

IZVJEŠTAJ O REZULTATIMA PILOT PROJEKTA

Povezanost između pokazatelja dobrobiti temeljenih na životinji i
prisustva bakterije *Yersinia enterocolitica*
kao indikatora sigurnosti hrane

Usvojeno 12. prosinca 2017.

UVOD

Rezultati određenih znanstvenih istraživanja ukazuju na to da su svinje i svinjsko meso značajan izvor zaraze za gastrointestinalno oboljenje ljudi - jersiniozu, uzrokovanu s patogenim sojevima *Yersinia (Y.) enterocolitica* (Bhaduri i sur., 20005.; Laukkanen-Ninios i sur., 2014). Sojevi *Y. enterocolitica* izolirani u ljudima imali su genotipove koji se ne razlikuju od genotipova otkrivenih u svinjama i proizvodima od svinjskog mesa (Wojciech i sur., 2004; Fearnley i sur., 2005; Kuehni-Boghenbor i sur., 2006; Wang i sur., 2009; Huovinen i sur., 2010; Virtanen i sur., 2013). Iako je jersinioza vrlo značajna zoonoza i treća po učestalosti kao uzrok enteritisa u Europi (Esnault i sur., 2014), prijenos s čovjeka na čovjeka vrlo je rijedak.

Cilj istraživanja bio je utvrditi postoji li povezanost određenih pokazatelja dobrobiti temeljenih na životinji (Animal Based Measures – ABM) s pojavnosću jersinije u svinja odnosno tonzilama svinja te proširiti postojeća saznanja o opasnostima porijeklom iz svinjskog mesa. Rezultati istraživanja doprinose podizanju sigurnosti hrane na višu razinu te posljedično podižu razinu zaštite zdravlja ljudi. Također, rezultati istraživanja proširuju spoznaje o zdravlju i dobrobit životinja u klaoničkim objektima.

Mjere temeljene na životinji najprikladniji su pokazatelji dobrobiti životinja, a pomno odabrana kombinacija mjera temeljenih na životinjama može se koristiti za procjenu dobrobiti ciljane populacije na znanstveno prihvatljiv način (EFSA, 2012). Sukladno ciljevima ovog istraživanja u obzir je uzeta najprikladnija kombinacija mjera temeljenih na životinjama.

PROCJENA RIZIKA

1. Identifikacija opasnosti

Rod *Yersinia* pripadnik je porodice *Enterobacteriaceae*. Pripadnici ovog roda su štapićaste, Gram negativne, fakultativno anaerobne, nesporulirajuće bakterije. Rod *Yersinia* trenutno obuhvaća 17 vrsta, od kojih tri (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*) mogu izazvati oboljenje ljudi (Drummond i sur., 2012). *Y. pestis* uzročnik je kuge, a *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* uzročnici su jersinioze – bolesti koju karakteriziraju pretežno gastrointestinalni simptomi. Do pojave ove bolesti najčešće dolazi uslijed konzumacije hrane, osobito proizvoda od svinjskog mesa, ali i vode za piće kontaminirane animalnim fecesom (Tauxe i sur., 1987). Iako je jersinioza vrlo značajna zoonoza i treća po učestalosti kao uzrok enteritisa u Europi (Esnault i sur., 2014), prijenos s čovjeka na čovjeka vrlo je rijedak.

Većina pojava jersinioze uzrokovana je *Y. enterocolitica* (Long i sur., 2010). Glavni rezervoar ove vrste, koje je vrlo česta u okolišu, jesu svinje (Fredriksson-Ahomaa i sur., 2006; Virtanen i sur., 2012.).

Y. enterocolitica često se izdvaja iz kliničkih uzoraka poput rana, fecesa, ispljuvka i mezenterijalnih limfnih čvorova. *Y. enterocolitica* izdvaja se iz glodavaca i domaćih životinja (ovce, goveda, svinje, psi i

mačke) kao i iz vode koju kontaminiraju. Sirovo ili nedovoljno termički obrađeno svinjsko meso moguće izvor infekcije s *Y. enterocolitica*. Pripadnici *Yersinia* spp. se često nalaze u tonzilama i crijevnom sadržaju klinički zdravih svinja u klaonicama.

Y. enterocolitica se sastoji od šest biotipova i više od 50 različitih serotipova koji su heterogeni s obzirom na njihov patogeni potencijal. Sojevi biotipova 1B, 2, 3, 4 i 5 su klasificirani kao patogeni za ljude. U Europi su infekcije ljudi najčešće uzrokovane biotipom 4 (serotip O:3) i biotipom 2 (serotip O:9). Čak 86% slučajeva jersinioze kod ljudi u Njemačkoj (s dostupnim informacijama o serotipu) uzrokovano je Bio/Serotip 4/O:3 (RKI, 2012a). Sojevi biotipa 1A (serotip O:5) često se izoliraju iz uzoraka okoliša, fecesa ljudi i životinja te uzoraka hrane. Oni se, međutim, rijetko mogu povezati s ljudskim infekcijama (Tenannt i sur., 2003). U Americi se iz oboljelih ljudi najčešće se izdvajaju serotipovi O:8, O:4, O:32, O:13a, O:13b.

Y. pseudotuberculosis prevladava u okolišu, u kojem može preživjeti dugo vremena. Svi sojevi ove vrste su potencijalno patogeni za ljude i mnoge životinjske vrste. Serotip I je daleko najčešći serotip u Europi, a može ga se povezati s infekcijama životinja i ljudi. Drugi najčešći serotip je serotip III. Divlje životinje su vjerojatno najvažniji rezervoar *Y. pseudotuberculosis* u Europi. Ovaj je patogen detektiran i kod netretiranih površinskih voda. Povrće može biti kontaminirano ovim patogenom putem izravnog kontakta s izmetom divljih životinja ili putem kontaminirane vode, primjerice tijekom navodnjavanja, žetve ili transporta (EFSA, 2007a).

Svi potpuno virulentni sojevi *Y. enterocolitica* nose 70 kbp (kilo bazna par) plazmid nazvan pYV (plazmid za *Yersinia* virulenciju). pYV plazmid pomaže *Y. enterocolitici* da opstane i prolifera u tkiva domaćina kroz proizvodnju raznih proteina nazvanih Yops (*Yersinia* outer membrane proteins) (Cornelis i sur., 1987; Starley i sur., 1993; Bansal i sur., 2000).

Y. enterocolitica i *Y. pseudotuberculosis* rastu na temperaturama između 0 °C i 42 °C (optimalna temperatura 28 °C). S obzirom na to da se mogu razmnožavati na 4 °C, temperatura u hladnjaku nije dovoljno učinkovita da ograniči rast bakterija. *Yersinia* spp. može opstati i ostati infektivna čak i u zamrznutoj hrani tijekom nekoliko tjedana. Uobičajeni načini termičke obrade, poput kuhanja i pasterizacije ubijaju patogene. Zagrijavanje najmanje na 70 °C tijekom dvije minute smatra se dovoljnim kako bi se uništilo jersiniju (pod uvjetom da se navedena toplina postigne i u unutrašnjosti hrane (BFR, 2012.)).

Rizik na hrana

Izvor zaraze za čovjeka najčešće je kontaminirana hrana životinjskog podrijetla, a kao glavni rizik literatura navodi meso svinja i proizvode od mesa svinja (Bottone, 1999; Gousia i sur., 2011). *Y. enterocolitica* također je dokazana i u ostalim vrstama mesa (Bonardi i sur., 2010) te kod mnogih sisavaca, ptica, žaba, riba, puževa, rakova, školjki i u tlu kontaminiranom životinjskim fekalijama

(Kapperud, 1981; Shayegani i sur., 1986; Buller 2014). Kao uzrok infekcije čovjeka opisani su još i tofu, pijenje neklorirane vode i nepasterizirano kravljje mlijeko (Bari i sur., 2011; Sabina i sur., 2011).

Dokazivanje uzročnika u hrani

Za mikrobiološku pretragu hrane na prisutnost bakterije *Yersinia enterocolitica* koristi se metoda: HRN EN ISO 10273:2004: Mikrobiologija hrane i stočne hrane - Horizontalna metoda za dokazivanje suspektne patogene *Yersinia enterocolitica* (ISO 10273:2003; EN ISO 10273:2003).

Infekcijska doza

Trenutno nema pouzdanih podataka kojima se definira moguća minimalna infekcijska dozakoja bi omogućila estimaciju odnosa doza/učinak. Agencija za javno zdravstvo Kanade (Public Health Agency of Canada) navodi infekcijsku dozu od 10^8 cfu-a (Fleming i Hunt, 2006). Međutim, niti jedna druga zdravstvena agencija (npr. američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (Center for Disease Control and Prevention - CDC) nije objavila takav podatak, niti se on može provjeriti putem bilo kojeg drugog izvora. Može se pretpostaviti da je minimalna infekcijska doza slična kao za *Salmonella* spp., ovisno o vrsti hrane i imunološkom statusu izloženih skupina potrošača (BfR, 2013).

Dijagnostika bolesti u čovjeka

Dijagnoza jersinioze postavlja se izdvajanjem uzročnika iz fecesa, krvi, povraćenog sadržaja. Potvrda dijagnoze postavlja se izdvajanjem i identifikacijom uzročnika i njegovom serološkom tipizacijom iz čovjeka i sumnjive hrane. Proljev se javlja u 80% slučajeva, a bol u trbuhu i vrućica su najčešći simptomi. Zbog poteškoća s izdvajanjem *Yersinia* spp. iz fecesa, u mnogim se zemljama koristi serološka pretraga (određivanje specifičnih protutijela u krvnom serumu). Krv se uzima u akutnoj fazi bolesti i tijekom oporavka bolesnika i pretražuje na prisutnost i količinu specifičnih protutijela za enteropatogene serovare *Y. enterocolitica*.

2. Karakterizacija opasnosti

Jersinioza se javlja sporadično, obično od 24 do 48 sati nakon konzumacije kontaminirane hrane (EFSA, 2007b; RKI, 2012b). Nakon infekcije, u male djece obično se razviju simptomi akutnog gastroenteritisa (vrućica, voden do krvav proljev, povraćanje i sl.), dok se kod djece školske dobi i mladih obično manifestira mezenterijalni limfadenitis praćen bolovima u trbuhu. Ove simptome treba diferencirati od bolova kod upale slijepog crijeva.

U odraslih osoba simptomi mogu biti slični onima kod gripe praćene upalom ždrijela. Ukoliko su neke bolesti već prisutne (šećerna bolest, ciroza jetre, imunosupresija) može doći i do nastanka apscesa na jetri, endokarditisa, perikarditisa, pleuritisa itd. Ostale štetne posljedice bez direktnog otkrivanja patogena su reaktivni artritis (obično u 2-3% slučajeva nakon probavnih simptoma), uporni ileitis

(pseudo-Crohnova bolest) i nodozni eritem (Heesemann, 1998). Ako infekcija prijeđe u septicemiju, život pacijenta može biti ugrožen.

Iznimno, *Y. enterocolitica* može uzrokovati infekcije rana, zglobova i urinarnog trakta. Također može uzrokovati upalu pluća, meningitis ili septicemiju. Kvalitativnom procjenom rizika *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Toxoplasma gondii* i *Trichinella* spp. identificirani su kao najvažnije biološke opasnosti u kontekstu inspekcijskog pregleda mesa svinja (EFSA, 2011).

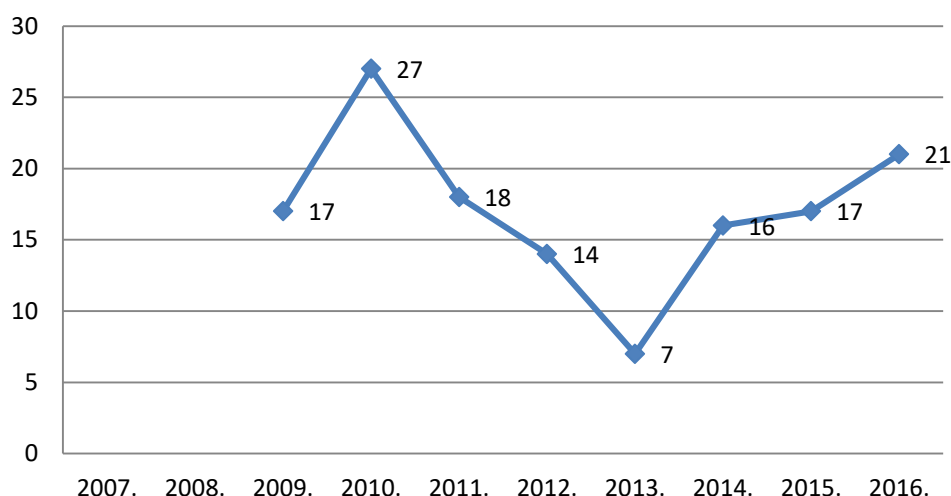
Učestalost jersinioze

Na razini Europske unije u 2015. godini ukupno je potvrđeno 7.202 slučaja jersinioze, što ovu bolest svrstava u treće najčešće prijavljivanu zoonozu u EU (EFSA i ECDC, 2016). Zamjetan je statistički značajni osmogodišnji (2008-2015) trend smanjenja incidencije/prevalencije jersinioze. Najviše stope prijavljivanja bolesti zabilježene su u zemljama članicama u sjeveroistočnoj Europi. *Y. enterocolitica* je najčešće prijavljivana vrsta izolirana kod ljudskih slučajeva jersinioze. Najčešći serotip u 2015. godini bio je O:3, iza kojeg slijede O:9 i O:5.27 (EFSA i ECDC, 2016).

U 2015. godini, samo su tri zemlje članice EU izvijestile o pozitivnim rezultatima za jersiniju u svinjskom mesu i proizvodima od svinjskog mesa (11,3% od 952 ispitanih uzoraka), dok su dvije zemlje članice EU izvijestile o pozitivnim rezultatima u svinja (11,0% od 2.050 testiranih uzoraka). Pozitivni uzorci utvrđeni su i u drugim vrstama hrane (goveđe meso, sirovo kravlje i sirovo kozje mlijeko, salata spremna za jelo) te kod drugih životinja (goveda, mačke, psi, jeleni, lisice, zečevi, kune, divokoze, divlje svinje i druge divlje životinje). *Y. enterocolitica* je najčešće prijavljivana vrsta *Yersinia* u hrani i životinjama.

Učestalost bolesti u Republici Hrvatskoj

U Republici Hrvatskoj je za 2015. prijavljeno 17 humanih slučajeva (Slika 1.). Od 2009. do 2016. broj prijavljenih se kretao od 7 do 27 godišnje. Za razliku od većine drugih crijevnih infekcija, jersinioza se češće javlja za hladnih mjeseci, iako se ovakav trend ne vidi u Hrvatskoj (Epidemiološki vjesnici 2012.-2016). Češće se javlja u sjevernim zemljama (Skandinavske zemlje, Nizozemska, Kanada).



Slika 1. Kretanje broja oboljelih od jersinioze u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2009. do 2016. godine

Rizik na populacija

Prema dobnoj specifičnosti incidencija jersinioze najčešća je u male djece u dobi između 1 i 3 godine. S obzirom da njihov imunološki sustav nije u potpunosti razvijen, mala djeca su vjerojatno posebno osjetljiva na infekcije s *Y. enterocolitica*. Incidencija se smanjuje s dobi i ostaje na stalno niskoj razini tijekom odrasle dobi (RKI, 2012a, b). Osim male djece prema ovoj infekciji osjetljiviji su pripadnici starije populacije i osobe koje su pod imunosupresivnom terapijom. Od reaktivnog artritisa najčešće obolijevaju ljudi koji na leukocitima posjeduju antigen HLA-B27 (HAH, 2009).

Provedeno istraživanje

Opći cilj istraživanja bio je proširiti postojeća saznanja o opasnostima porijeklom iz hrane i potvrditi ili odbaciti povezanost određenih pokazatelja dobrobiti temeljenih na životinji (Animal Based Measures – ABM) sa pojavnošću jersinije, a samim time doprinijeti podizanju sigurnosti hrane na višu razinu i posredno utjecati na zaštitu života i zdravlja ljudi, uzimajući u obzir zdravlje i dobrobit životinja u klaonicama.

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

1. Utvrditi status dobrobiti životinja prilikom dolaska i boravka u klaonici sve do trenutka usmrćivanja, temeljeno na pokazateljima dobrobiti temeljenim na životinjama;
2. Utvrditi pojavnost i broj *Yersinia* spp. u tonzilama svinja;
3. Utvrditi značajnost i povezanost između pokazatelja dobrobiti temeljenih na životinjama i pojavnosti *Yersinia* spp. u tonzilama svinja.

3. Materijali i metode istraživanja

Procjena pokazatelja dobrobiti temeljenih na životinji provedeno je na 100 tovnih svinja. Utvrđivanje pokazatelja dobrobiti životinja obavljalo se tijekom boravka svinja u klaoničkim depovima četiri različite komercijalne klaonice, smještene u kontinentalnom dijelu Republike Hrvatske (Zagrebačka županija). Svinje su na mjesto istovara stigle nakon transporta u trajanju 4-5 sati, a u prostoru za odmor su boravile između dva i četiri sata prije klaoničke obrade.

Laboratorijski dio istraživanja je obavljen u Hrvatskom veterinarskom institutu (HVI) u Zagrebu.

Istraživanje je provedeno u tri faze:

- I. Utvrđivanje statusa dobrobiti životinja prilikom dolaska i boravka u klaonici sve do trenutka usmrćivanja, prema standardima Welfare Quality® (WQ) protokola za svinje (Welfare Quality®, 2009). Obavljeno je deset procjena dobrobiti u četiri različite komercijalne klaonice svinja, te je kod svake procjene uzorkovano 10 uzoraka tonzila svinja za mikrobiološku analizu, što ukupno čini 100 uzoraka.
- II. Utvrđivanje pojavnosti i ukupnog broja *Yersinia enterocolitica* u tonzilama svinja. Pojavnost i ukupni broj utvrđen je prema HRN EN ISO 10273:2004 metodi na svih 100 uzoraka tonzila svinja, nad kojima je provedena procjena statusa dobrobiti prema standardima Welfare Quality® (WQ) protokola za svinje.
- III. Utvrđivanje značajnosti i povezanosti između pokazatelja dobrobiti temeljenih na životinjama i pojavnosti *Yersiniae* u tonzilama svinja. Provedena je statistička obrada podataka u programu STATA 13.1. (Stata Corp., SAD).

Kao pokazatelji dobrobiti temeljeni na životinji (ABM) koji će biti procijenjeni odabrano je 27 pokazatelja podijeljenih u četiri skupine sukladno WQ protokolu (Tablica 1.)

Tablica 1. Mjere za procjenu dobrobiti životinja

				
DOBRA ISHRANA	<ul style="list-style-type: none"> • Građa tijela • Dostupost hrane • Dostupnost vode 	DOBAR SMJEŠTAJ <ul style="list-style-type: none"> • Bursitis • Uprljanost fecesom • Drhtanje • Zadihanost • Grupiranje • Padanje • Klizanje 	DOBRO ZDRAVLJE <ul style="list-style-type: none"> • Broj bolesnih • Broj mrtvih • Ozljede • Šepavost • Grizenje repa • Kašalj • Kihanje • Pumpanje • Zaokrenuta njuška • Prolaps rektuma • Crijevni problemi • Kožni problemi • Rupture/ Hernije • Pneumonia pleuritis perikarditis 	PRIKLADNO PONAŠANJE <ul style="list-style-type: none"> • Vokalizacija • Neodlučni u kretanju • Okretanje unazad

Navedeni pokazatelji odabrani su kako bi što kvalitetnije procijenila dobrobit životinja.

- Prva skupina pokazatelja određena je kako bi se procijenilo opće stanje životinje (građa tijela), te odsutnost duljeg zanemarivanja životinja (dostupnost hrane i vode).
- Druga skupina pokazatelja govori u prilog samoj infrastrukturi klaoničkog objekta (uprljanost fecesom) i farme (bursitis), lakoći dostupnosti pojedinih prostora klaonice životinjama (klizanje i padanje), kao i opće mikroklimatske uvjete (drhtanje, zadihanost, sakupljanje).
- Treća, najbrojnija skupina pokazatelja procjenjuje zdravstveno stanje životinja za života (šepavost, kašanj, kihanje...) i *post mortem* (pneumonia, pleuritis, perikarditis), kvalitetu transporta (broj uginulih) i općenitog ophođenja sa životinjama (ozljede, grizenje repa).
- Četvrta skupina pokazatelja procjenjuje stres i strah kod životinja kao pokazatelje ponašanja.

Uzorkovanje

Uzorkovanje je provedeno sukladno EFSA-inim preporukama (EFSA, 2009b). Uzimao se po jedan uzorak sa svakog trupa, a dvije tonzile smatrane su jednim potpunim uzorkom. Na liniji klanja, uzorci tonzila uzorkovani su jednokratnim rukavicama, a tonzile su uklanjane pomoću sterilnog pribora (sterilnih škara i jednokratnih plastičnih pinceta). Uklonjene tonzile pohranjivale su se pojedinačno u jednokratne sterilne plastične vrećice i u spremnik za transport u laboratorij. Rukavice su mijenjane nakon uzorkovanja svakog pojedinog uzorka.

Mikrobiološko pretraživanje

Ukupno je pretraženo 100 uzoraka tonzila svinja na prisutnost bakterije *Yersinia enterocolitica* postupcima selektivnog namnažanja prema HRN EN ISO 10273:2004 metodi. Prema navedenoj metodi obavezno je korištenje svih postupaka selektivnog namnažanja te su za izdvajanje *Yersinia* spp. podjednako dobri rezultati ostvareni kroz primjenu:

- PSB bujon (Biolife, Italija) inkubiran tijekom 2 dana pri 25°C nakon čega je slijedilo naciepljivanje na površinu CIN agara (Oxoid, UK);
- PSB bujon inkubiran tijekom 2 dana pri 25°C te potom tretiran s KOH nakon čega je slijedilo naciepljivanje na površinu CIN agara;
- ITC bujon (Biolife, Italija) inkubiran tijekom 2 dana pri 25°C nakon čega je slijedilo naciepljivanje na površinu dvije selektivne podloge: CIN agara i SSDC agara (Oxoid, UK).

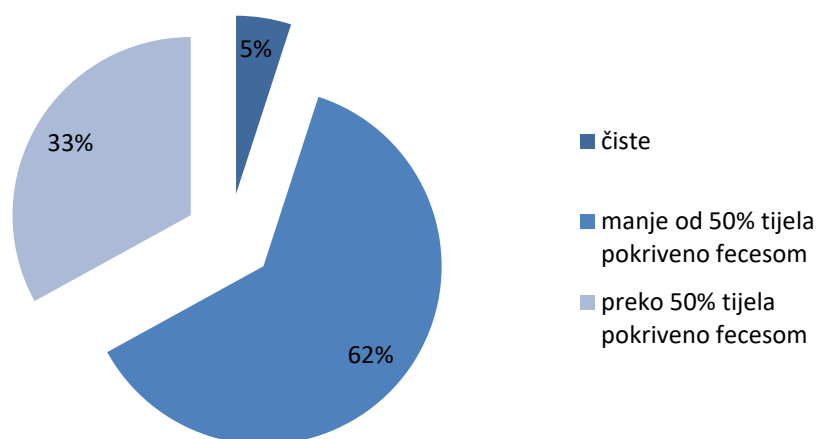
Najlošiji rezultati postignuti su selektivnim namnažanjem u PSB bujonu tijekom 5 dana pri 25°C, sa i bez tretiranja s KOH nakon čega je slijedilo naciepljivanje na površinu CIN agara. Sve hranjive podloge inkubirane su pri 30°C tijekom 48 sati. Uz navedeno uzorci su dodatno pretraženi metodom izravnog naciepljivanja s PSB bujona na CIN agar bez prethodne inkubacije radi određivanja broja *Y. enterocolitica*. Postupak provedbe enumeracije proveden je prema opisanom u literaturnim podacima (Alpigiani, 2012), pri čemu je 50 µl bujona naciepljeno na površinu dva CIN agara koji su potom inkubirani pri 30°C tijekom 48 sati. Nakon pregleda poraslih kolonija, one karakteristične za *Y. enterocolitica* precijepljene su u svrhu preliminarne biokemijske identifikacije na krvni agar s dodatkom eskulina (Merck, Njemačka), zatim na Christensen urea agar (Oxoid, UK) te TSI (Triple sugar iron) agar (Merck, Njemačka). Završna biokemijska identifikacija provedena je VITEK2 sustavom (Biomérieux, Francuska) te provjerom fermentacije razmnože u ramnoza bujonu (Sigma-Aldrich, Njemačka).

Rezultati

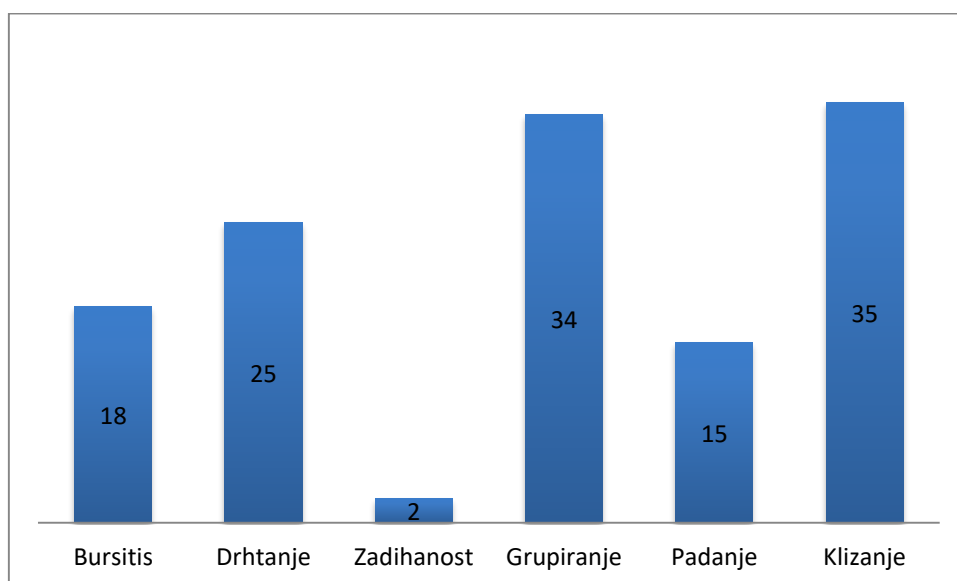
Procjena dobrobiti životinja prema WQ protokolu

Rezultati procjene dobrobiti životinja vezano za prvu skupinu mjera pokazali su da je 15% životinja u klaonici imalo pristup hrani, dok 85% nije, a sve su životinje bile prikladne građe tijela i imale stalan pristup vodi s dovoljnim brojem ispravnih pojilica.

Druga skupina mjera odnosi se na uvjete smještaja, te je u skladu s tim postotak nečistih životinja prikazan na slici 2, a ostali rezultati prikazani su u slici 3. Potrebno je istaknuti kako je procjena dobrobiti započela kad su životinje bile u prostoru za odmor životinja, te nije bilo moguće ocijeniti koliko je životinja već stiglo nečisto, a koliko ih se onečistilo tijekom boravka u prostoru za odmor životinja.

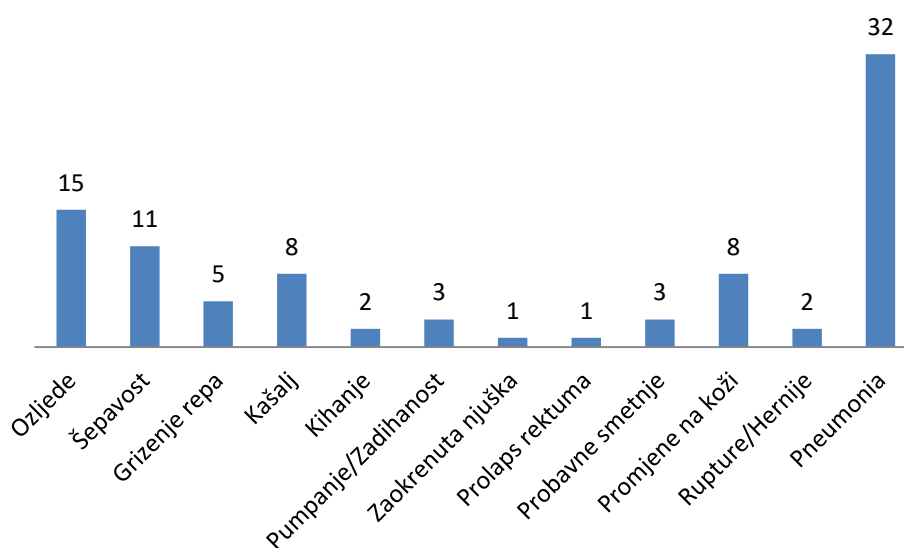


Slika 2. Postotak nečistih životinja.



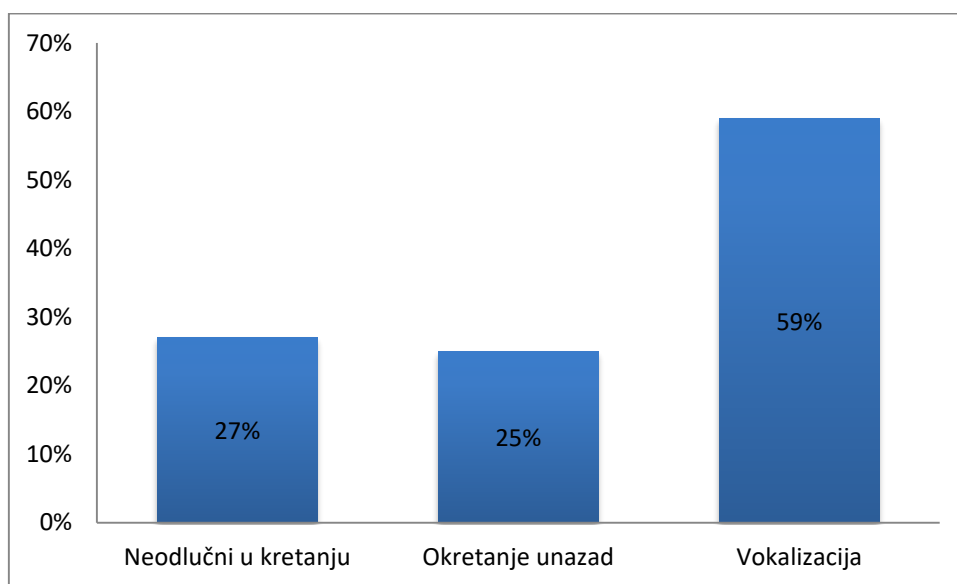
Slika 3. Rezultati druge skupine pokazatelja

Treća skupina pokazatelja prikazana je na slici 4, bez pokazatelja o mrtvim i bolesnim životinjama s obzirom na to da takvih životinja nije bilo.



Slika 4. Rezultati treće skupine pokazatelja

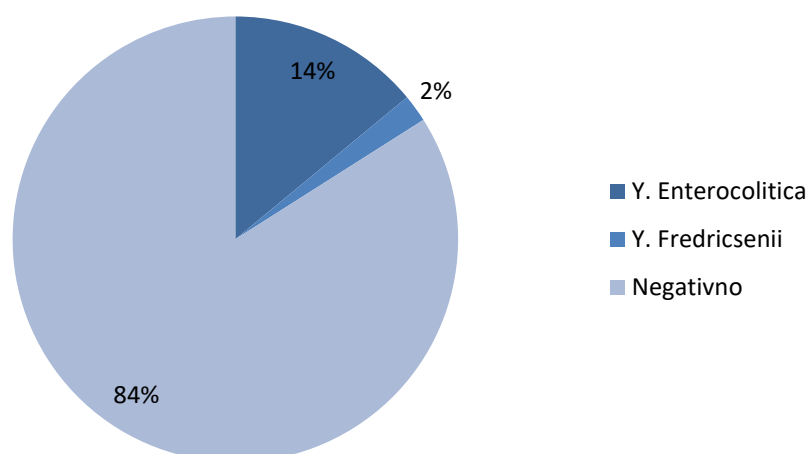
Rezultati posljednje skupine mjera, vezanih uz ponašanje životinja, prikazani su na slici 5, te prikazuju u kojem je postotku kod životinja primjećena određena mjera. Pojedinačno je prikazana svaka mjera (od 100 % za svaku mjeru), što podrazumijeva da su neke životinje mogle pokazivati sva tri praćena ponašanja, dok neke životinje nisu pokazivale ni jedno od tri promatrana ponašanja.



Slika 5. Postotak mjera ponašanja životinja.

Mikrobiološko pretraživanje

Pretraživanjem 100 uzoraka tonzila svinja postupcima selektivnog namnažanja prema HRN EN ISO 10273:2004 metodi dokazana je prisutnost vrste *Y. enterocolitica* u njih 14%; u 2% ustanovljena je po ljude apatogena vrsta *Y. frederiksenii* dok je 84% uzoraka bilo negativno (Slika 6). Enumeracijom je broj *Y. enterocolitica* određen u pet uzoraka u kojih su se ustanovljene vrijednosti kretale unutar raspona $1,4 \times 10^3$ cfu/g - $1,9 \times 10^4$ cfu/g. U preostalih devet uzoraka ustanovljena vrijednost je bila <10 cfu/g.



Slika 6. Rezultati mikrobiološke pretrage.

Statistička analiza.

Svi pokazatelji dobrobiti temeljeni na životinjama testirani su hi-kvadrat testom kako bi se utvrdilo postoji li statistička značajnost ($P < 0.05$) između svakog pojedinog pokazatelja i pojavnosti subkliničke infekcije s bakterijom *Yersinia enterocolitica*. Kod pokazatelja kod kojih je utvrđena značajnost ili je rezultat bio vrlo blizu statističkoj značajnosti uvrštene su u model logističke regresije – Fisherov exact test. Obradom i usporedbom tih izdvojenih pokazatelja dobrobiti životinja sa rezultatima mikrobiološke pretrage tonzila svinja, statistički je dokazana značajnost u povezivanju pojavnosti *Yersinia* spp. u tonzilama svinja sa tri pokazatelja iz dobrobiti životinja (Tablica 3).

Varijable koje su bile statistički povezane s infekcijom ($P < 0,05$; i one koje su bile blizu tih vrijednosti) uvrštene su u model logističke regresije – Fisherov exact test. Obradom i usporedbom tih izdvojenih pokazatelja dobrobiti životinja sa rezultatima mikrobiološke pretrage tonzila svinja, statistički je dokazana značajnost u povezivanju pojavnosti *Yersinia* spp. u tonzilama svinja sa tri pokazatelja iz dobrobiti životinja (Tablica 2).

Pokazatelj	OR	SE (OR)	p	95 % interval povjerenja
Uprljanost fecesom	0.24	0.15	0.027	0.07 - 0.85
Grupiranje	0.22	0.18	0.073	0.04 - 1.14
Okretanje unazad	4.06	2.63	0.030	1.14 - 14.45

Tablica 2. Statistički značajni (p) pokazatelji dobrobiti životinja povezani s mikrobiološkom pretragom tonzila svinja na *Yersinia enterocolitica* s prikazanim omjerom vjerojatnosti (OR) i standardnom pogreškom (SE) s 95%-im intervalom povjerenja nakon Fisher exact testa.

4. Rasprava

S obzirom na to da među klaonicama nema značajnih razlika u infrastrukturi i metodi omamljivanja (omamljivanje električnom strujom), sve navedene mjere praćene su u četiri različite klaonice, a rezultati za mjere i prisutnost *Y. enterocolitica* su objedinjeni. Sve su svinje u istraživanju bile dobre tjelesne građe, te se može zaključiti kako niti na farmi, ali ni u klaonici nije bilo duljeg zanemarivanja životinja vezanih uz hranidbu. Iako u 85% slučajeva svinjama nije bila ponuđena hrana, sve su svinje imale vodu *ad libitum* što je uobičajena praksa klaoničkih objekata kod životinja koje isti dan idu na klanje (što je i ovdje bio slučaj).

Bursitis se u procjeni dobrobiti koristi kao pokazatelj kvalitete smještaja životinja na farmi i prikupljeni rezultat (18%) govori u prilog relativno dobrim uvjetima smještaja, obzirom da se prema drugim istraživanjima postotak bursitisa kreće i do 44% (Dalmay i sur, 2011).

Određeni infrastrukturni nedostaci u klaonicama vidljivi su kroz nekoliko pokazatelja (klizanje i padanje životinja) koji su bili vrlo visoko ocijenjeni. Sukladno WQ protokolu prihvatljiv je postotak do maksimalno 18% klizanja (u našem slučaju postotak je bio gotovo dvostruko veći – 35%), dok je za padanje sukladno protokolu maksimalno prihvatljivo 4% (u našem istraživanju gotovo četiri puta više – 15%).

Projektno istraživanje provedeno je u ranu jesen kada su temperature zraka ugodne, te nije bilo nekih važnijih temperaturnih odstupanja, no rezultati vezani uz termalni komfor životinja (zadihanost, drhtanje i grupiranje) ponovno ukazuju na neke propuste u dizajnu prostora za odmor životinja prije klanja. Stoga, iako je zadihanost u prihvatljivim okvirima (2% od prihvatljivih 10% prema WQ), ostala dva pokazatelja su nekoliko puta veća od prihvatljivih (drhtanje 25% od maksimalno prihvatljivih 10%, te grupiranje 32% od maksimalno dozvoljenih 8% životinja).

Zaprljanost tijela još je jedan od pokazatelja lošijih uvjeta smještaja u klaonici, i dobiveni rezultati za značajnu zaprljanost (preko 50% tijela) u skladu su s Alpigiani (2012), no rezultati za umjereno prljave životinje u našem slučaju gotovo su tri puta veći od navedenog istraživanja (62% prema 23%).

Treća skupina pokazatelja procjenjuje zdravstveno stanje životinja prije i nakon dolaska u klaonicu. Većina pokazatelja (ozljede, šepavost, grizenje repova, kihanje, zadihanost, zaokrenuta njuška, prolapsi, hernije, probavne smetnje, pneumonia) nalazi se u prihvatljivim okvirima sukladno WQ protokolu i prate rezultate sličnih istraživanja (Alpigiani, 2012), osim blago povećanog postotka kašljanja i promjena na koži (crvenilo, otok).

Četvrta i posljednja skupina pokazatelja procjenjuje stres i strah kod životinja kao pokazatelje ponašanja te i ovdje rezultati govore u prilog povećanom stresu kod životinja. Vrlo visok broj vokalizacija (59) iako je u skladu s istraživanjem Alpigiani i sur. (2016), nije prihvatljiv sukladno WQ protokolu gdje je gornja granica 22 u prvom i 8 u drugom očitavanju, odnosno 30 ukupno. Rezultati životinja neodlučnih u kretanju (27%) odnosno okretanje životinje unazad (25%) također su neprihvatljivi prema preporukama WQ protokola (neodlučne dozvoljeno 10%, okretanje unazad maksimalno dozvoljeno 20%).

Rezultati mikrobiološkog dijela istraživanja

Dokaz prevalencije *Yersinia* spp. u tonzilama svinja s 14% pozitivnih na *Y. enterocolitica* i 2% na *Y. frederiksenii* sukladni su inozemnim istraživanjima, kod kojih se dokazana prevalencija u uzorcima tonzila kretala od 13.5% (Bhaduri i sur, 2005) do 60% (95% interval povjerenja) (Ibanez i sur., 2016). Rezultati prethodno provedenih istraživanja u Republici Hrvatskoj spominju prevalenciju *Y. enterocolitica*

u limfnim čvorovima od 10.25% (Zdolec i sur, 2015) u domaćih i 22.3% u tonzilama divljih svinja (Dumbovići sur, 2015). Zdolec i sur. (2015) također navode prevalenciju od 33.33% u tonzilama domaćih svinja, no nju objašnjavaju križnom kontaminacijom kod cijepanja trupova. Rezultati ostalih istraživanja o prevalenciji *Yersinia* spp. varirali od potpuno negativnih pa sve do 63% (Ortiz Martinez i sur, 2006; Gurthler i sur, 2005).

5. Zaključci

U ovom pilot istraživanju procijenjen je status dobrobiti životinja prilikom dolaska i boravka u klaonici sve do trenutka usmrćivanja, prema 27 pokazatelja iz WQ protokola, na temelju kojih je utvrđeno kako su uvjeti u klaonicama sukladno nekim procijenjenim parametrima bili niži od preporučenih.

Infrastrukturni nedostaci u klaoničkim objektima (krivo pozicionirana vrata, slijepi kutevi u koridoru kojim se kreću životinje i sl.) primorali su djelatnike procijenjenih objekata na gotovo «individualnu» manipulaciju sa svakom pojedinom životinjom što s jedne strane usporava proizvodnju, a s druge strane narušava dobrobit životinja. Osim navedenih infrastrukturnih nedostataka postojali su i nedostaci u ljudskim resursima, naime djelatnici koju su manipulirali sa životinjama u 50% objekata nisu prošli nikakvu edukaciju iz područja dobrobiti životinja.

Utvrđena je korelacija između određenih pokazatelja dobrobiti temeljenih na životinji i pojavnosti *Yersinia* spp. u tonzilama svinja. Sukladno iznesenim rezultatima može se zaključiti kako će svinje kojima je više od 50% tijela prekriveno fecesom, svinje koje se grupiraju kod odmora, a posebno svinje koje se nalaze u stresu imati statistički značajniju mogućnost subkliničke infekcije bakterijom *Yersinia* spp. Svakako je potrebno ponovno naglasiti kako je predstavljeno istraživanje provedeno samo u klaoničkim objektima te je stoga manjkavo u smislu procjenjivanja određenih mjera (nemogućnosti definiranja točnog vremena nastanka zaprljanosti tijela i sl.).

Na kraju treba naglasiti kako je broj svinja obuhvaćenih ovim istraživanjem bio relativno malen (n=100), te se preporučuje provesti dodatna i opsežnija istraživanja koja uključuju procjenu dobrobiti na farmama i tijekom transporta, te povećani broj istraženih životinja, uz praćenje i drugih mikroorganizama, kako bi se podaci izneseni u ovom projektu potkrijepili s više uzoraka, te potvrdili naši rezultati.

6. Preporuke

Kontaminacija trupova na liniji klanja predstavlja važan javno-zdravstveni i ekonomski problem u području prehrambene industrije (Rostagno, 2009) te stoga vizualni pregled životinja prije klanja i mesa *post mortem* predstavlja važan čimbenik u cjelokupnom sustavu kontrole proizvodnje svinjskog mesa (EFSA, 2011). S obzirom na to da asimptomatske životinje često prolaze neopaženo kroz *ante mortem* inspekcije preporuka je povećanje razine dobrobiti životinja (smanjenje stresa i poboljšanje uvjeta

držanja) na farmi i u klaonici kako bi se pokušalo smanjiti prevalenciju *Yersinia* spp. u tovnih svinja. S obzirom na utvrđene infrastrukturne nedostatke i nedostatan broj educiranog osoblja preporučuje se uklanjanje utvrđenih infrastrukturnih nedostataka, te edukacija djelatnika klaoničkih objekata iz područja dobrobiti životinja.

Povezivanje pokazatelja dobrobiti temeljenih na životinji sa sigurnosti hrane trebalo bi motivirati sve subjekte u proizvodnji hrane na izbjegavanje loših proizvođačkih praksi i dodatno povećati sigurnost mesa (Alpigiani i sur, 2016). kao U kontekstu integrirane strategije u lancu prehrane utvrđivanjem čimbenika koji utječu na zdravstveni status i dobrobit životinja tijekom njihovog života mogu se smanjiti učinci izloženosti patogenima, što može pomoći u smanjenju rizika za ljudsko zdravlje, (Milnes i svi., 2009; Alpigiani i svi., 2016).

LITERATURA (REFERENCE)

- Alpigiani I. 2012. Associations between animal-based welfare measures and the presence of *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* spp. as indicators of food safety in finishing pigs at slaughter plants in Northern Italy. Doktorska disertacija. Sveučilište u Parmi. Parma, Italija.
- Alpigiani I, Bacci C, Keeling L J, Salman M D, Brindani F, Pongolini S, Hitchens P L, Bonardi S. 2016. The associations between animal-based welfare measures and the presence of indicators of food safety in finishing pigs. *Animal welfare* 25, 355-363.
- Bansal, N., Sinha, I. and Viridi, J.S. 2000. Virulence plasmid (pYV)-associated susceptibility of *Yersinia enterocolitica* to chlorine and heavy metals. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 663–667.
- Bari L., Anwar Hossain M. Isshiki K., Ukuku D., 2011. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods *J Pathog.* 2011: 420732.
- Bhaduri S, Wesley I V, Bush E J. 2005. Prevalence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Strains in Pigs in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7117–7121.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). 2012. Hackepeter und rohes Mett sind nichts für kleine Kinder. Pressemitteilung 11/2012, 12.03.2012.
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). 2013. *Yersinia* in food: recommendations for protection against infections, BfR Opinion No. 002/2013
- Bonardi S, Paris A, Bassi L, Salmi F, Bacci C, Riboldi E, Boni E, D'Incau M, Tagliabue S, Brindani F. 2010. Detection, semiquantitative enumeration, and antimicrobial susceptibility of *Yersinia enterocolitica* in pork and chicken meats in Italy. *J Food Prot* 73, 1785-1792.
- Bottone, E J. 1999. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect* 1, 323-333.
- Buller N. 2014. Bacteria and Fungi from Fish and Other Aquatic Animals
- Cornelis G, Laroche Y, Balligand G. 1987. *Yersinia enterocolitica*, a primary model for bacterial invasiveness. *Rev. Infect. Dis.* 9:64-87

- Dalmau A. 2011. Animal Welfare Assessment (growing pigs, sows and piglets). Dostupno na https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/aw_arch_pres_122011_dalmau_pig_en.pdf. Pristupljeno 22.08.2017.
- Drummond N, Murphy BP, Ringwood T. 2012. *Yersinia enterocolitica*: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain. *Foodborne Pathog. Dis.* 9:179-189.
- Dumbović Z, Dobranić V, Zdolec N. 2015. Presence of *Yersinia enterocolitica* in wild boars tonsils. *Proceedings of lectures and posters Hygiene alimnetorum XXXVI. Strbske Pleso, Slovačka*, 13.-15.05.2015.
- EFSA, 2007a. Scientific Opinion of the Panel on BIOHAZ on a request from EFSA on monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. *The EFSA Journal* 595:1-30.
- EFSA, 2007b. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards and Animal Health Animal Welfare on a request from the European Food Safety Authority (self mandate) to issue a Scientific Opinion on the Review of the Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2005, *The EFSA Journal* 600:1-32.
- EFSA, 2009b. Technical specifications for harmonised national surveys on *Yersinia enterocolitica* in slaughter pigs on request of EFSA. *The EFSA Journal* 7:1374.
- EFSA, 2011. Meat inspection of swine *EFSA Journal*; 9(10):2351-56.
- EFSA, 2012. Statement on the use of animal-based measures to assess the welfare of animals - *EFSA Journal* 2012;10(6):2767
- EFSA i ECDC 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 2016;14(12):4634, 244 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
- European Parliament and Council Directive 2003/99/ EC on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:325:0031:0040:EN:PDF>
- Esnault E, Labbé A, Houdayer C, Denis M. 2014. *Yersinia enterocolitica* prevalence, on fresh pork, poultry and beef meat at retail level, in France. *Journées Recherche Porcine*, 46, 57-58.
- Fearnley C, On SL, Kokotovic B, Manning G, Cheasty T, Newell DG. 2005. Application of fluorescent amplified fragment length polymorphism for comparison of human and animal isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Appl Environ Microbiol* 71(9):4960-5.
- Fleming D, Hunt D. (Ed.). 2006. *Biological Safety Principles and Practices* (4th ed.). Washington: ASM Press. Citirano na Public Health Agency of Canada: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/yersinia-enterocolitica-eng.php#footnote7>
- Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H. 2006. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 47:315-29.
- Grandin T. 2011. – Animal welfare audits for cattle, pigs, and chickens that use the HACCP principles of critical control points. Website: www.grandin.com/welfare.audit.using.haccp.html

- Gousia P, Economou V, Sakkas H, Leveidiotou S, Papadopoulou C. 2011. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. Foodborne Pathog Dis 8, 27-38.
- Gürtler M, Alter T, Kasimir S, Linnebur M, Fehlhaber K. 2005. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in fattening pigs. J Food Prot. 68(4):850-4.
- HAH (Hrvatska Agencija za hranu) 2009. Biološke opasnosti u hrani. Marinculić A., Habrun B., Barbić Lj., Beck R.
- Heesemann J, 1998. Die Gattung *Yersinia*, *Yersiniosen*. In: Brandis, Eggers, Köhler (Herausgeber) Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie, Urban & Fischer Verlag, München 315-329.
- Huovinen E, Sihvonen LM, Virtanen MJ, Haukka K, Siitonen A, Kuusi M. 2010. Symptoms and sources of *Yersinia enterocolitica*-infection: a case-control study. BMC Infect Dis 10:122.
- Ibanez T. R., Laukkanen-ninios R., Hakkinen M., Johansson T., Vilar M., and Korkeala H. 2016. Prevalence of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Finnish Slaughter Pigs. Journal of Food Protection, Vol. 79, No. 4, 2016, Pages 677–681
- Kapperud G. 1981. Survey on the reservoirs of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria in Scandinavia. Acta Pathol Microbiol Scand B. 89(1):29-35.
- Kuehni-Boghenbor K, On SL, Kokotovic B, Baumgartner A, Wassenaar TM, Wittwer M, Bissig-Choisat B, Frey J. 2006. Genotyping of human and porcine *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia intermedia*, and *Yersinia bercovieri* strains from Switzerland by amplified fragment length polymorphism analysis. Appl Environ Microbiol 72(6):4061-6.
- Laukkanen-Ninios, R., Fredriksson-Ahomaa, M. and Korkeala, H. 2014. Enteropathogenic *Yersinia* in the Pork Production Chain: Challenges for Control. COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY, 13: 1165–1191.
- Long C, Jones T F, Vugia D J. 2010. *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* infections, FoodNet, 1996-2007. Emerg. Infect. Dis. 16 :566-567.
- Nollet N, Maes D, De Zutter L, Duchateau L, Houf K, Huysmans K, Imberechts H, Geers R, de Kruif A, Van Hoof J. 2004. Risk factors for the herd-level bacteriologic prevalence of *Salmonella* in Belgian slaughter pigs, Preventive Veterinary Medicine 65 (2004) 63–75.
- Ortiz Martinez P, Mylona S, Drake I, Fredriksson-Ahomaa M. 2006. Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils in the United Kingdom. Veterinarmedicinas raksti (Latvia), 2006.
- Regulation EC No 852/2004 of the European Parliament and of the Council on the hygiene of foodstuffs, website: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:EN:PDF>,
- Regulation EC No 853/2004 of the European Parliament and of the Council laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:EN:PDF>,
- RKI (Robert Koch-Institut), 2012a. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011, Robert Koch-Institut, Berlin.

- RKI (Robert Koch-Institut), 2012b. Yersiniose – Risikofaktoren in Deutschland. Epidemiol. Bulletin. Berlin, Nr. 6,
- Rostagno M H. 2009. Can Stress in Farm Animals Increase Food Safety Risk? Foodborne Pathogens and Disease Volume 6, Number 7, 767-776.
- Sabina Y., Rahman A., Chandra Ray R., Montet D., 2011. *Yersinia enterocolitica*: Mode of Transmission, Molecular Insights of Virulence, and Pathogenesis of Infection. J Pathog. 2011: 429069.
- Shayegani M, Stone WB, DeForge I, Root T, Parsons LM, Maupin P. 1986. *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from wildlife in New York State. Appl Environ Microbiol. 52(3):420-4.
- Starley, S.C., Skrzypek, E., Plano, G.V., Bliska, J.B. 1993. Yops of *Yersinia* spp. pathogenic for humans. Infection and Immunity 61, 3105-3110.
- Tauxe RV, Vandepitte J, Wauters G. 1987. *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. Lancet 1:1129-1132.
- Temple D, Dalmau A, Ruiz de la Torrea J L, Manteca J, Velarde A. 2011. Application of the Welfare Quality® protocol to assess growing pigs kept under intensive conditions in Spain, Journal of Veterinary Behavior 6, 138-149.
- Temple D, Courboulay V, Manteca X, Velarde A and Dalmau A. 2012. The welfare of growing pigs in five different production systems: assessment of feeding and housing Animal, 6:4, 656-667.
- Tennant SM, Grant TH, Robins-Browne RM, 2003. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 38:127-37.
- Virtanen S, Salonen L, Laukkanen-Ninios R. 2012. Piglets are a source of pathogenic *Yersinia enterocolitica* on fattening-pig farms. Appl. Environ. Microbiol. 78:3000-3003.
- Virtanen S, Laukkanen-Ninios R, Ortiz Martinez P, Siitonen A, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H. 2013. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis in genotyping *Yersinia enterocolitica* strains from human and porcine origins. J Clin Microbiol 51(7):2154–9.
- Wang X, Cui Z, Jin D, Tang L, Xia S, Wang H, Xiao Y, Qiu H, Hao Q, Kan B, Xu J, Jing H. 2009. Distribution of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28(10):1237–44.
- Welfare Quality® (2009). Welfare Quality® assessment protocol for pigs (sows and piglets, growing and finishing pigs). Welfare Quality® Consortium, Lelystad, Netherlands.
- Wojciech L, Staroniewicz Z, Jakubczak A, Ugorski M. 2004. Typing of *Yersinia enterocolitica* isolates by ITS profiling, REP- and ERIC-PCR. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 51(5):238–44.
- Zdolec N, Dobranić V, Filipović I. 2015. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in/on tonsils and mandibular lymph nodes of slaughtered pigs. Folia Microbiologica. 60:2, 131–135.

