držav; razpon od Italija 27,3% do Francija 74,5%, Slovenija 63,8%

^d podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^e podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

^f podatki iz 4 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 5: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti tetraciklinu

Table 5: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to tetracycline

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2012	EU	2010	človek	5180	58,5 ^a
EFSA, 2014	EU	2012	človek	3272	63,7 ^b
EFSA, 2017	EU	2015	človek	1870	51,9 ^c
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	človek	1870	56,5
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2006	človek	755	76,4
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek	158	37,3
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek (19 držav)	36	62,9
TorpdaHL in sod., 2013	Tajvan	2009-2010	človek	185	85,4
Ke in sod., 2014	Quandong (Kitajska)	2007-2012	človek	523	87,4
Wang in sod., 2017	Šanghaj (Kitajska)	2011-2014	človek	559	83,7
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek	87	88,5
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek (asimptomatski)	25	44,0
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	50,8 ^d
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	56,3 ^e
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči	581	56,5
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči meso	255	45,9
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	prašiči	632	80,9
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	prašiči	127	94,4
Swedres-Swarm, 2013	Švedska	2012	proiz. živali	51	13,7
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	46,2 ^f
Tamamura in sod., 2011	Japonska	1977-2009	govedo	545	84,0
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	govedo	122	84,4
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	govedo	53	92,5
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	piščanci	94	52,1
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	piščanci	22	90,9
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	purani	117	79,5
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	kunci	83	63,9
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	golobi	105	13,3

^a podatki iz 15 držav; razpon od Španija 13,5% do Italija 78,9%, Slovenija 36,7%

^b podatki iz 16 držav; razpon od Slovenija 31,3% do Italija 72,7%

^c podatki iz 20 držav; razpon od Danska 20,3% do Francija 76,6%, Slovenija 56,3%

^d podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^e podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

^f podatki iz 4 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 6: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti nalidiksinski kislini

Table 6: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to nalidixic acid

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2012	EU	2010	človek	5374	8,9 ^a
EFSA, 2014	EU	2012	človek	3956	6,4 ^b
EFSA, 2017	EU	2015	človek	1746	7,2 ^c
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	človek	1870	5,8
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2006	človek	755	9,8
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek	158	4,4
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek (19 držav)	36	22,9
TorpdaHL in sod., 2013	Tajvan	2009-2010	človek	185	21,6
Ke in sod., 2014	Quandong (Kitajska)	2007-2012	človek	523	83,6
Wang in sod., 2017	Šanghaj (Kitajska)	2011-2014	človek	559	79,2
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek	87	55,1
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek (asimptomatski)	25	12,0
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	6,3 ^d
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	6,7 ^e
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči	581	3,4
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči meso	255	3,9
Graziani 2008	Italija	2002-2004	prašiči	632	9,7
Swedres-Swarm, 2013	Švedska	2012	proiz. živali	51	0,0
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	prašiči	127	72,2
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	0,0 ^f
Tamamura in sod., 2011	Japonska	1977-2009	govedo	545	3,7
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	govedo	122	17,2
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	govedo	53	79,2
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	piščanci	94	19,1
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	piščanci	22	27,2
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	purani	117	54,7
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	kunci	83	20,5
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	golobi	105	1,9

^a podatki iz 15 držav; razpon od Romunija 3,7% do Francija 24,0%, Slovenija 10,2%

^b podatki iz 17 držav; razpon od Danska 1,7% do Španija 15,2%, Slovenija 9,4%

^c podatki iz 15 držav; razpon od Irska 2,2% do Portugalska 34,8%

^d podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^e podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

^f podatki iz 4 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 7: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti ciprofloxacinu

Table 7: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to ciprofloxacin

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2012	EU	2010	človek	6412	4,7 ^a
EFSA, 2014	EU	2012	človek	4114	2,2 ^b
EFSA, 2017	EU	2015	človek	2178	6,6 ^c
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	človek	1870	0,5
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2006	človek	755	0,0
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek	158	0,0
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek (19 držav)	36	0,0
TorpdaHL in sod., 2013	Tajvan	2009-2010	človek	185	1,6
Ke in sod., 2014	Quandong (Kitajska)	2007-2012	človek	523	11,5
Wang in sod., 2017	Šanghaj (Kitajska)	2011-2014	človek	559	3,6
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek	87	0,0
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek (asimptomatski)	25	0,0
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	9,5 ^d
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	7,4 ^d
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči	581	1,2
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči meso	255	0,4
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	prašiči	632	0,2
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	prašiči	127	1,7
Swedres-Swarm, 2013	Švedska	2012	proiz. živali	51	0,0
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	0,0 ^f
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	govedo	122	0,0
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	govedo	53	0,0
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	piščanci	94	0,0
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	piščanci	22	0,0
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	purani	117	0,0
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	kunci	83	0,0
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	golobi	105	0,0

^a podatki iz 17 držav; razpon od 0% do Nizozemska 20,1%, Slovenija 0,0%

^b podatki iz 16 držav; razpon od 0,0% do UK 4,3%

^c podatki iz 21 držav; razpon od Nemčija 0,2% do Slovenija 41,4%

^d podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^e podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 8: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti trimetoprimu

Table 8: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to trimethoprim

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2012	EU	2010	človek	5981	11,8 ^a
EFSA, 2014	EU	2012	človek	3834	12 ^b
EFSA, 2015	EU	2015	človek	1591	10,2 ^c
Ke in sod., 2014	Quandong (Kitajska)	2007-2012	človek	523	64,4
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	25,4 ^d
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	17 ^e
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	7,7 ^f
Swedres-Swarm, 2013	Švedska	2012	proiz. živali	51	0,0

^a podatki iz 15 držav; razpon od Danska 4,3% do Luksemburga 22,7%, Slovenija 11,8%

^b podatki iz 17 držav; razpon od Luksemburga 0,0% do Romunija 27,8%, Slovenija 6,3%

^c podatki iz 17 držav; razpon od Luksemburga 0,0% do Francija 40,4%, Slovenija 6,3%

^d podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^e podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

^f podatki iz 4 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 9: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti gentamicinu

Table 9: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to gentamicin

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2012	EU	2010	človek	6080	5,8 ^a
EFSA, 2014	EU	2012	človek	4019	3,0 ^b
EFSA, 2017	EU	2015	človek	2094	1,6 ^c
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2006	človek	755	3,0
Torpahl in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek	158	0,6
Torpahl in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek (19 držav)	36	2,9
Torpahl in sod., 2013	Tajvan	2009-2010	človek	185	24,3
Ke in sod., 2014	Quandong (Kitajska)	2007-2012	človek	523	65,0
Wang in sod., 2017	Šanghaj (Kitajska)	2011-2014	človek	559	37,0
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek	87	44,8
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek (asimptomatski)	25	4,0
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	6,3 ^d
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	1,5 ^e
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	prašiči	632	1,4
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	prašiči	127	47,6
Swedres-Swarm, 2013	Švedska	2012	proiz. živali	51	0,0
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	0,0 ^f
Tamamura in sod., 2011	Japonska	1977-2009	govedo	545	0,2
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	govedo	122	1,6
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	govedo	53	45,3
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	piščanci	94	3,2
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	piščanci	22	18,2
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	purani	117	2,6
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	kunci	83	7,2
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	golobi	105	1,0

^a podatki iz 17 držav; razpon od 0,0% do Slovaške 95,8%, Slovenija 0,6%

^b podatki iz 19 držav; razpon od 0,0% do Slovaške 92,9%, Slovenija 0,0%

^c podatki iz 19 držav; razpon od 0,0% do Ciper 35,7%, Slovenija 0,0%

^d podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^e podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

^f podatki iz 4 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 10: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti cefotaksimu

Table 10: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to cephalexine

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2012	EU	2010	človek	6146	1,1 ^a
EFSA, 2014	EU	2012	človek	4057	0,9 ^b
EFSA, 2017	EU	2015	človek	2136	1,1 ^c
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	človek	1870*	0,6
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2006	človek	755	0,1
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek	158	0,0
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek (19 držav)	36	0,0
TorpdaHL in sod., 2013	Tajvan	2009-2010	človek	185	10,3
Ke in sod., 2014	Quandong (Kitajska)	2007-2012	človek	523	13,0
Wang in sod., 2017	Šanghaj (Kitajska)	2011-2014	človek	559*	20,0
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek	87*	66,3
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	človek (asimptomatski)	25*	25,0
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	3,2 ^d
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	1,5 ^e
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči	581*	1,2
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči meso	255*	0,4
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	prašiči	632	0,3
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	prašiči	127*	40,4
Swedres-Swarm, 2013	Švedska	2012	proiz. živali	51	0,0
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	0,0 ^f
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	govedo	122	0,0
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	govedo	53*	7,5
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	piščanci	94	0,0
Zaidi in sod., 2008	Mehika	2002-2005	piščanci	22*	77,3
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	purani	117	0,9
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	kunci	83	0,0
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	golobi	105	0,0

^a podatki iz 16 držav; razpon od 0,0% do Francija 6,3%, Slovenija 0,0%

^b podatki iz 18 držav; razpon od 0,0% do Francija 3,6%, Slovenija 0,0%

^c podatki iz 19 držav; razpon od 0,0% do UK 3,7%, Slovenija 0,0%

^d podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^e podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

^f podatki iz 4 držav; za Slovenijo ni podatka

*cefalosporini

Tabela 11: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti ceftazidimu

Table 11: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to ceftazidime

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2017	EU	2015	človek	1923	0,8 ^a
Torpahl in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek	158	0,0
Torpahl in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek (19 držav)	36	0,0
Torpahl in sod., 2013	Tajvan	2009-2010	človek	185	8,6
Ke in sod., 2014	Quandong (Kitajska)	2007-2012	človek	523	8,2
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	1,6 ^b
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	0,7 ^c
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	0,0 ^d

^a podatki iz 17 držav; razpon od 0,0% do Danska 3,1%, Slovenija 0,0%

^b podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^c podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

^d podatki iz 4 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 12: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti tigeciklinu

Table 12: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to tigecycline

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2017	EU	2015	človek	643	1,4 ^a
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	7,9 ^b
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	0,7 ^c
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	0,0 ^d

^a podatki iz 6 držav; za Slovenijo ni podatka

^b podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^c podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

^d podatki iz 4 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 13: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti kolistinu

Table 13: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to colistine

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2017	EU	2015	človek	259	1,5 ^a
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	0,0 ^a
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	0,0 ^b
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	0,0 ^c

^a podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^b podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

^c podatki iz 4 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 14: Podatki iz literature o odpornosti izolatov *S. Typhimurium* proti azitromicinu

Table 14: Data from literature about the resistance of the isolates of *S. Typhimurium* to azitromycine

poročevalec	država	leto	izolirano iz	št. testiranih	% odpornih
EFSA, 2017	EU	2015	človek	435	0,2 ^a
Wang in sod., 2017	Šanghaj (Kitajska)	2011-2014	človek	559	5,5
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	0,0 ^b
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	0,7 ^c
EFSA, 2017	EU	2015	trupi govedo <1 leto	13	0,0 ^a

^a podatki iz 4 držav; za Slovenijo ni podatka

^b podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

^c podatki iz 11 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 15: Podatki iz literature o MDR izolatih *S. Typhimurium*

Table 15: Data from literature about the MDR isolates of *S. Typhimurium*

poročevalec	država	leto		št. testiranih	% MDR	najpogostejsi rezistotipi
EFSA, 2017	EU	2015	človek	1063	44,4 ^a	
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	človek	1870	43,9	ACSSuT, ASSuT, ACNaSSuT
Torpdahl in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek	194	32,3	
Torpdahl in sod., 2013	Tajvan	2009-2010	človek	184	56,2	
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2006	človek	755	68,0	
Lienemann in sod., 2015	Finska	2007-2012	človek	375	11,0	ACNaSSuT, ACSSuT, ASSuT
Wang in sod., 2017	Šanghaj (Kitajska)	2011-2014	človek	559	84,6	ACSSuT
Ke in sod., 2014	Quandong (Kitajska)	2007-2012	človek	523	86,8	ACSSuT
Wedel in sod., 2005	Minnesota (ZDA)	1997-2003	človek	1028	29,0	ACSSuT, AKSSuT
Zaidi 2008	Mehika	2002-2005	človek in živali	314	86,6	
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	52,4 ^b	ASuT
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	54,1 ^b	ASuT
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči	581	31,2	ACSSuT, ACSuT, ASuT
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči meso	255	26,7	ACSSuT
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	prašiči	632	67,4	
Almedia in sod., 2016	Brazilija	2000-2012	prašiči	27	37,0	ACNaSuT
Swedres-Swarm, 2013	Švedska	2000-2012	proiz. živali	281	10,0	ACSSuT
Wedel in sod., 2005	Minesota (ZDA)	1997-2003	prašiči in govedo	716	81,0	ACSSuT, AKSSuT
Tamamura in sod., 2011	Japonska	1977-2009	govedo	545	78,0	ACSSuT, ASSuT
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	govedo	122	81,1	
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	piščanci	94	44,7	
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	purani	117	77,8	
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	kunci	83	50,6	
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	golobi	105	9,5	
Huges in sod., 2008	severna Anglija	2005-2006	divje ptice	29	0,0	

^a podatki iz 12 držav; ekstremno velik delež Potrgalska 73,9% in Francija 72,1%, Slovenija 55,3%

^b podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 16: Podatki iz literature o dobri občutljivosti izolatov *S. Typhimurium*

Table 16: Data from literature about the sensitivity of the isolates of *S. Typhimurium*

poročevalec	država	leto		št. testiranih	% občutljivih
EFSA, 2017	EU	2015	človek	1063	38,5
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	človek	1870	7,4
TorpdaHL in sod., 2013	Danska	2009-2010	človek	194	50,0
TorpdaHL in sod., 2013	Tajvan	2009-2010	človek	184	8,6
Ke in sod., 2014	Quandong (Kitajska)	2007-2012	človek	523	12,6
Wedel in sod., 2005	Minnesota (ZDA)	1997-2003	človek	1028	55,7
EFSA, 2017	EU	2015	prašiči	63	0,0 - 47,0 ^a
EFSA, 2017	EU	2015	trupi pitancev	135	0,0 - 100,0 ^a
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči	581	14,3
Van Boxtael in sod., 2012	Belgija	2001-2006	prašiči meso	255	17,6
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	prašiči	632	10,9
Almedia in sod., 2016	Brazilija	2000-2012	prašiči	27	37,0
Swedres-Swarm, 2013	Švedska	2000-2012	proiz. živali	281	74,0
Wedel in sod., 2005	Minesota (ZDA)	1997-2003	prašiči in govedo	716	10,6
Tamamura in sod., 2011	Japonska	1977-2009	govedo	545	7,5
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	govedo	122	13,1
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	piščanci	94	20,2
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	purani	117	7,7
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	kunci	83	28,9
Graziani in sod., 2008	Italija	2002-2004	golobi	105	74,3
Huges in sod., 2008	severna Anglija	2005-2006	divje ptice	29	100,0

^a podatki iz 5 držav; za Slovenijo ni podatka

Tabela 22 : Genetske skupine in genotipi v njih ter število izolatov po kategorijah in letih

Table 22: Genetic groups, genotypes and number of isolates regarding cathegories and year of isolation

Genetska skupina	St. genotipov v GS	Genotip	Kategorija št. Izolatov			Skupaj izolatov n = 284	Podkategorije živali št.	Genotip	Število izolatov po letih														
			Človek	Zival	Živilo				2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012		
A	4	A1		1		1	0,4	A															
		A2	1			1	0,4																
		A3		1		1	0,4																
		A4		1		1	0,4																
Skupaj A			1	3	4	1,4	0	0	A									2	1	1	0	0	
B	4	B1		1		1	0,4	B															
		B2		1		1	0,4																
		B3		1		1	0,4																
		B4		1		1	0,4																
Skupaj B			1	3	4	1,4	0	1	B									1	3				
C	4	C1	1	1	2	4	1,4	C															
		C2	3			3	1,1																
		C3			1	1	0,4																
		C4	1			1	0,4																
Skupaj C			4	1	1	3	9	3,2	0	1	C								2	1	1	2	3
D	1	D1			2	2	0,7	D															
Skupaj D			1			2	0,7	0	0	D													
E	12	E1	6	2		8	2,8	E															
		E2	1			1	0,4																
		E3	2			2	0,7																
		E5		1		1	0,4																
		E6	1			1	0,4																
		E7	4			4	1,4																
		E8	8	1	1	10	3,5																
		E9	1			1	0,4																
		E10	1			1	0,4																
		E11		1		1	0,4																
		E12	1			1	0,4																
		E13	1			1	0,4																
Skupaj E			19	3	10	32	11,3	3	0	E									1	2	3	8	3
F	31	F1	1	4	2	1	8	2,8	F														
		F2			1		1	0,4															
		F4		1		1	0,4																
		F5	1			1	0,4																
		F6	2	3		5	1,8																
		F7	3	7	4	14	4,9																
		F9	16	38	28	1	83	29,2															
		F11	12	5		17	6,0																
		F12			1		1	0,4															
		F13	1			1	0,4																
		F14	1			1	0,4																
		F15	1			1	0,4																
		F16	3			3	1,1																
		F17	2			2	0,7																
		F18	1			1	0,4																
		F19		1		1	0,4																
		F20	1			1	0,4																
G	10	G1	6	1		7	2,5	G															
		G2	1			1	0,4																
		G3		1		1	0,4																
		G4	1			1	0,4																
		G5	2	3		5	1,8																
		G6		1		1	0,4																
		G7	1			1	0,4																
		G8	1			1	0,4																
		G9	1			1	0,4																
		G13	1			1	0,4																
Skupaj G			12	5	3	20	7,0	2	3	0	G								1	1	1	2	7
H	7	H1	1		4	5	1,8	H															
		H2		1		1	0,4																
		H3	2			2	0,7																
		H4	1			1	0,4																
		H5	1			1	0,4																
		H6	1			1	0,4																
		H7	1			1	0,4																
Skupaj H			4	4	4	12	4,2	1	3	0	H								1	1	1	2	1
I	2	I1	12	1		13	4,6	I															
		I2	2	1		3	1,1																
Skupaj I			14	2	0	16	5,6	2	0	I								1	1	3	2	4	
X*			21			7	4	5	X									1	2	3	1	2	
Skupaj X*			96			93	111	71	9	284	100	89	22					21	9	27	9	13	
% od 284			32,7	39,1	25,0	3,2	100,0	31,3															

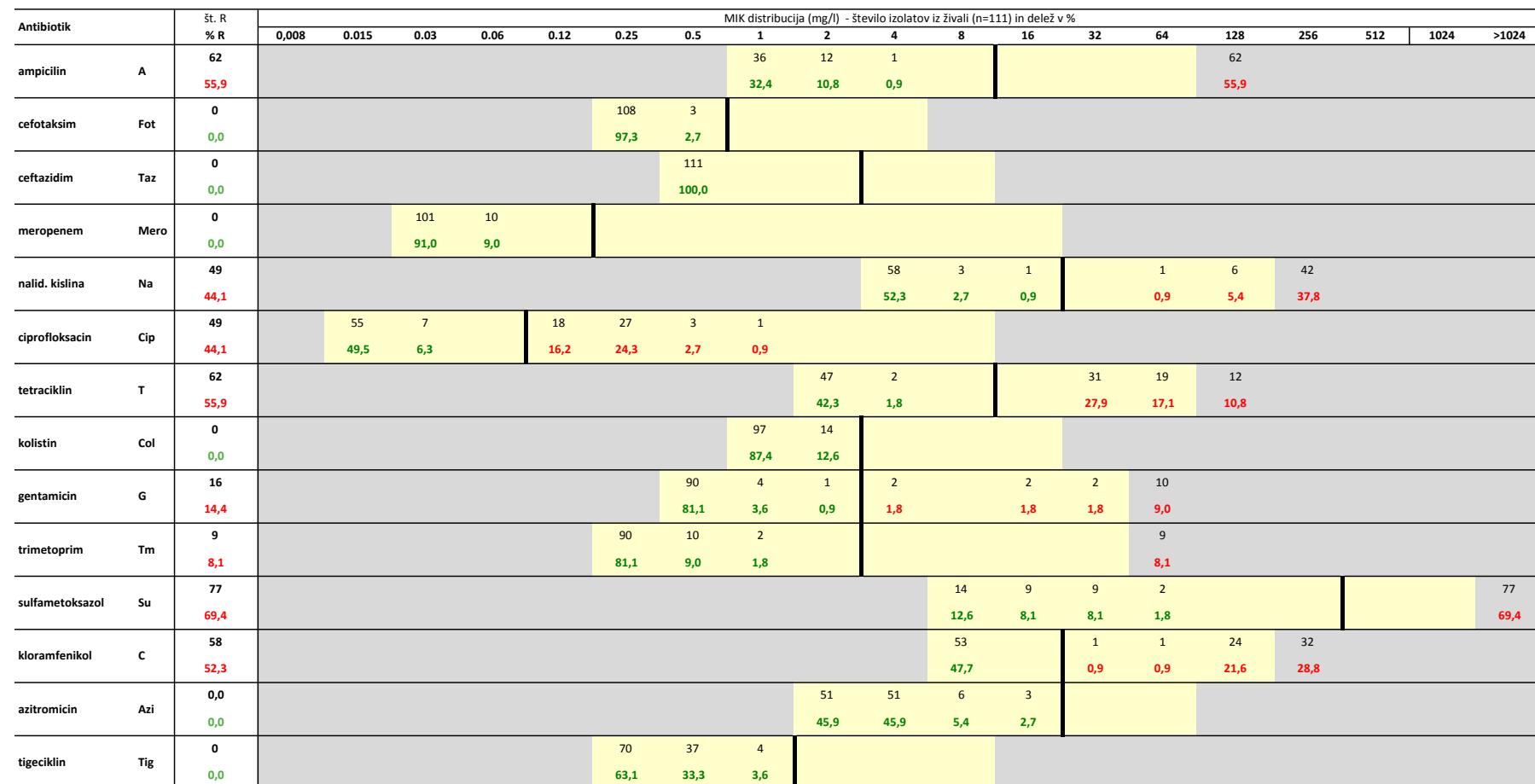
Tabela 26: Distribucija MIK pri izolatih iz ljudi (n = 93)

Table 26: Distribution of MIC in isolates from humans (n=93)

Antibiotik	št. R % R	MIK distribucija (mg/l) - število izolatov iz ljudi (n=93) in delež v %																		
		0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	>1024
ampicilin	A	43 46,2							22	27	1						43			
									23,7	29,0	1,1						46,2			
cefotaksim	Fot	0 0,0							89	4										
									95,7	4,3										
ceftazidim	Taz	0 0,0							90	3										
									96,8	3,2										
meropenem	Mero	0 0,0							89	4										
									95,7	4,3										
nalid. kislina	Na	17 18,3										71	5				8	9		
												76,3	5,4				8,6	9,7		
ciprofloksacin	Cip	17 18,3			50	26		10	7											
					53,8	28,0		10,8	7,5											
tetraciklin	T	46 49,5									46	1				1	7	13	25	
											49,5	5,9				1,1	7,5	14,0	26,9	
kolistin	Col	0 0,0									81	12								
											87,1	12,9								
gentamicin	G	3 3,2									88	1	1			1	2			
											94,6	1,1	1,1			1,1	2,2			
trimetoprim	Tm	3 3,2									86	4						3		
											92,5	4,3						3,2		
sulfametoksazol	Su	47 50,5													7	10	20	7	2	
															7,5	10,8	21,5	7,5	2,2	
kloramfenikol	C	21 22,6													72		1	5	15	
															77,4		1,1	5,4	16,1	
azitromicin	Azi	0,0 0,0										36	50	7						
												38,7	53,8	7,5						
tigeciklin	Tig	0 0,0									55	36	2							
											59,1	38,7	2,2							

Tabela 27: Distribucija MIK pri izolatih iz živali (n = 111)

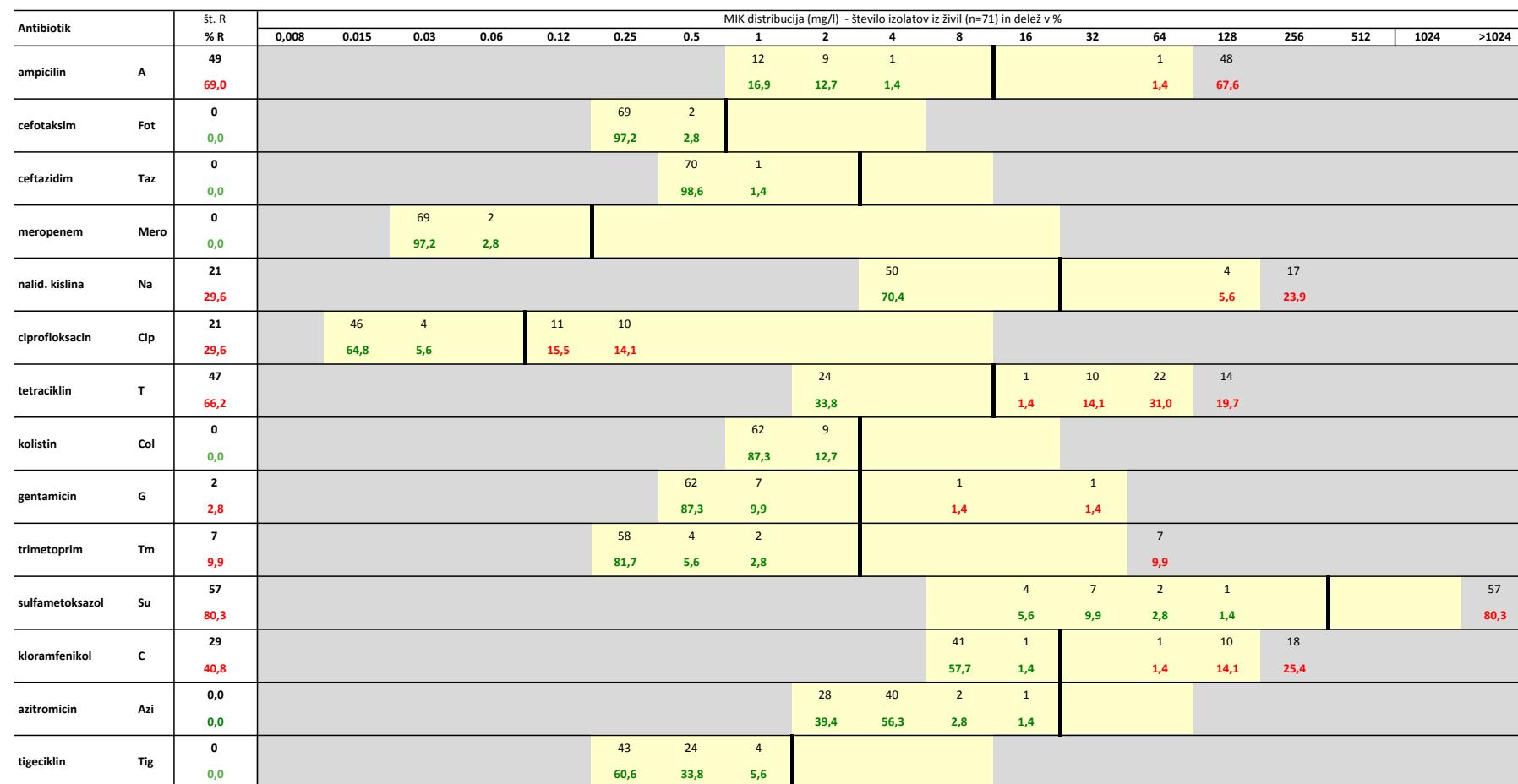
Table 27: Distribution of MIC in isolates from animals (n=111)



Legenda: območje testiranja je rumeno obarvano polje

Tabela 28: Distribucija MIK pri izolatih iz živil (n = 71)

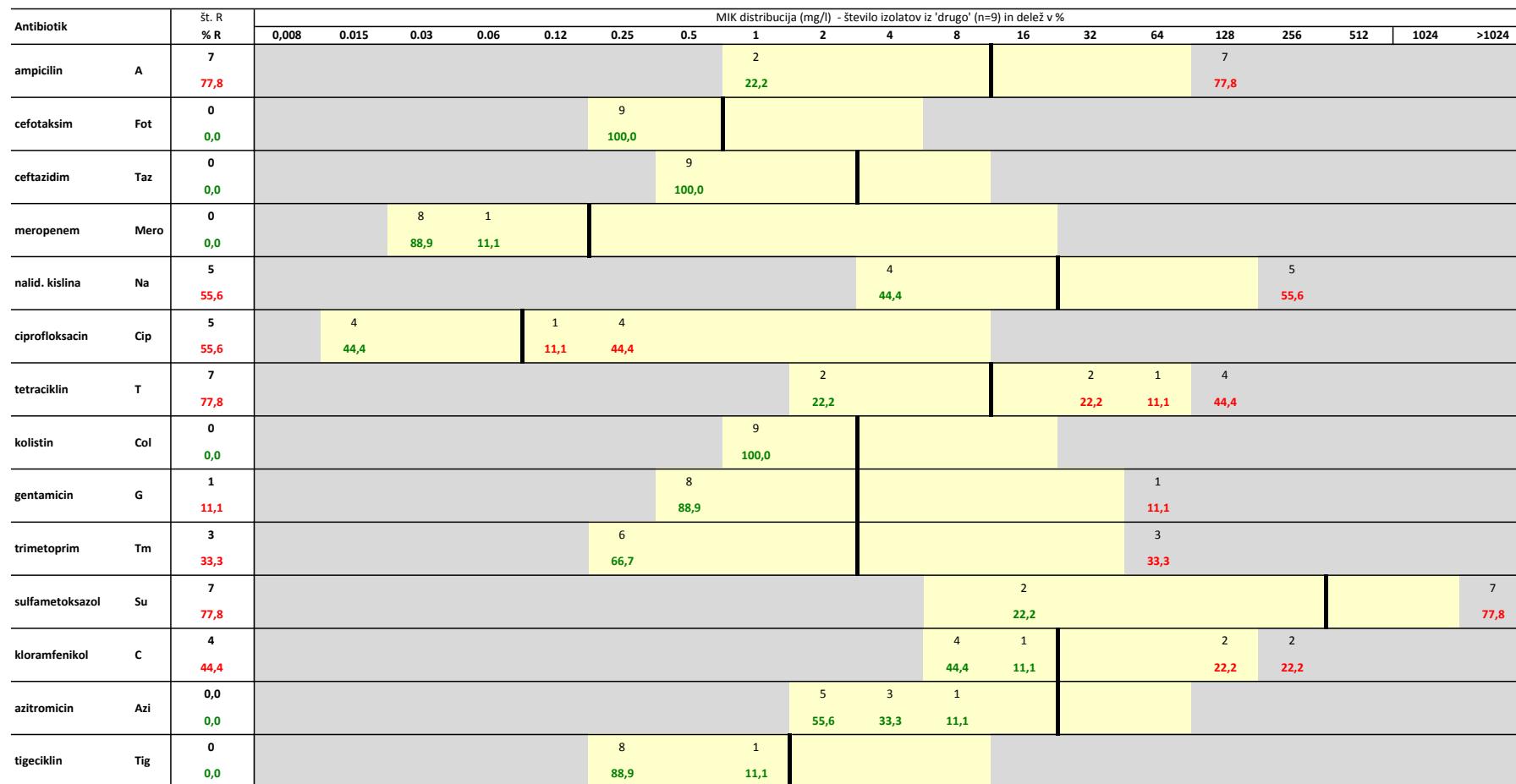
Table 28: Distribution of MIC in isolates from foodstuffs (n=71)



Legenda: območje testiranja je rumeno obarvano polje

Tabela 29: Distribucija MIK pri izolatih iz drugih vzorcev (n = 9)

Table 29: Distribution of MIC in isolates from other samples (n=9)



Legenda: območje testiranja je rumeno obarvano polje

Tabela 30: Primerjava odpornosti (število in delež) proti posameznim antibiotikom med kategorijami in podkategorijami

Table 30: Comparison of the resistance (number and percentage) to individual antibiotics regarding categories and subcategories

Kategorije	MDR	Ampicilin	Kloramfenikol	Gentamicin	Nalidiksinska kislina	Sulfonamidi	Tetraciklin	Trimetoprim
	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)
Vsi	n = 284	158 (55,6)	161 (56,7)	112 (39,4)	22 (7,7)	92 (32,4)	188 (66,2)	161 (56,7)
Človek	n = 93	40 (43,0)	43 (46,2)	21 (22,6)	3 (3,2)	17 (18,3)	47 (50,5)	46 (49,5)
Žival	n = 111	65 (58,6)	62 (55,9)	58 (52,3)	16 (14,4)	49 (44,1)	77 (69,4)	62 (55,9)
Živila	n = 71	46 (64,8)	49 (69,0)	29 (40,8)	2 (2,8)	21 (29,6)	57 (80,3)	46 (64,8)
Drugo	n = 9	7 (77,8)	7 (77,8)	7 (77,8)	4 (44,4)	1 (11,1)	5 (55,6)	7 (77,8)
Prašiči	n = 47	36 (76,6)	32 (68,1)	30 (63,8)	14 (29,8)	33 (70,2)	37 (78,7)	32 (68,1)
Perutnina	n = 39	23 (59,0)	24 (61,5)	23 (59,0)	1 (2,6)	13 (33,3)	33 (84,6)	23 (59,0)
Govedo	n = 3	2 (66,7)	2 (66,7)	2 (66,7)	1 (33,3)	2 (66,7)	2 (66,7)	1 (33,3)
Proizvodne živali	n = 89	61 (68,5)	58 (65,2)	55 (61,8)	16 (18,0)	48 (53,9)	72 (80,9)	57 (64,0)
Druge živali	n = 22	4 (18,2)	4 (18,2)	3 (13,6)	0 (0,0)	1 (4,5)	5 (22,7)	5 (22,7)
Živali monitoring	n = 64	36 (56,3)	37 (57,8)	34 (53,1)	3 (4,7)	24 (37,5)	45 (70,3)	36 (56,3)
Živali klinika	n = 47	29 (61,7)	25 (53,2)	24 (51,1)	13 (27,7)	25 (53,2)	32 (68,1)	26 (55,3)
Meso prašičev	n = 19	11 (57,9)	13 (68,4)	6 (31,6)	1 (5,3)	6 (31,6)	14 (73,7)	11 (57,9)
Meso perutnine	n = 25	17 (68,0)	17 (68,0)	16 (64,0)	0 (0,0)	8 (32,0)	22 (88,0)	16 (64,0)
Meso goveda	n = 2	2 (100)	2 (100)	1 (50%)	0 (0,0)	1 (50,0)	2 (100)	2 (100)
Mleto meso in pripravki* n = 24		16 (66,7)	17 (70,8)	6 (25,0)	1 (4,2)	6 (25,0)	18 (75,0)	17 (70,8)

Tabela 35: Število in odstotek dobro občutljivih izolatov (n = 79) po genetskih skupinah ter kategorijah in podkategorijah živali in živil

Table 35: Number and percentage of sensitive isolates (n=79) regarding genetic groups and categories and subcategories animals and foodstuffs

Dobro občutljivi n=79	SKUPAJ	Genetska skupina						
		B	E	F	G	H	I	X ^a
	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)
VSI	Skupaj	79 (100,0)	3 (3,8)	4 (5,1)	28 (35,4)	13 (16,5)	9 (11,4)	13 (16,5)
kategorija	čovek	40 (50,6)		4 (5,1)	13 (16,5))	8 (10,1)	2 (2,5)	11 (13,9)
	žival	30 (38,0)	1 (1,3)		15 (19,0)	4 (5,1)	3 (3,8)	5 (6,3)
	živilo	8 (10,1)	2 (2,5)			1 (1,3)	4 (5,1)	1 (1,3)
	drugo	1 (1,3)						1 (1,3)
podkategorija	prašiči	8 (10,1)			8 (10,1)			
žival	perutnina	6 (7,6)			1 (1,3)	1 (1,3)	2 (2,5)	1 (1,3)
	govedo							
	druge živali	16 (20,3)	1 (1,3)		6 (7,6)	3 (3,8)	2 (2,5)	4 (5,1)
podkategorija	meso praš.	4 (5,1)	2 (2,5)				1 (1,3)	1 (1,3)
živila	meso perut.	3 (3,8)					2 (2,5)	
	meso gov.	0 (0,0)						
	mešano							
	meso	1 (1,3)					1 (1,3)	

X^a unikatni genotipi

Tabela 36: Število in delež večkratno odpornih izolatov (n = 158) po genetskih skupinah ter kategorijah in podkategorijah žival in živilo

Table 36: Number and percentage of multiple drug resistant isolates (n=158) regarding genetic groups and categories and subcategories animal and foodstuffs

MDR n=158		Genetska skupina										
		Skupaj	A	B	C	D	E	F	G	H	I	X ^a
		št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)	št. (%)
VSI kategorija	Skupaj	158 (100,0)	3 (1,9)	1 (0,6)	6 (3,8)	2 (1,3)	25 (15,8)	110 (69,6)	1 (0,6)	0 (0,0)	2 (1,3)	8 (5,1)
	človek	40 (25,3)			2 (1,3)		14 (8,9)	18 (11,4)	1 (0,6)		2 (1,3)	3 (1,9)
	žival	65 (41,1)			1 (0,6)		3 (1,9)	57 (36,1)				4 (2,5)
	živilo	46 (29,1)	3 (1,9)	1 (0,6)	1 (0,6)	2 (1,3)	8 (5,1)	31 (19,6)				
podkategorija žival	drugo	7 (4,4)			2 (1,3)			4 (2,5)				1 (0,6)
	prašiči	33 (20,9)					3 (1,9)	30 (19,0)				
	perutnina	26 (16,5)						23 (14,6)				3 (1,9)
	govedo	2 (1,3)						2 (1,3)				
podkategorija živila	druge živali	4 (2,5)			1 (0,6)			2 (1,3)				1 (0,6)
	meso praš.	11 (7,0)	1 (0,6)	1 (0,6)			2 (1,3)	7 (4,4)				
	meso perut.	17 (10,8)					1 (0,6)	16 (10,1)				
	meso gov.	2 (1,3)					1 (0,6)	1 (0,6)				
	mešano meso	16 (10,1)	2 (1,3)		1 (0,6)	2 (1,3)	4 (2,5)	7 (4,4)				

X^a unikatni genotipi

Slika 20: Dendrogram genotipov izolatov *S. Typhimurium*

Figure 20: Dendrogram of genotypes of *S. Typhimurium* isolates

