

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mateja AMBROŽIČ

**VPLIV INHIBITORJEV IZLIVNIH ČRPALK NA
AKTIVNOST MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKOV PROTI
BAKTERIJAM *Campylobacter* IZ HRANE, VODE IN
KLINIČNIH VZORCEV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF EFFLUX PUMP INHIBITORS ON
ACTIVITY OF MACROLIDE ANTIBIOTICS AGAINST
Campylobacter FROM FOOD, WATER AND CLINICAL
SAMPLES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratorijih Katedre za živilsko mikrobiologijo in Katedre za biotehnologijo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mateja Ambrožič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 579.24+579.26: 577.18: 615.33(043)=163.6
KG patogeni mikroorganizmi/*Campylobacter*/bakterijska odpornost/odpornost na antibiotike/eritromicin/azitromicin/klaritromicin/diritromicin/tilozin/inhibitorji membranskih izlivnih črpalk/PAβN/NMP/
AV AMBROŽIČ, Mateja
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ABRAM, Veronika (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2008
IN VPLIV INHIBITORJEV IZLIVNIH ČRPALK NA AKTIVNOST MAKROLIDNIH ANTIBIOTIKOV PROTI BAKTERIJAM *Campylobacter* IZ HRANE, VODE IN KLINIČNIH VZORCEV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 70 str., 19 pregl., 33 sl., 69 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Z mikrodilucijsko metodo smo ugotavljali minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) makrolidnih antibiotikov in vpliv inhibitorjev izlivnih črpalk na aktivnost eritromicina, azitromicina, klaritromicina, diritromicina in tilozina proti 20 izolatom bakterij rodu *Campylobacter* iz hrane, vode in humanih kliničnih vzorcev. Izmerjene vrednosti MIC so se gibale med 0,063 µg/ml in 512 µg/ml. S primerjavo vrednosti MIC eritromicina in ostalih makrolidnih antibiotikov smo potrdili navzkrižno odpornost pri 94 % testiranih izolatih. Med njimi je bilo 47 % takih, ki so razvili navzkrižno odpornost na vse testirane makrolidne antibiotike. Močno navzkrižno odpornost smo potrdili predvsem pri izolatih perutninskega izvora. Drugi cilj eksperimentalnega dela je bil ugotoviti, v kolikšni meri inhibitorji izlivnih črpalk prispevajo k večji občutljivosti bakterij na omenjene antibiotike. Kot inhibitorja smo preizkusili fenilalanilarginin-β-naftilamid (PAβN) in 1-(1-naftilmetil)-piperazin (NMP). Kot gojišče smo uporabili tekoče gojišče Mueller-Hinton bujon (MHB) in trdno gojišče ogljeni cefoperazon deoksiholat agar (CCDA). Metabolično aktivnost bakterijskih celic, ki je temeljila na redukciji resazurina v resorufin, smo spremljali z dodatkom reagenta CellTiter-Blue® in merjenjem fluorescentnega signala s čitalcem mikrotiterskih plošč. Ugotovili smo pomemben učinek dodatka inhibitorjev na občutljivost sevov za makrolidne antibiotike in s tem tudi dejstvo, da imajo membranske izlivne črpalke pomembno vlogo pri povečani odpornosti na makrolidne antibiotike oz. so vpletene v navzkrižno odpornost. Učinek je bil odvisen od vrste antibiotika in testiranega seva oz. njegove odpornosti- potrdili smo vpletenost izlivnih črpalk v odpornost predvsem pri sevih z visoko vrednostjo MIC (MIC ≥ 16 µg/ml). Inhibitorja PAβN in NMP sta različno zmanjševala občutljivost izolatov na antibiotike.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 579.24+579.26: 577.18: 615.33(043)=163.6
CX pathogens/*Campylobacter*/bacterial resistance/resistance on antibiotics/erythromycin/azithromycin/clarithromycin/dirithromycin/tylosin/inhibitors of efflux pumps/PAβN/NMP/
AU AMBROŽIČ, Mateja
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Tehnology
PY 2008
TI INFLUENCE OF EFFLUX PUMP INHIBITORS ON ACTIVITY OF MACROLIDE ANTIBIOTICS AGAINST *Campylobacter* FROM FOOD, WATER AND CLINICAL SAMPLES
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 70 p., 19 tab., 33 fig., 69 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In this research work we were determining minimum inhibitory concentration (MIC) of macrolide antibiotics and influence of efflux pumps inhibitors on activity of erythromycin, azithromycin, clarithromycin, dirithromycin and tylosin against 20 food, water and human clinical *Campylobacter* isolates by using broth microdilution method. Determined values MIC were between 0,063 µg/ml in 512 µg/ml. With comparison of MIC erythromycin and others macrolide antibiotics, we confirmed cross resistance at 94 % of tested isolates. Among them, there was 47 % of such, that developed cross resistance on all tested macrolide antibiotics. It is possible to trace extraordinarily strong cross resistance of samples with chicken origin. The second goal of the experimental work, was to find out, in how much efflux pump inhibitors contribute to higher sensitivity of bacteria on mentioned antibiotics. As efflux pump inhibitors we tested fenilalanilarginin β-naftilamid (PAβN) and 1-(1-naftilmetil)- piperazin (NMP). All tested cultures were cultivated in MHB liquid medium and on charcoal cefoperazone desoxycholate agar (CCDA) plates. The metabolic activity of bacterial cells was observed by using CellTiter-Blue[®] reagent based on the reduction of resazurin to resorufin, which was detected with a fluorescence detector. We discovered important effect on supplement efflux pump inhibitors on sensitivity of strains for macrolide antibiotics and with that a fact, that efflux pumps have important role at increased resistance on tested antibiotics and their involvement in cross resistance. Effect was dependend on type of antibiotic, tested strain and his resistance – we confirmed involvement of efflux pumps to resistance, especially at resistant strain with high MIC (MIC ≥ 16 µg/ml). Inhibitor PAβN and NMP were differently reducing sensitivity of strains on tested antibiotics.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE DIPLOMSKE NALOGE	2
1.1.1 Cilji diplomske naloge.....	2
1.1.2 Delovne hipoteze	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU <i>CAMPYLOBACTER</i>.....	3
2.1.1 Značilnosti bakterij rodu <i>Campylobacter</i>	3
2.1.2 Epidemiologija, patogeneza in zdravljenje bolezni	3
2.1.3 Incidenca in prevalenca kampilobakterjev	5
2.1.4 Incidenca odpornih sevov	5
2.2 ZDRAVLJENJE BOLEZNI Z UPORABO ANTIBIOTIKOV	5
2.2.1 Makrolidi	6
2.2.1.1 Eritromicin	6
2.2.1.2 Azitromicin	7
2.2.1.3 Klaritromicin.....	8
2.2.1.4 Diritromicin.....	9
2.2.1.5 Tilozin	9
2.3 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI NA ANTIBIOTIKE.....	10
2.3.1 Mehanizmi odpornosti bakterije <i>Campylobacter</i> spp.	11
2.3.1.1 Povečana odpornost zaradi mutacij ali metiliranja.....	12
2.3.1.2 Povečana odpornost zaradi prisotnosti membranskih izlivnih črpalk	12
2.3.1.3 Membranske izlivne črpalke pri kampilobakterjih	14
2.3.2 Inhibicija izlivnih črpalk.....	15
2.4 METODE UGOTAVLJANJA ODPORNOSTI BAKTERIJ RODU <i>CAMPYLOBACTER</i> NA ANTIBIOTIKE.....	17
2.4.1 Metoda difuzije v agarju.....	18
2.4.2 Dilucijske metode	19
2.4.2.1 Dilucijska metoda v agarju.....	19
2.4.2.2 Mikrodilucijska metoda v bujonu.....	19
2.4.3 Metode z uporabo plošč z gradientom.....	20
2.4.4 Metode z uporabo spiralne cepitve plošč.....	21
2.4.5 Inhibicijske krivulje.....	21
2.4.6 Izobologram.....	21

3 METODE IN MATERIAL	22
3.1 POTEK DELA	22
3.2 MATERIAL	23
3.2.1 Mikroorganizmi	23
3.2.1.1 Mikrobiološka gojišča	23
3.2.1.1.1 Agar CCDA	23
3.2.1.1.2 Tekoče gojišče Mueller Hinton bujon - MHB	24
3.2.2 Priprava raztopin antibiotikov	24
3.2.2.1 Eritromicin (SIGMA-ALDRICH CO.)	24
3.2.2.2 Klaritromicin (FLUKA BIOCHEMIKA), Azitromicin (SIGMA-ALDRICH CO.), Diritromicin (SIGMA-ALDRICH CO.), Tilozin (USP standard)	24
3.2.3 Priprava inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk	25
3.2.3.1 Inhibitor PAβN (SIGMA-ALDRICH CO.)	25
3.2.3.2 Inhibitor NMP (Chess, Mannheim, Nemčija)	25
3.2.4 Priprava reagentov, raztopin in ostalih dodatkov	25
3.2.4.1 Fiziološka raztopina	25
3.2.4.2 Barvilo resazurin CellTiter-Blue® (Promega Corporation)	25
3.2.5 Laboratorijska oprema	26
3.3 METODE DELA	26
3.3.1 Revitalizacija kultur	26
3.3.2 Priprava inokuluma	27
3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu	27
3.3.4 Mikrodilucijska metoda v bujonu	28
3.3.4.1 Priprava koncentracij antibiotikov	28
3.3.4.2 Priprava kulture	28
3.3.4.3 Princip in izvedba metode	29
3.3.4.4 Določitev živosti bakterijskih celic	31
4 REZULTATI	34
4.1 ODPORNOST BAKTERIJ <i>CAMPYLOBACTER</i> NA MAKROLIDNE ANTIBIOTIKE	35
4.2 ODPORNOST BAKTERIJ <i>CAMPYLOBACTER</i> NA MAKROLIDNE ANTIBIOTIKE BREZ IN Z DODATKOM INHIBITORJEV	37
4.2.1 Eritromicin	37
4.2.2 Azitromicin	39
4.2.3 Klaritromicin	42
4.2.4 Diritromicin	45
4.2.5 Tilozin	48
4.3 RELATIVNA UČINKOVITOST INHIBITORJEV PAβN IN NMP NA ZMANJŠANJE ODPORNOSTI PROTI MAKROLIDNIM ANTIBIOTIKOM	51
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	53
5.1 RAZPRAVA	53
5.1.1 Razlogi in posledice prisotnosti odpornih izolatov kampilobakterjev pri ljudeh in živalih	53
5.1.2 Relativni učinek inhibitorjev na občutljivost sevov za makrolidne antibiotike	55
5.1.2.1 Eritromicin	56
5.1.2.2 Azitromicin	57
5.1.2.3 Klaritromicin	58
5.1.2.4 Diritromicin	59
5.1.2.5 Tilozin	60
5.1.3 Mehanizmi, vpleteni v navzkrižno odpornost sevov <i>Campylobacter</i>	60
5.2 SKLEPI	61

6 POVZETEK	62
VIRI	63
ZAHVALA	70

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava osnovnega medija za agar CCDA	23
Preglednica 2: Sestava dodatka za selektivnost CCDA Selective Supplement	23
Preglednica 3: Sestava osnovnega medija za MHB	24
Preglednica 4: Oznaka luknjic v mikrotitrski ploščici in njihova vsebina	30
Preglednica 5: Prikaz mikrotitrške plošče po končanem dodajanju reagentov in kulture	31
Preglednica 6: Zbirna preglednica odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i> na eritromicin, azitromicin in klaritromicin	35
Preglednica 7: Zbirna preglednica odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i> na diritromicin in tilozin	36
Preglednica 8: Zbirna preglednica odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i> na eritromicin v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PABN in NMP	39
Preglednica 9: Zbirna preglednica odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i> na azitromicin v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PABN in NMP	41
Preglednica 10: Zbirna preglednica odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i> na klaritromicin v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PABN in NMP	44
Preglednica 11: Zbirna preglednica odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i> na diritromicin v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PABN in NMP	47
Preglednica 12: Zbirna preglednica odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i> na tilozin v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PABN in NMP	50
Preglednica 13: Tip seva glede na odpornost na določen antibiotik in prikaz relativne učinkovitosti (U) inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk na zmanjšano odpornostna eritromicin, azitromicin in klaritromicin	51
Preglednica 14: Tip seva glede na odpornost na določen antibiotik in prikaz relativne učinkovitosti (U) inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk na zmanjšano odpornost na diritromicin in tilozin	52
Preglednica 15: Relativni učinek inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov na eritromicin	56

- Preglednica 16: Relativni učinek inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov na azitromicin 57
- Preglednica 17: Relativni učinek inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov na klaritromicin 58
- Preglednica 18: Relativni učinek inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov na diritromicin 59
- Preglednica 19: Relativni učinek inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov na tilozin 60*

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska struktura eritromicina (Kirst in Sides, 1989)	7
Slika 2: Kemijska struktura atitromicina (Kirst in Sides, 1989)	8
Slika 3: Kemijska struktura klaritromicina (Kirst in Sides, 1989)	8
Slika 4: Kemijska struktura diritromicina (Kirst in Sides, 1989)	9
Slika 5: Kemijska struktura tilozina (Khan in sod., 2007)	10
Slika 6: Prikaz najpogostejših mehanizmov odpornosti: aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice, encimsko razgradnjo antibiotika in spremembo tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotika (Yim, 2007)	11
Slika 7: Model tridelne membranske izlivne črpalke, kjer modra barva označuje protein na zunanji membrani (CmeC), rdeča notranje-membranski transportni protein (CmeB), modra pa periplazemski fuzijski protein (CmeA) (MpexPharmaceuticals, 2008)	15
Slika 8: Kemijska strukturalna formula inhibitorja membranskih izlivnih črpalk PABN (Sigma- Aldrich, 2008a)	17
Slika 9: Kemijska strukturalna formula inhibitorja membranskih izlivnih črpalk PABN (Sigma- Aldrich, 2008b)	17
Slika 10: Mikrotitrna ploščica	20
Slika 11: Shema poskusa diplomskega dela	22
Slika 12: Rast kolonij bakterij <i>Campylobacter</i> na selektivnem gojišču CCDA	27
Slika 13: Redukcija resazurina (Riss in Moravec, 2003)	32
Slika 14: Dodajanje barvila CellTiter-Blue® v luknjice na mikrotitrski plošči	32
Slika 15: Prikaz mikrotitrne plošče po končani analizi. Rdečkasto-roza obarvane luknjice kažejo, da so v njih žive mikrobne celice, saj so bile sposobne reducirati resazurin v resorufin. Nežive mikrobne celice so v luknjicah, ki so temnejše. V teh luknjicah barvilo ostane modre barve. MIC predstavlja zadnjo luknjico v koloni, ki ni spremenila barve. Dodane reagentne koncentracije antibiotikov prikazujeta preglednici 4 in 5.	33
Slika 16: Grafično določanje vrednosti MIC za eritromicin pri izolatu <i>C. jejuni</i> 413/06	37

Slika 17: Grafično določanje vrednosti MIC za eritromicin pri izolatu <i>C. coli</i> M 37	37
Slika 18: Grafično določanje vrednosti MIC za azitromicin pri izolatu <i>C. jejuni</i> 413/06	39
Slika 19: Grafično določanje vrednosti MIC za azitromicin pri izolatu <i>C. coli</i> 809	39
Slika 20: Grafično določanje vrednosti MIC za azitromicin pri izolatu <i>C. coli</i> VC 11076	40
Slika 21: Grafično določanje vrednosti MIC za azitromicin pri izolatu <i>C. coli</i> 2235	40
Slika 22: Grafično določanje vrednosti MIC za klaritromicin pri izolatu <i>C. coli</i> 140	42
Slika 23: Grafično določanje vrednosti MIC za klaritromicin pri izolatu <i>C. coli</i> 171	42
Slika 24: Grafično določanje vrednosti MIC za klaritromicin pri izolatu <i>C. coli</i> 2235	43
Slika 25: Grafično določanje vrednosti MIC za klaritromicin pri izolatu <i>C. coli</i> 803	43
Slika 26: Grafično določanje vrednosti MIC za diritromicin pri izolatu <i>C. coli</i> 809	45
Slika 27: Grafično določanje vrednosti MIC za diritromicin pri izolatu <i>C. coli</i> 137	45
Slika 28: Grafično določanje vrednosti MIC za diritromicin pri izolatu <i>C. coli</i> 803	46
Slika 29: Grafično določanje vrednosti MIC za diritromicin pri izolatu <i>C. coli</i> M 37	46
Slika 30: Grafično določanje vrednosti MIC za tilozin pri izolatu <i>C. coli</i> VC 11076	48
Slika 31: Grafično določanje vrednosti MIC za tilozin pri izolatu <i>C. coli</i> FC 8	48
Slika 32: Grafično določanje vrednosti MIC za tilozin pri izolatu <i>C. coli</i> 171	49
Slika 33: Grafično določanje vrednosti MIC za tilozin pri izolatu <i>C. coli</i> VC 110722	49

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

23S rRNA	podenota 23S ribosomske RNA
A	adenin
ABC	(angl. ATP binding cassette)
ATP	adenozintrifosfat
bp	bazni par
CCDA	(angl. charcoal cefoperazone desoxycholate agar), ogljeni cefoperazon deoksiholat agar
CLSI	(angl. Clinical and Laboratory Standards Institute), Inštitut za klinične standarde
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EFSA	(angl. European Food safety Authority), Evropska agencija za varnost hrane
EPI	(angl. efflux pump inhibitor), inhibitorji membranskih izlivnih črpalk
G	gvanin
HACCP	(angl. hazard analysis critical control point) analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih točk
HLR	(angl. high level resistance), visoko odporni sevi, $MIC_{ERI} \geq 32 \mu\text{g/ml}$
kbp	kilobazni par
LLR	(angl. low level resistant), nizko odporni sevi, $4 \mu\text{g/ml} \leq MIC_{ERI} \leq 16 \mu\text{g/ml}$
MATE	(angl. multidrug and toxic compound extrusion)
MDR	(angl. multi drug resistance), večkratna odpornost proti antibiotikom
MHB	Mueller-Hinton bujon
MFS	(angl. major facilitator superfamily)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
mRNA	sporočilna RNA
NMP	1-(1-naftilmetil)-piperazin
PAβN	fenilalanilarginin-β-naftilamid
R	(angl. resistant), odporen
RNA	ribonukleinska kislina
rRNA	ribosomska RNA
RND	(angl. resistance nodulation cell division)
RFU	(angl. relative fluorescence units)
S	(angl. sensitive), občutljiv $MIC_{ERI} < 4 \mu\text{g/ml}$
SMR	(angl. small multidrug resistance)
T	timin
tRNA	prenašalna RNA
U	učinkovitost inhibitorja PAβN
V	volumen
μg	mikrogram (10^{-6} g)

1 UVOD

Bakterije iz rodu *Campylobacter* so patogene bakterije, ki so v svetu poznane kot ene izmed glavnih povzročiteljic črevesnih okužb. V naravi so zelo razširjene in živijo kot komenzali ali kot povzročitelji bolezni v prebavilih, sečilih in rodilih številnih domačih ter divjih živali. Bolezni, ki jih povzročajo, imenujemo kampilobakterioze. To so zoonoze, ki so razširjene po vsem svetu. V Sloveniji je *Campylobacter* na drugem mestu med bakterijskimi povzročitelji diareje pri ljudeh (Andlovic, 2002).

Rezervoar kampilobakterjev je črevesje perutnine, goveda in prašičev. Najbolj pogost vzrok okužbe s kampilobakterji pri ljudeh je prenos povzročitelja iz gastrointestinalnega trakta živali med prirejo živali ali klanjem s uporabo kontaminirane opreme ali vode na živila in preko zaužitja le-teh na človeka (van Vliet in Ketley, 2001). Ocene kažejo, da je več kot 80 % okužb ljudi povzročenih z uživanjem kontaminiranih ali premalo temperaturno obdelanih živil, še posebej perutnine (EFSA, 2007a).

Okužbe prebavil s to bakterijo potekajo kot vodena, v hujši obliki kot krvava diareja. Bolnik ima značilne bolečine v trebuhu, se slabo počuti in ima vročino. Bolezen poteka kot kratkotrajna diareja, saj le v hujših primerih traja dlje od enega tedna dni (Andlovic, 2002). Glavna povzročitelja okužb sta *C. jejuni*, kateri predstavlja 80 % do 85 % vseh okužb in *C. coli*, ki pa predstavlja 10 % do 15 % vseh okužb (Moore in sod, 2005).

V modernem načinu proizvodnje živil in živilskih izdelkov so bakterije izpostavljene številnim fizikalno-kemijskim stresom. Njihova preživelost je odvisna od sposobnosti zaznavanja in prilagajanja z mehanizmi, ki povečajo bakterijsko odpornost. Odpornost bakterijskih izolatov iz živil na antibiotike je zelo nezaželena, saj lahko predstavlja vzrok neučinkovitosti zdravljenja okužb s patogenimi mikroorganizmi. Povečana bakterijska odpornost lahko predstavlja tudi tveganje prenosa odpornosti na druge bakterije (črevesje). Znanih je čedalje več podatkov o naraščajoči odpornosti bakterij *Campylobacter* proti različnim protimikrobno aktivnim snovem. Ta naraščajoča odpornost bakterij je posledica vse večje porabe antibiotikov v humani in veterinarski medicini.

Zaradi različnih dejavnikov so bakterijske vrste, med njimi tudi kampilobakterji, razvile različne mehanizme, ki povečajo njihovo odpornost v boju s protimikrobnimi snovmi. Naše zanimanje so pritegnile novejšje študije, ki poročajo, da pri *C. jejuni* in *C. coli* izlivne črpalke igrajo aktivno vlogo pri razvoju intrinzične in tudi pridobljene odpornosti proti makrolidom. Kot protimikrobna sredstva smo uporabili pet različnih makrolidnih antibiotikov (eritromicin, azitromicin, klaritromicin, diritromicin in tilozin), ki se uporabljajo pri zdravljenju kampilobakterioz v humani in v veterinarski medicini. V eksperimentalni del smo vključili 20 izolatov bakterij *C. jejuni* in *C. coli* iz živil, vode ali humanih kliničnih vzorcev, ki so se v predhodnih raziskavah izkazali kot zanimivi, saj so vsi izolati imeli povečano odpornost proti eritromicinu. Za določitev vrednosti MIC smo uporabili mikrodilucijsko metodo v bujonu v kombinaciji z reagentom CellTiter-Blue[®]. Za odčitavanje fluorescentnega signala smo uporabili avtomatizirani čitalec mikrotiterskih plošč.

1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE DIPLOMSKE NALOGE

1.1.1 Cilji diplomske naloge

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo si zadali naslednje cilje:

- Z mikrodilucijsko metodo izbranim sevom kampilobakterjev določiti vrednosti MIC za antibiotike eritromicin, azitromicin, klaritromicin, diritromicin in tilozin in s tem pridobiti podatke o navzkrižni odpornosti na makrolidne antibiotike pri izbranih sevih *Campylobacter jejuni* in *C. coli*;
- Istim izbranim sevom določiti vrednosti MIC ob prisotnosti subinhibitorne koncentracije inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk PAβN in NMP;
- Z analizo dobljenih rezultatov sklepati na mehanizme, vpletene v navzkrižno odpornost sevov *Campylobacter*.

1.1.2 Delovne hipoteze

Predpostavili smo:

- Pri izolatih *Campylobacter coli* in *C. jejuni* se pogosto pojavlja navzkrižna odpornost proti makrolidnim antibiotikom;
- Dodatek inhibitorja membranskih izlivnih črpalk PAβN in NMP vpliva na občutljivost bakterij *Campylobacter coli* in *C. jejuni* proti izbranim makrolidnim antibiotikom, vendar je ta učinek predvidoma različen pri različnih makrolidnih antibiotikih.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU *Campylobacter*

2.1.1 Značilnosti bakterij rodu *Campylobacter*

Rod *Campylobacter* (družina Campylobacteraceae) so drobne, nesporogene, Gram negativne, zoonotske bakterije. Po obliki so značilno spiralno-vijačne oblike, kar jim poleg enopolarnih in bipolarnih bičkov omogoča dobro gibljivost (Snelling in sod., 2005). Bakterije so dolge od 1,5 do 6 μm in široke od 0,2 do 0,5 μm (van Vliet in Ketley, 2001). Na gojiščih tvorijo sive, ploščate, okrogle, izbočene kolonije nepravilnih oblik (Snelling in sod., 2005).

Pomen kampilobakterjev pri boleznih prebavil so zaradi njihovih posebnih rastnih zahtev spoznali pozno. To se je zgodilo šele leta 1972, ko sta Dekyser in Butzler izolirala kampilobakterje iz krvi in fecesa (Skirrow in sod., 2000). Kampilobakterji so mikroaerofilne bakterije, ki za rast in razvoj potrebujejo 3 % do 15 % kisika in 3 % do 5 % ogljikovega dioksida. Sevi *C. jejuni*, *C. coli* in *C. lari* so poleg tega še termofilni, saj bolje rastejo med 37 °C in 44 °C, kar je posledica prilagoditve teh organizmov na njihov življenjski prostor. Kampilobakterji živijo kot komezali ali povzročitelji bolezni v prebavilih, sečilih in rodilih številnih domačih in divjih živalih, kakor tudi pri človeku. Rezervoar kampilobakterjev je črevesje perutnine, goveda in prašičev. Za rast in razvoj potrebujejo kompleksno hranilno podlago in niso sposobni fermentirati ogljikovih hidratov (van Vliet in Ketley, 2001).

2.1.2 Epidemiologija, patogeneza in zdravljenje bolezni

Zoonoze so bolezni ali okužbe, ki se prenašajo iz živali na človeka. Zoonoze se prenašajo z direktnim prenosom iz živali na človeka ali pa z zaužitjem kontaminiranega živila. Povzročajo lahko blažje oblike in celo smrtonosne oblike bolezni. Zelo pomembno je preprečevanje teh bolezni, kar pa lahko dosežemo z ugotavljanjem glavnih prenašalcev in virov okužb (EFSA, 2007a).

Črevesne okužbe povzročajo le gibljivi sevi, ki so se sposobni pritrditi na črevesno sluznico. Glavna povzročitelja okužb sta *C. jejuni*, kateri predstavlja 80 % do 85 % vseh okužb in *C. coli*, ki pa predstavlja 10 % do 15 % vseh okužb (Moore in sod., 2005).

Kampilobakterji so znani povzročitelji črevesnih bolezni tako pri ljudeh, kot tudi pri živalih. Bolezen, ki jih kampilobakterji povzročajo, imenujemo kampilobakterioza. Vir okužb so asimptomatični klicenosci različnih živalskih vrst, bolne živali in ljudje. *C. jejuni* najdemo v črevesju številnih živalskih vrst (perutnina, govedo, ovce, ptice, zajci), medtem ko je *C. coli* razširjen predvsem pri prašičih. Obolevnost in umrljivost živali je velika.

Večina okuženih živali trajno izloča kampilobakterije, zato je pomembno preprečevanje bolezni že pri živalih (Andlovic, 2002).

Kampilobakteriji spadajo v prvo ekološko-epidemiološko skupino mikroorganizmov, saj se prenašajo s hrano, a se v njej ne razmnožujejo, ampak jo uporabljajo samo kot vektor prenosa. Minimalna infektivna doza (vrednost MID) je zelo nizka, saj je za razvoj bolezni dovolj 500-800 organizmov (Black in sod., 1988).

Najbolj pogost vzrok okužbe s kampilobakteriji pri ljudeh je prenos povzročitelja iz gastrointestinalnega trakta živali med prirejo živali ali klanjem z uporabo kontaminirane opreme ali vode na živila in preko zaužitja le-teh na človeka. Zato je zelo pomembno vzdrževanje higiene pri pripravi mesa, pravilna toplotna obdelava mesa, pasterizacija mleka, kloriranje vode ter ustrezno izvajanje sistema HACCP. Ta sistem ob pravilni izbiri kritičnih kontrolnih točk izdelkom zagotavlja mikrobiološko neoporečnost in stabilnost ter tako ščiti potrošnika in proizvajalca (van Vliet in Ketley, 2001).

Inkubacijska doba bolezni traja 2-5 dni. Te patogene bakterije so povzročiteljice vodne diareje in kolitisa. Bolniki čutijo abdominalno bolečino in imajo povečano telesno temperaturo. Okužbe prebavil s tem mikroorganizmom potekajo kot vodena, v hujši obliki pa kot krvava diareja. Bolj so ogroženi posamezniki s pomanjkanjem želodčne kisline, saj le-ta predstavlja pomembno oviro. Okužba poteka kot kratkotrajna driska in običajno mine v nekaj dneh, ampak v hujših primerih lahko traja dlje od enega tedna. Pri večini bolnikov diareja mine sama po sebi in zadostuje le simptomatično zdravljenje z nadomeščanjem tekočine in elektrolitov. Pri hujši obliki, ki se kaže v povišani telesni temperaturi, krvavi diareji s številnimi iztrebljanji, je potrebno zdravljenje z antibiotiki (Andlovic, 2002). Vrsta *C. jejuni* je znana tudi kot potencialna povzročiteljica Guillain-Barrejevega, Miller-Fisherjevega in Reiterjevega sindroma (Moore in sod., 2005). Zdravljenje z antibiotiki je potrebno tudi pri pacientih s šibkejšo imunsko odpornostjo. Za zdravljenje kampilobakterioz se uporabljajo makrolidi in fluorokinoloni. Kot alternativni antibiotiki so poznani tetraciklin, doksiciklin ter kloramfenikol. Za zdravljenje resnih sistemskih okužb pa zasledimo uporabo aminoglikozidov, predvsem gentamicina (Ge in sod., 2002). Okužba s kampilobakteriji namreč lahko vodi do bakteriemije, ki ima visoko stopnjo smrtnosti (Mamelli in sod., 2003).

V prvi fazi bakterijske infekcije poteka naseljevanje mukoznega sloja, ki prekriva črevesne epitelne celice. Nato sledi pritrjevanje na epitelne celice. S hitrim gibanjem bakterijska celica predre mukozni sloj epitelnih celic ter z invazivnostjo in z izdelovanjem toksinov onemogoči delovanje epitelnih celic. Zaradi infekcije je površina sluznice v jejunumu, ileumu in kolonu uničena. Sluznica je vneta in infiltrirana z nevrofilci (Andlovic, 2002). Najpomembnejši virulentni dejavniki so: gibljivost zaradi bičkov, kemotaksa, adhezivnost, invazivnost ter tvorba toksinov. Tvorijo se toplotno občutljivi enterotoksin CLT (cholera like toxin) in citotoksini (Ketley, 1997). Pomemben je tudi lipopolisaharidni sloj v zunanji membrani celične stene, ki ima endotoksično delovanje (predvsem lipid A) (Andlovic, 2002).

2.1.3 Incidenca in prevalenca kampilobakterjev

Vrste *Campylobacter coli* in *C. jejuni* danes srečamo kot ene izmed najbolj pogostih povzročiteljic črevesnih infekcij pri ljudeh. Število kampilobakterioz vseskozi narašča in v mnogih evropskih državah presega število salmoneloz. Glavni vir okužb s kampilobakteriji je perutnina. V Sloveniji sta prav tako salmoneloza in kampilobakterioza na prvem oziroma na drugem mestu po pogostosti okužb s kontaminirano hrano (EFSA, 2007a).

Iz poročila Evropske agencije za varnost hrane (EFSA, 2007a) je bilo v letu 2006 v 21 državah EU prijavljenih 175.561 humanih kampilobakterioz, kar to bolezen postavlja na prvo mesto med zoonozami prenesenimi s hrano. Povprečno je zbolelo 46,1 ljudi na 100.000 ljudi. Največ okužb je bilo evidentirano v poletnih mesecih. Med obolelo populacijo je veliko otrok do 4 leta. Glede na statistične podatke se je povečalo tudi število okužb med živalmi. Okužbe so se širile preko jat in čred. Statistični podatki opozarjajo tudi na povečevanje odpornosti kampilobakterjev na različne antibiotike iz leta v leto. V porastu so odpornosti kampilobakterjev na ciprofloksacin, eritromicin, streptomycin in tetraciklin (EFSA, 2007a).

Leta 2006 se je kampilobakterioza v Sloveniji uvrstila na drugo mesto med zoonozami. Vodilna zoonoza še vedno ostaja salmoneloza. V letu 2006 je bilo 944 dokumentiranih primerov kampilobakterioz, kar je manj kot prejšnja leta. Tudi pri nas je bilo največ primerov evidentiranih v poletih mesecih in glavni vir okužb je bila perutnina. V Sloveniji je zbolelo 47,1 ljudi na 100.000 ljudi. Leta 2006 se je glede na leto 2005 povečal delež pozitivnih vzorcev, odvzetih v proizvodnih obratih perutnine in vzorcev, odvzetih v prometu s perutnino (EFSA, 2007b).

2.1.4 Incidenca odpornih sevov

Iz poročila Evropske agencije za varnost hrane (EFSA, 2007a) lahko vidimo, da je bilo v letu 2006 v 21 državah EU z eritromicinom zdravljenih 5.202 humanih kampilobakterioz. Pri zdravljenju so evidentirali 3,4 % odpornih, 2,6 % srednje odpornih in 93,6 % občutljivih izolatov na eritromicin. V Sloveniji je bilo 69 primerov humanih kampilobakterioz v letu 2006 zdravljenih z eritromicinom. Med njimi sta bila samo 2 primera odporna na zdravljenje z eritromicinom (EFSA, 2007b). Statistika kaže tudi na porast odpornih izolatov živalskega izvora. To še posebej velja za svinjino, saj se tu še vedno uporablja največ antibiotikov. Večina humanih okužb s kampilobakteriji je povezana s hrano, saj ocene kažejo, da je več kot 80 % okužb ljudi povzročenih z uživanjem kontaminiranih ali premalo temperaturno obdelanih živil, še posebej perutnine.

2.2 ZDRAVLJENJE BOLEZNI Z UPORABO ANTIBIOTIKOV

Antibiotiki so snovi, ki zavirajo razmnoževanje in rast mikroorganizmov in so proizvod živih celic (bakterij in gliv). Z antibiotiki preprečujemo razmnoževanje in rast bakterij. Kemoterapevtiki so protimikrobna zdravila, ki so izdelana s sintezo ali s kemijsko

modifikacijo naravnega antibiotika. Sodobni antibiotiki so večinoma kemoterapevtiki. (Kotnik, 2002).

Antibiotike delimo v skupine glede na mehanizme delovanja in kemično zgradbo. Po učinkih na bakterije so bakteriocidni in bakteriostatični. Bakteriocidni antibiotiki poškodujejo mikroorganizem tako, da se ni več zmožen razmnoževati, medtem ko bakteriostatični razmnoževanje samo zavrejo. Delovanje posameznih antibiotikov vrednotimo z oznako MIC (minimalna inhibitorna koncentracija), ki nam pove, katera najmanjša koncentracija posameznega antibiotika je potrebna za baktericidno delovanje antibiotika (Kotnik, 2002). Pri tem velja, čim večji je MIC, bolj odporen je organizem oz. manjši je MIC, bolj občutljiv je organizem.

Antibiotiki imajo v bakterijski celici različna ciljna mesta, kjer delujejo. Glede na to ločimo antibiotike, ki (Kotnik, 2002):

- preprečujejo sintezo celične stene (penicilini, glikopeptidi, bacitracin);
- delujejo na sintezo znotrajceličnih beljakovin (aminoglikozidi, tetraciklini, kloramfenikol, makrolidi);
- vplivajo na sintezo nukleinskih kislin (kinoloni, metronidazol);
- ovirajo dejavnosti, povezane s sintezo citoplazemske membrane (polimiksini).

2.2.1 Makrolidi

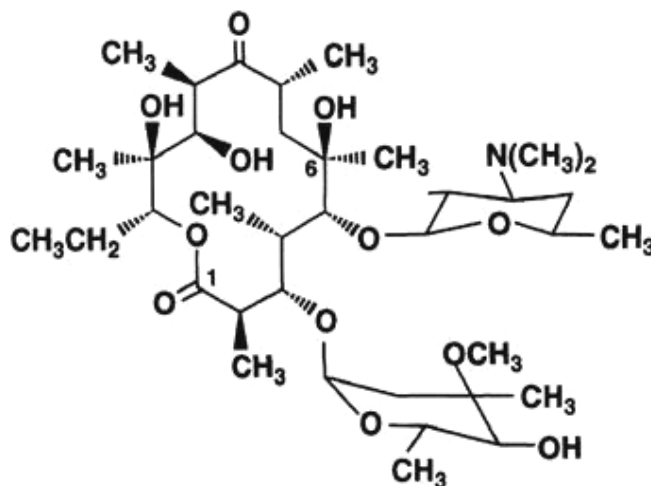
Makrolidi so po kemijski strukturi naravni poliketidni produkti sekundarnega metabolizma številnih aktinomicet. Klinično uporabni makrolidni antibiotiki so zgrajeni iz 14, 15 ali 16-členskega laktonskega obroča, na katerega je lahko vezanih tudi več ogljikovih hidratov. Makrolide uvrščamo med zaviralce proteinske sinteze, saj se vežejo na 50S ribosomsko podenoto. S tem povzročijo disociacijo peptidil-tRNA z ribosoma ter tako inhibirajo translakacijo v proteinski sintezi (Vester in Douthwaite, 2001). V manjših koncentracijah so bakteriostatični, v večjih pa baktericidni (Kotnik, 2002). Makrolidi so uporabni pri okužbah dihalnih, genitalnih in gastrointestinalnih poti ter pri okužbah kože in mehkih tkiv. Najbolj klinično uporaben in znan makrolid je eritromicin. Zaradi vse večje odpornosti bakterij na ta antibiotik pa so v zadnjih 20 letih razvili nove, še bolj učinkovite makrolide (azitromicin, klaritromicin, diritromicin). Ti se od eritromicina razlikujejo glede na velikost laktonskega obroča ter glede na razporejenost aminosladkornih spojin (Kirst in Sides, 1989).

2.2.1.1 Eritromicin

Za eritromicin je značilen 14-členski laktonski obroč (slika 1). Njegov vnos je peroralen in intravenozen. Spekter delovanja eritromicina je zelo širok. Uporablja se tudi pri okužbah z bakterijami *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* ter klamidijami (Kotnik, 2002).

Eritromicin ni stabilen v kislem, zato ga želodčna kislina v želodcu razgradi na 2 neaktivna metabolita, ki povzročata stranske učinke. Zaradi tega se zmanjša njegova učinkovitost,

zato so eritromicinsko bazo obdali s plastjo, odporno na kislino oz. jo vezali z v vodi netopnimi solmi. Zaradi lipofilnih lastnosti se tudi dobro razporeja in prodira v celice, kjer uspešno deluje na znotraj celične mikrobe (Kirst in Sides, 1989; Kanatani in Gugliemo, 1994).

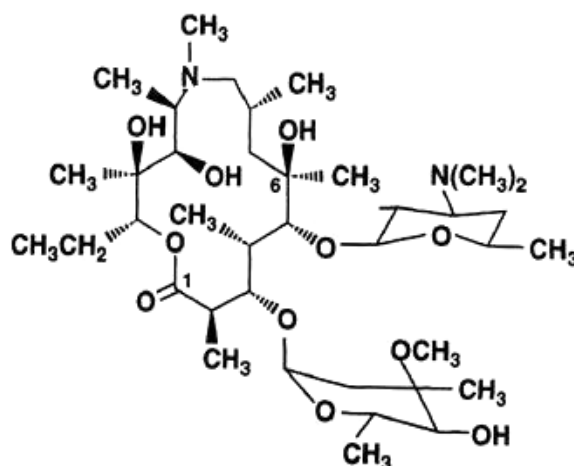


Slika 1: Kemijska struktura eritromicina (Kirst in Sides, 1989)

2.2.1.2 Azitromicin

Za azitromicin je značilen 15-členski laktonski obroč (slika 2) in enak spekter delovanja kot za eritromicin. Za razliko od eritromicina je stabilen v kislem, zato je bolj primeren za oralno zaužitje kot eritromicin. Zaužita hrana zmanjšuje izkoristljivost, zato ga je treba jemati najmanj uro pred ali po jedi (Kanatani in Gugliemo, 1994).

Azitromicin je antibiotik, ki bolje prodira v tkiva v primerjavi z eritromicinom. Njegova dobra lastnost je tudi njegovo prodiranje v nevrofilce in makrofage. Zelo dobro se resorbira iz prebavil in ima dolg razpolovni čas, kar omogoča enodnevne odmerke zdravlila (Kotnik, 2002). Raziskave kažejo na boljšo učinkovitost azitromicina pri bakterijah, ki so odporne na eritromicin. Učinkovitost pri kampilobakterjih je podobna učinku eritromicina (Kirst in Sides, 1989).

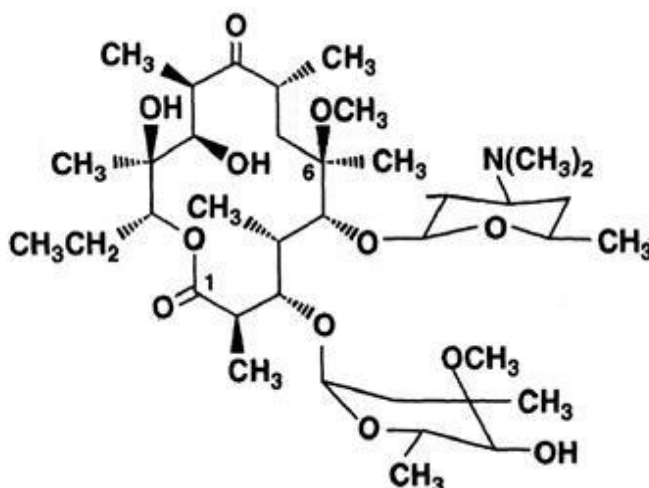


Slika 2: Kemijska struktura azitromicina (Kirst in Sides, 1989)

2.2.1.3 Klaritromicin

Za klaritromicin je značilen 14-členski laktonski obroč (slika 3) in podoben spekter delovanja kot za eritromicin. Klaritromicin ima pri kampilobakterjih enak učinek kot eritromicin. Za razliko od eritromicina ga kisline ne razgradijo, zato je bolj primeren za oralno zaužitje kot eritromicin (Kanatani in Gugliemo, 1994; Kirst in Sides, 1989).

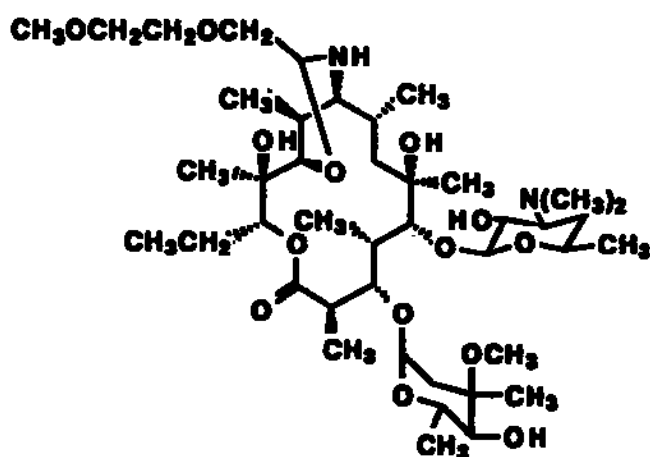
Njegova dobra lastnost je hitra in zelo dobra absorpcija iz gastrontestinalnega trakta v tkiva. V primerjavi z azitromicinom nima tako dolgega razpolovnega časa, zato sta potrebna 2 dnevna odmerka zdravila. Zaužita hrana ne zmanjšuje njegove izkoristljivosti, zato čas zaužitja ni pomemben. Sam klaritromicin nima tako dobrih protimikrobnih lastnosti kot njegovi razgradnji produkti (Kanatani in Gugliemo, 1994).



Slika 3: Kemijska struktura klaritromicina (Kirst in Sides, 1989)

2.2.1.4 Diritromicin

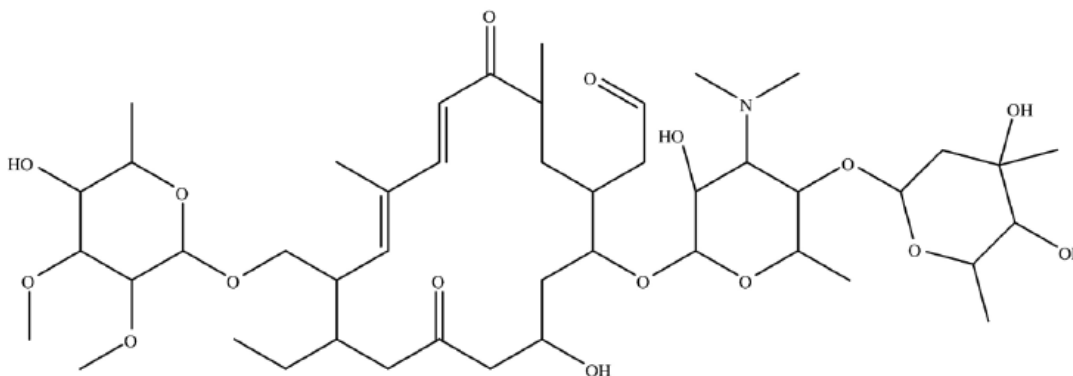
Za diritromicin je tudi značilen 14-členski laktonski obroč (slika 4). Ima podoben spekter delovanja kot eritromicin in dolg razpolovni čas, zato ga je potrebno zaužiti enkrat dnevno. Njegovi razgradnji produkti imajo boljše protimikrobne lastnosti kot pa sam diritromicin (Yu in Neu, 1990). Je manj učinkovit kot eritromicin, azitromicin in klaritromicin za večino znanih patogenih mikroorganizmov. Učinek pri *C. jejuni* in *C. coli* je boljši od eritromicina (Wintermeyer in sod., 1996; Kirst in Sides, 1989).



Slika 4: Kemijska struktura diritromicina (Kirst in Sides, 1989)

2.2.1.5 Tilozin

Tilozin je predstavnik makrolidnih antibiotikov s 16-členskim laktonskim obročem (slika 5) in se uporablja v veterini za zdravljenje in preprečevanje okužb posameznih živali ali živali v večjih skupinah ter kot rastni dodatek v krmi živali. Rastni dodatki se dodajajo v subletalnih koncentracijah daljše časovno obdobje in pripomorejo k boljšemu fizičnemu izgledu ter boljšemu dnevnemu prirastu živali. Posledica tega je spremenjena črevesna mikroflora, kar vodi do zmanjšanja rasti patogenih mikroorganizmov (Khan in sod., 2007; Angenent in sod., 2008). Zaradi daljše izpostavitve subletalnim koncentracijam določenega antibiotika so mikroorganizmi sposobni razviti odpornost na ta antibiotik oz. na celotno skupino antibiotikov. Ugotovili so, da vsakodnevni dodatek tilozina vodi do zmanjšanja števila kampilobakterjev, ampak preostali so nato odporni na tilozin in posledično tudi na eritromicin. Zaradi vse večjega porasta odpornih mikroorganizmov na različne antibiotike so leta 1999 v Evropski Uniji prepovedali uporabo tilozina in še nekaterih drugih antibiotikov kot rastnega dodatka pri govedu, piščancih in odojkah (Berrang in sod., 2007). Raziskovalci objavljajo učinke te omejitve, ki so kompleksni (Phillips, 2007), žal pa veljajo le za države Evropske Unije, ne pa tudi za ostale države,



Slika 5: Kemijska struktura tilozina (Khan in sod., 2007)

2.3 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI NA ANTIBIOTIKE

Odkritje antibiotikov pomeni enega najpomembnejših mejnikov v razvoju in napredku medicine. Vendar njihova uporaba ni samo močno zmanjšala smrtnosti zaradi infekcijskih bolezni, ampak postopno razvila vse več bakterijskih sevov, ki so odporni proti posameznim ali celo več različnim antibiotikom (Seme, 2002).

Delovanje antibiotikov je vezano na pojma občutljivost in odpornost. Oba pojma sta genetsko determinirana. Bakterijska odpornost je fenotipska ali/in genotipska značilnost bakterij. Bakterijsko odpornost delimo glede na izvor in glede na tip. Glede na izvor ločimo naravno (intrinzično) in pridobljeno odpornost ter glede na tip večkratno in navzkrižno odpornost. Navzkrižna odpornost je odpornost bakterijskih celic na kemijsko sorodne protimikrobne snovi in enakim mehanizmom odpornosti. Večkratna odpornost je odpornost bakterijskih celic na kemijsko nesorodne protimikrobne snovi z različnimi mehanizmi odpornosti (Sefton, 2002).

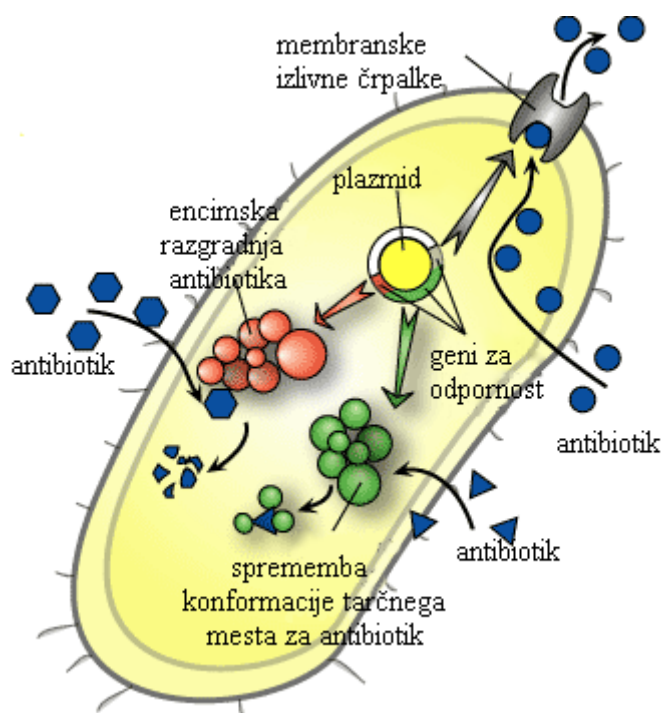
Izolate kampilobakterjev lahko glede na stopnjo občutljivosti na eritromicin razdelimo v 3 fenotipske razrede: odporni izolati (HLR), srednje odporni izolati (LLR) ter občutljivi izolati (S). Razred S ima vrednost MIC do 4 $\mu\text{g/ml}$, razred LLR ima vrednost MIC v območju med 4 in 16 $\mu\text{g/ml}$ in HLR ima vrednost MIC vključno 32 $\mu\text{g/ml}$ (Payot in sod., 2004). Canillac in Mourey (2001) sta vrednost MIC definirala kot najmanjšo koncentracijo snovi, ki popolnoma prepreči razmnoževanje izbranega mikroorganizma vsaj za 48 ur. V literaturi srečamo tudi izraz minimalna bakteriocidna koncentracija (MBC). To sta avtorja opisala kot koncentracijo izbrane snovi, ki ubije 99,9 % ali več začetnega števila mikrobnih celic v inokulumu.

Podobno kot ostale Gram negativne bakterije so tudi kampilobakterji razvili antibiotsko odpornost, ki je izrazito nezaželena. O naravni odpornosti bakterij proti antibiotikom govorimo, kadar je vsa bakterijska vrsta odporna na neko skupino antibiotikov. Posamezne bakterijske vrste ali rodovi so naravno odporni proti nekaterim antibiotikom, kadar nimajo tarčnih mest, na katera antibiotiki delujejo. Pridobljeno odpornost bakterij proti antibiotikom imajo, za razliko od naravne, samo nekateri sevi neke bakterijske vrste ali rodu. Odpornost je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne

bakterijske celice ali pridobitve nove genetske informacije z genskim prenosom preko plazmidov in transpozonov. Plazmidi so samostojne, krožne molekule DNA, ki ne kodirajo življensko pomembnih funkcij. Transpozoni so t.i. lepljivi konci dela DNA molekule, ki so se sposobni prenašati iz enega plazmida v drugega ali tudi v kromosom. Kot načine genskega prenosa informacij literatura opisuje konjugacijo (prenos genske informacije preko neposrednega kontakta 2 bakterijskih celic), transdukcijo (prenos genske informacije s pomočjo bakteriofagov) in transformacijo (prenos genske informacije preko eksogene DNA) (Sefton, 2002; Seme, 2002).

V literaturi je opisanih 5 osnovnih mehanizmov bakterijske odpornosti proti antibiotikom (slika 6) (Seme, 2002; Gibreel in Taylor, 2006):

- sprememba tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotika,
- encimska razgradnja antibiotika,
- nepropustnost ali zmanjšana prepustnost celične membrane za antibiotik,
- sprememba presnovne poti, na katero deluje antibiotik in
- aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice.



Slika 6: Prikaz najpogostejših mehanizmov odpornosti: aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice, encimsko razgradnjo antibiotika in spremembo tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotika (Yim, 2007)

2.3.1 Mehanizmi odpornosti bakterije *Campylobacter* spp.

Raziskave zadnjih let kažejo, da je odpornost kampilobakterjev posledica točkovnih mutacij ter prisotnosti izlivnih membranskih črpalk oz. transportnih membranskih proteinov (Mamelli in sod., 2005).

Literatura opisuje 2 različna mehanizma odpornosti na makrolide pri kampilobakterjih (Payot in sod., 2006):

- aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice (izlivne membranske črpalke)
- sprememba tarčnega mesta antibiotika zaradi mutacije ali metilacije

2.3.1.1 Povečana odpornost zaradi mutacij ali metiliranj

Mamelli in sod. (2005) so pri svoji raziskavi prišli do sklepa, da na povečano odpornost na makrolide vpliva mutacija na genih, ki kodirajo rRNA. Pri visoko odpornih izolatih so ugotovili mutacijo na mestu 2075 gena *23S rRNA*. Določili so dve spremembi v položaju dušikovih baz na A2075G in A2075T. Pri občutljivih izolatih pa mutacije ni bilo. To dokazuje, da ta mutacija pomembno vpliva na povečano bakterijsko odpornost. Do podobnih zaključkov so prišli tudi Corcoran in sod. (2006) ter Payot in sod. (2004), saj so ugotovili, da je mutacija na genu *23S rRNA* prisotna le pri izolatih skupine HLR. Tako so dokazali, da je točkovna mutacija v genih *23S rRNA* bistven razlog za povečano odpornost proti makrolidom, saj pri izolatih S in pri LLR izolatih ni bila prisotna. Gibreel in sod. (2005) so podoben mehanizem delovanja določili tudi pri bakterijskih vrstah, kot so: *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae* in *Helicobacter pylori*.

Corcoran in sod. (2006) so želeli ugotoviti, ali točkovna mutacija na genih proteinov L4 in L22, ki se nahajata na ribosomski podenoti 50S, tudi prispeva k povečani odpornosti kampilobakterjev na eritromicin. Ugotovili so prisotnost mutacij, tako pri HLR izolatih, kot tudi pri S izolatih. Zanimiva je bila tudi ugotovitev, da pri visoko odpornem izolatu *C. jejuni* (vrednost MIC večja od 256 µg/ml) te mutacije niso določili. Tako so dokazali, da ta vrsta mutacije ne prispeva k povečani rezistenci kampilobakterjev na makrolide, četudi je znano, da imajo nekatere ostale bakterijske vrste zaradi nje povečano odpornost.

Payot in sod. (2006) navajajo tudi spremembo tarčnega mesta za antibiotik na 23S rRNA zaradi metiliranja, ki je kodirana na genu *erm* (angl. erythromycin ribosome methylase). Ta mehanizem naj bi bil odgovoren za povečevanje navzkrižne odpornosti proti makrolidom, linkozamidom in streptograminom B.

2.3.1.2 Povečana odpornost zaradi prisotnosti membranskih izlivnih črpalk

Membranski izlivni transport je prisoten v vseh oblikah živih celic, tako pri evkariontih kot pri prokariontih. Prisoten je tako pri bakterijah, ki so občutljive ali odporne na določene antibiotike. Zanj je značilno, da sodeluje pri izločanju strukturno nesorodnih ali škodljivih snovi za celico, saj bakterijam omogoča izločanje snovi kot so antibiotiki, antiseptiki, kovine, detergenti ter protimikrobni proteini. Transport škodljivih snovi preko membrane poteka s pomočjo hidrolize ATP molekul ali z mehanizmom za sočasni transport dveh različnih molekul ali ionov skozi membrano v dveh različnih smereh (antiport). Za ta mehanizem se v literaturi uporablja še izraza »sistem transportnih proteinov« ali »efluksne črpalke« (Poole, 2005; Piddock, 2006).

Izlivne črpalke so najprej odkrili pri rakavih tvorbah pri sesalcih. Tu igrajo pomembno vlogo, saj s svojim transportnim sistemom omogočajo rakavim celicam večjo odpornost pri zdravljenju s kemoterapevtiki. Izlivne črpalke pri bakterijah so bile prvič pisno omenjene v začetku osemdesetih let 20. stoletja, ko se jih je povezovalo z neučinkovitim zdravljenjem s tetraciklini. Aktivnost membranskih izlivnih črpalk je opisana pri številnih klinično pomembnih bakterijskih vrstah, kot so *Escherichia coli* (AcrAB, AcrB, EmrE), *Pseudomonas aeruginosa* (MexAB-OprM), *Staphylococcus aureus* (QacA), *Vibrio parahaemolyticus* (NorM) ter tudi pri rodu *Campylobacter* (CmeABC) (Pages in sod., 2005; Kaatz, 2006; Ge in sod., 2005; Poole, 2005).

Membranske izlivne črpalke so ene izmed najpomembnejših komponent v bakterijski celični steni, saj kar 15 do 20 % genoma *E. coli* kodira zapise za njihovo sintezo (Ge in sod., 2005). Število genov, ki kodirajo lastnosti teh črpalk, je odvisno od velikosti genoma. Čim večji kot je genom, tem večje je število genov, ki kodirajo izlivne črpalke. Geni, ki kodirajo lastnosti izlivnih črpalk, so na kromosomu ali plazmidu. Izražanje genov izlivnih membranskih črpalk je kontrolirano z regulatornim proteinom. Odpornost je povezana s povečanim izražanjem teh genov, ki izvira iz mutacij znotraj represijskih genov. Povečano število membranskih izlivnih črpalk je posledica prevelikega izražanja efluksnih proteinov ali aminokislinske substitucije proteina, kar povzroči večjo učinkovitost pri transportu snovi iz celic. Posledica je izločanje za celico strukturno nesorodnih in škodljivih snovi, kar povzroča zmanjšano koncentracijo snovi, ki zavirajo celično rast in njeno razmnoževanje v sami celici. Zaradi tega se zmanjša tudi učinkovitost protimikrobnih snovi. Posamezen organizem ima lahko izraženih več skupin izlivnih membranskih sistemov hkrati. Mehanizem membranskih črpalk lahko učinkuje tudi sinergistično z ostalimi mehanizmi, ki povečajo odpornost (točkovne mutacije). Tako se izrazi fenotip MDR oz. večkratna ali mnogokratna odpornost proti številnim protimikrobnim snovem. Ugotovljeno je bilo tudi, da so vrednosti MIC sevov z izraženim fenotipom MDR dva do osemkrat višje kot pri sevih, ki nimajo izraženega fenotipa MDR (Piddock, 2006; Lin in sod., 2005; Cagliero in sod., 2005).

Fenotip MDR pa ni pomemben samo pri transportu antibiotikov iz celic, ampak je pomemben tudi pri povečanem izražanju virulenčnih dejavnikov (sposobnost kolonizacije, invazivnost, adhezivnost), kar organizmom omogoča preživetje v gostitelju (Piddock, 2006).

Fenotip MDR je pri prokariotih posledica delovanja 5 družin proteinov. Ločimo (Ge in sod., 2005; Piddock, 2006):

- RND (angl. resistance nodulation devision) skupino prenašalcev,
- MFS (angl. major facilitator superfamily) skupino prenašalcev,
- SMR (angl. small multidrug resistance) skupino prenašalcev,
- MATE (angl. multidrug and toxic compound extrusion) skupino prenašalcev in
- ABC (angl. ATP binding cassette) skupino prenašalcev.

Skupini ABC črpalk ne pripisujejo take pomembnosti pri odpornosti na antibiotike kot drugim črpalkam. Delovanje te skupine črpalk je posledica hidrolize molekul ATP. Skupina ABC črpalk ima pomembno vlogo pri transportu glikoproteina P, ki je pomemben

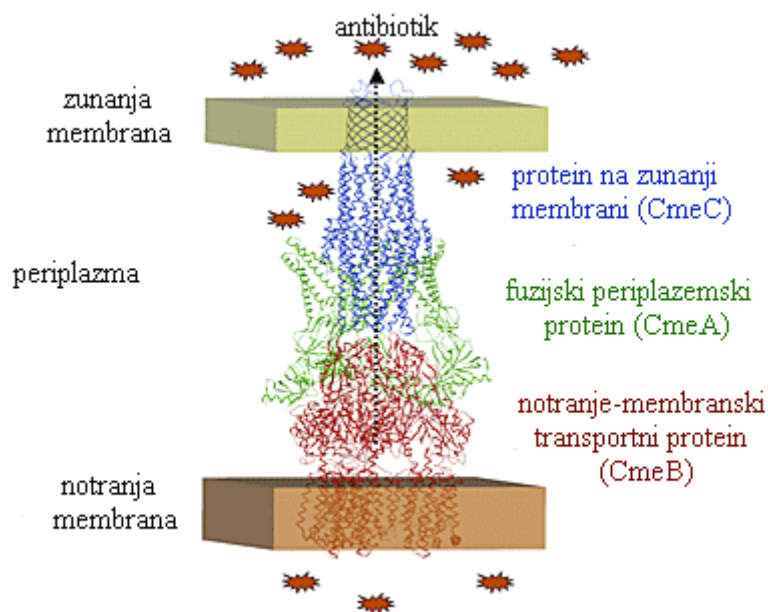
zaradi odpornosti tumorskih celic na kemoterapevtike. Za delovanje skupine MATE črpalk so odgovorni prenašalci Na^+ , ki hkrati črpajo v celico natrijeve ione, iz celice pa toksične snovi. Na ta način se iz celice transportirajo aminoglikozidi, fluorokinoloni in kationske snovi. Delovanje skupine MFS in SMR je posledica protonskega gradienta, ki v celico črpa protone, iz celice pa toksične snovi. Skupina SMR črpalk je podskupina veliko večje skupine DMT (angl. drug metabolite transporter) črpalk. Raziskovanje odpornosti na antibiotike se je v zadnjem času usmerilo v raziskovanje črpalk RND, saj so najpomembnejše črpalke pri klinično pomembnih Gram negativnih bakterijah (Ge in sod, 2005; Piddock, 2006; Poole, 2005).

Črpalke RND so sestavljene iz 3 glavnih komponent, ki se med seboj razlikujejo po velikosti in funkcijah, ki jih opravljajo. Te črpalke so sestavljene iz proteina v citoplazemski membrani in porina v zunanji membrani, katera sta povezana preko periplazemskega fuzijskega proteina (slika 7). Ta struktura omogoča črpanje pozitivno ali negativno nabitih molekul ter hidrofobnih in hidrofilnih molekul iz citoplazme in periplazme v izvencelični prostor (Lomovskaya in Bostian, 2006; Lomovskaya in sod., 2007).

2.3.1.3 Membranske izlivne črpalke pri kampilobakterijah

Leta 1995 so Charvalos in sod. prvič pri kampilobakterijah opredelili vlogo membranskih izlivnih črpalk in efluksa kot mehanizma odpornosti. Pumbwe in Piddockova sta leta 2002 identificirali in tudi molekularno opredelili gen *cmeB* bakterijskega genoma *C. jejuni*, kateri kodira črpalko CmeB (angl. *Campylobacter* multidrug efflux). Poleg tega so določili delovanje membransko-izlivnega sistema, ki izrazito pripomore k intrinzični odpornosti bakterij *C. jejuni* proti antibiotikom. Neodvisno od te skupine so tudi Lin in sod. v istem letu identificirali izlivno črpalko CmeABC. Uvrstili so jo v skupino RND prenašalcev.

Leta 2004 so Pumbwe in sod. pri bakterijah *Campylobacter jejuni* opisali še drugo tridelno črpalko CmeDEF, katera pa ne vključuje eritromicina kot substrata. Akiba in sodelavci (2006) poročajo o dominantni vlogi črpalke CmeABC in o vzajemnem delovanju CmeDEF in CmeABC.



Slika 7: Model tridelne membranske izlivne črpalke, kjer modra barva označuje protein na zunanji membrani (CmeC), rdeča notranji membranski transportni protein (CmeB), zelena pa periplazemski fuzijski protein (CmeA) (MpexPharmaceuticals, 2008)

Ge in sod. (2005) so pri kampilobakterjih identificirali 10 različnih genov, ki kodirajo informacije za sintezo membranskih izlivnih črpalk. Ugotovili so prisotnost RND, MATE, MFS in DMT skupin izlivnih črpalk. Vse črpalke nimajo enakega vpliva na intrinzično odpornost. Največji vpliv na intrinzično odpornost ima CmeABC. CmeABC je pri kampilobakterjih najpomembnejši membransko izlivni sistem. Sestavljen iz treh glavnih komponent, ki se med seboj razlikujejo tako po velikosti, kot tudi po funkcijah, ki jih opravljajo. Največji izmed njih je notranjo-membranski transportni protein (CmeB), ki ga kodira 3123 bp velik gen *Cj0366c*. Drugi po velikosti je protein na zunanji membrani (CmeC), katerega kodira gen *Cj0365c*, ki obsega 1479 bp. Najmanjši je periplazemski fuzijski protein (CmeA), ki ga kodira gen *Cj0367c* velikosti 1104 bp in za svoje delovanje potrebuje energijo iz ATP.

2.3.2 Inhibicija izlivnih črpalk

Danes so številne raziskave usmerjene v iskanje inhibitorjev izlivnih črpalk (EPI-ang. efflux pump inhibitor), ki delujejo inhibitorno na aktivnost izlivnih sistemov. Inhibicija delovanja bakterijskih izlivnih črpalk je zelo pomemben dejavnik za zmanjšanje bakterijske odpornosti na protimikrobne snovi. Z izgubo odpornosti bi antibiotiki spet pridobili na svojem pomenu, saj bi se povečala tudi učinkovitost antibiotikov pri visoko odpornih izolatih. Inhibitorji izlivnih črpalk so različne kemijske spojine, ki naj bi zmanjšale intrinzično ali pridobljeno odpornost bakterij na antibiotike ter zmanjšale pojavnost visoko odpornih sevov. Inhibitorji so lahko naravnega (produkti sekundarnega metabolizma rastlin) ali sintetičnega izvora (Marquez, 2005).

Inhibitorji lahko na tri različne načine blokirajo aktivnost membransko izlivnih črpalk. Inhibitorji lahko povzročijo mehanske poškodbe zunanje-membranskega kanala, lahko tekmujejo za vezavno mesto na zunanjem delu membranske črpalke in tako onemogočajo prehod protimikrobnih snovi v celico ter onemogočajo delovanje energijskega sistema, ki zagotavlja membranskim črpalkam energijo za svoje delovanje (Marquez, 2005; Pages in sod., 2005; Martinez in Lin, 2006; Lomovskaya in Bostian, 2006).

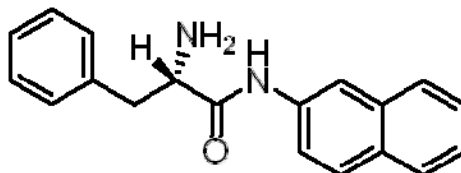
Danes v humani in veterinarski medicini še ni dovoljena uporaba zdravil, ki bi vsebovala inhibitorje membranskih črpalk. Njihovi stranski učinki namreč še niso dokončno pojasnjeni. Kljub temu pa avtorji še vseeno ugotavljajo, da bo verjetno v bližnji prihodnosti prišlo do razvoja kemijskih učinkovin, ki bi imele dodane inhibitorje membranskih črpalk. Ti bi verjetno pripeljali do učinkovitejšega zdravljenja bakterijskih okužb z antibiotiki (Lomovskaya in Bostian, 2006; Quinn in sod., 2007).

Mahamoud in sod. (2007) poročajo o 3 velikih skupinah inhibitorjev, ki naj bi izboljšali učinkovitost makrolidov. To so analogi fluorokinolonov, peptidomimetiki in arilpiperazini. Te molekule občutno povečajo znotrajcelično akumulacijo različnih antimikrobnih snovi, ki so sicer na ta transportni mehanizem občutljivi. Velik problem vseh treh skupin je njihova toksičnost, ki preprečuje njihovo klinično uporabo. Med peptidomimetike uvrščamo inhibitor fenilalanilarginin- β -naftilamid (PA β N) (slika 8), ki poveča občutljivost številnim po Gramu negativnim bakterijam. Inhibitor PA β N je bil prvič testiran na bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*, podoben učinek pa ima tudi na ostale po Gramu negativne bakterije. 1-(1-naftilmetil)-piperazin (NMP) je predstavnik skupine arilpiperazinov. Arilpiperazini povzročijo zmanjšanje intrinzične odpornosti RND tipa izlivnih črpalk, vendar mehanizem delovanja še ni pojasnjen. Analogi fluorokinolonov so nova skupina inhibitorjev, ki pa je še povsem neraziskana. Pages in sod. (2005) navajajo tudi inhibitor karbonil cianid m-klorofenilhidrazon (CCCP), ki onemogoča delovanje membranskega energijskega transporta.

Mamelli in sod. (2003) so prvi ugotavljali vpliv inhibitorja membranskih izlivnih črpalk pri različnih izolatih *Campylobacter coli* in *C. jejuni* s fenotipom MDR na povečanje bakterijske odpornosti. Inhibitor membranskih izlivnih črpalk PA β N so dodali, zato da bi povečali občutljivost bakterij na antibiotike. Pri vseh izolatih so vrednosti MIC določili brez dodatka in z dodatkom PA β N. Rezultati so pokazali, da se je vrednost MIC ob dodatku inhibitorja zmanjšala predvsem pri dodatku makrolidov (eritromicin in klaritromicin), pri dodatku fluorokinolonov pa se ni občutno zmanjšala. Tako so prišli do sklepa, da uporabljeni inhibitor vpliva na inhibicijo membranskih izlivnih črpalk, ki so zadolžene za črpanje makrolidov iz celice.

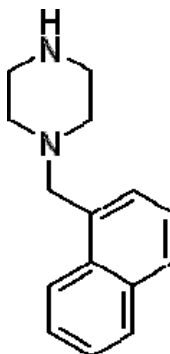
Podobno raziskavo so opravili tudi Payot in sod. (2004). V analizi so uporabili 38 izolatov *C. coli* z različnimi fenotipi odpornosti na eritromicin. Vrednost MIC eritromicina so določali brez in z dodatkom inhibitorja PA β N. Hkrati so testirali tudi različne koncentracije (10, 20, 40, 60 ter 120 mg/l) inhibitorja PA β N. Ugotovili so, da je najbolj optimalna koncentracija za povečanje občutljivosti 40 mg/l. Učinek inhibitorja se je pokazal tako pri občutljivih, kot tudi pri odpornih izolatih. Ugotovili so, da PA β N inhibira delovanje membranskih izlivnih črpalk, namenjene za črpanje makrolidov iz celice. Do

enakih zaključkov so prišli tudi Corcoran in sod. (2006), ki so inhibitor PAβN testirali pri vrstah *Campylobacter coli* in *C. jejuni*.



Slika 8: Kemijska strukturna formula inhibitorja membranskih izlivnih črpalk PAβN (Sigma- Aldrich, 2008a)

Bohnert in Kern (2005) pa sta kot prva ugotavljala vpliv arilpiperazinov na bakterije *Escherichia coli*. Ugotovila sta, da se je med arilpiperazini najboljše odrezal NMP (slika 9). Zmanjšal je vrednost MIC večim testiranim antibiotikom in hkrati povečal znotrajcelično koncentracijo antibiotikov, ki bi se drugače izločili iz celice. Podobno poročajo tudi Kern in sod., (2006). Ugotovili so, da ima NMP manjši učinek na zmanjšanje odpornosti na antibiotike kot PAβN pri isti koncentraciji. S povečanjem koncentracije NMP se je povečal tudi njegov učinek. Avtorja poročata tudi o različnih vezavnih mestih za različne substrate na črpalki, kar privede do različnega učinka različnih inhibitorjev. V literaturi najdemo tudi študije inhibitorja NMP na drugih testnih organizmih (Pannek in sod., 2006; Schumacher in sod., 2006; Kern in sod., 2006). Študije, opravljene na bakterijah *Campylobacter* do sedaj še niso bile objavljene, kar je bil tudi razlog, da smo ta inhibitor vključili v eksperimentalni del naloge.



Slika 9: Kemijska strukturna formula inhibitorja membranskih izlivnih črpalk NMP (Sigma- Aldrich, 2008b)

2.4 METODE UGOTAVLJANJA ODPORNOSTI BAKTERIJ RODU *Campylobacter* NA ANTIBIOTIKE

Trenutno se kot standardizirano metodo za ugotavljanje občutljivosti bakterij rodu *Campylobacter* na različne protimikrobne snovi uporablja samo dilucijsko metodo v agarju. Njena slabost je velika poraba materiala, časa in denarja. Zato se čedalje bolj uporabljajo tudi različne dilucijske metode v bujonu, metoda difuzije v agarju z diski ter E-test (McDermott in sod., 2005).

Metode določanja antimikrobnih snovi lahko temeljijo na fenotipskih in genotipskih lastnostih mikroorganizmov. Med genotipske metode spadajo sekveniranje genov, ki so odgovorni za odpornost in tehnike na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR). Te so bolj specifične in se izvajajo manj pogosto kot fenotipske metode, ki so hitrejše in cenejše. Izbira metode je odvisna od njene občutljivosti, enostavnosti, fleksibilnosti ter ponovljivosti (Vigil in sod., 2005).

Fenotipske metode lahko delimo v 2 skupini (Vigil in sod., 2005):

- metode s končno točko merjenja, katere nam podajo samo 1 rezultat in
- deskriptivne oz. opisne metode, pri katerih rezultate spremljamo v odvisnosti od časa (sledimo kinetiko delovanja).

Metode s končno točko merjenja lahko razdelimo na (Vigil in sod., 2005):

- metode difuzije v agarju,
- dilucijske metode v agarju ali bujonu,
- metode z uporabo plošč z gradientom koncentracije protimikrobnih snovi,
- metode z uporabo spiralne cepitve plošč in
- sanitarne in razkuževalne teste.

Deskriptivne metode, pri katerih kinetiko protimikrobnega delovanja sledimo v daljšem časovnem obdobju, lahko izvedemo različnimi merjenji mikrobne rasti. Pogosto je to merjenje optične gostote s turbidimetrom in je lahko izpeljana tudi kot metoda z eno točko merjenja, pri kateri merimo intenziteto prepuščene sipane svetlobe, ki je odvisna od gostote celic v merjeni suspenziji. Pri tej metodi torej spektrofotometrično (pri ustrezni valovni dolžini) merimo gostoto mikrobne populacije v prisotnosti protimikrobnega sredstva. Rezultate primerjamo s kontrolnimi vzorci. Ta metoda je zelo omejena z občutljivostjo inštrumenta. Rast mikroorganizmov lahko spremljamo tudi drugače, z merjenjem metabolične aktivnosti, štetjem pod mikroskopom ali cepljenjem vzorcev na agarske plošče, kjer po inkubaciji preštujemo kolonije (CFU/ml) (Vigil in sod., 2005).

2.4.1 Metoda difuzije v agarju

Metoda difuzije v agarju, imenovana tudi Kirby-Bauerjev test, je preprosta metoda, s katero ugotavljamo odpornost posameznih testnih bakterij na različna protimikrobna sredstva. Na gojišče z že nacepljeno kulturo položimo papirnate diske, prepojene s protimikrobnim sredstvom, kateri nato difundira v gojišče. Ko razdalja od diska narašča, koncentracija protimikrobnega sredstva logaritemsko pada. V odvisnosti od koncentracije in odpornosti na testirano sredstvo nastajajo inhibicijske cone mikrobne rasti, ki jih merimo po končani inkubaciji. Uporaba kontrolnega vzorca je obvezna, saj na velikost inhibicijske cone vpliva tudi količina agarja, koncentracija testnega inokuluma, temperatura in čas inkubacije. Čim večja je cona, tem večji učinek ima protimikrobno sredstvo. Če pa uporabljamo kot protimikrobno sredstvo antibiotik, pa tej metodi rečemo tudi difuzijski antibiogram (Vigil in sod., 2005).

2.4.2 Dilucijske metode

Dilucijske metode se uporabljajo za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) protimikrobne snovi, ki je potrebna za inhibicijo rasti mikroorganizma. Znotraj teh metod razlikujemo dilucijsko metodo v agarju, kjer protimikrobno snov razredčimo v trdnem gojišču ter dilucijsko metodo v bujonu, kjer je razredčitev opravljena v tekočem gojišču (Vigil in sod., 2005).

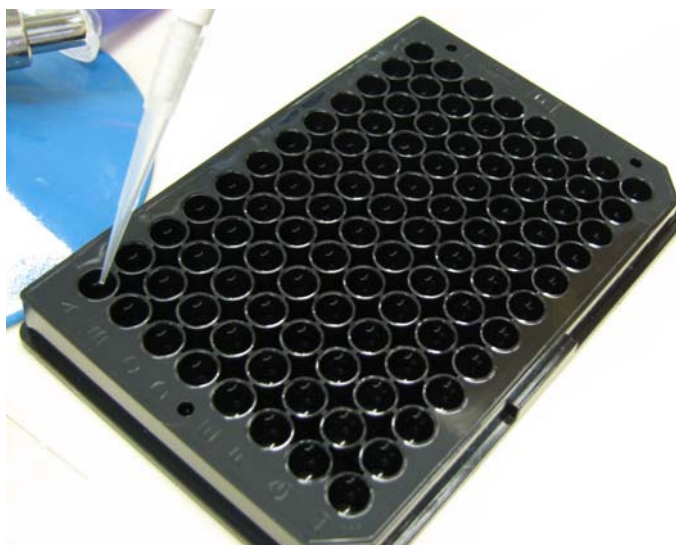
2.4.2.1 Dilucijska metoda v agarju

Dilucijska metoda v agarju je standardizirana in zanesljiva tehnika, ki se velikokrat uporablja kot referenčna metoda. Njena slabost je velika poraba materiala in časa. Metodo izvajamo tako, da v petrijeve plošče vlivamo neselektivni agar z že vključenimi različnimi koncentracijami protimikrobne snovi. Ko se agar strdi, sledi cepitev kulture ter inkubacija. Prednosti te metode je sočasno testiranje velikega števila vzorcev in pridobitev rezultatov za bakterije, ki ne rastejo dobro v tekočem gojišču (Vigil in sod., 2005).

2.4.2.2 Mikrodilucijska metoda v bujonu

Pri dilucijski metodi v bujonu, ločimo makrodilucijsko in mikrodilucijsko metodo. Razredčevanje pri makrodilucijski metodi poteka v epruveh in vključuje pripravo serijskih razredčitev protimikrobne snovi v tekočem mediju. Končni volumen znaša 1-2 ml na epruveto. Prva faza je inokulacija medija s standardizirano bakterijsko suspenzijo. Sledi inkubacija, ki pri kampilobakterjih poteka v mikroaerofilnih pogojih. Po inkubaciji kvantitativno določimo koncentracijo protimikrobne snovi, ki še inhibira rast mikroorganizmov - MIC. Negativne lastnosti te metode so v dolgotrajni ročni pripravi protimikrobne snovi za vsak test posebej, v porabi velike količine reagentov ter v veliki verjetnosti, da bi pri pripravi medija in ustreznih koncentracij protimikrobnih snovi prišlo do napak (Jorgensen in Ferraro, 1998).

Leta 2003 so Luber in sod. kot prvi standardizirali mikrodilucijsko metodo v bujonu za ugotavljanje občutljivosti bakterij *Campylobacter coli* in *C. jejuni*. Zaradi enostavnosti in manjše porabe materiala je bolj primerna za rutinske preiskave v laboratorijih. Omogoča spremljanje odpornosti večjega števila izolatov hkrati oz. hkratno testiranje večjega števila različnih koncentracij antimikrobnih snovi.



Slika 10: Mikrotitrna ploščica

Pri tej metodi se uporablja mikrotitrna plošča (slika 10), kjer protimikrobno snov skupaj z gojiščem serijsko razredčujemo vzdolž kolon na ploščici. Razlika z makrodilucijsko metodo se kaže tudi v uporabi manjšega volumna, tako gojišča, kot tudi reagentov, saj maksimalen volumen znaša do nekaj sto μl . Mikrotitrna ploščica ima 96 luknjic, v katere dodajamo posamezne reagente in bakterijsko kulturo. Po končani inkubaciji učinek protimikrobnega agensa ugotavljamo preko merjenja fizikalno-kemijskih lastnosti, kot so: absorbanca oziroma optična gostota, ki temelji na merjenju motnosti, fluorescence ali luminiscence s čitalcem mikrotiterskih plošč in ustreznim reagentom (Luber in sod., 2003). Številni avtorji navajajo tudi vzroke za odstopanje rezultatov pri mikrodilucijski metodi v bujonu od ostalih metod. To pripisujejo uporabi različnih gojišč in pogojev kultivacije ter pomanjkanju mednarodnih standardov pri interpretaciji rezultatov. Kot rešitev navajajo uporabo referenčnih sevov, saj se le tako lahko preveri točnost, natančnost in ponovljivost metode (Luber in sod., 2003; Holasova in sod., 2007).

Prednosti te metode se kažejo v boljši ekonomičnosti, saj je tu manjša poraba reagentov, gojišč, manjša poraba časa oziroma možno je večje število opravljenih analiz v primerjavi z makrodilucijsko metodo v enakem časovnem obdobju. Mikrodilucijska metoda ima dobro ponovljivost ter možnost avtomatizacije metode. Njena slaba stran pa je pomanjkanje mednarodnih standardov (Luber in sod., 2003; Holasova in sod., 2007).

2.4.3 Metode z uporabo plošč z gradientom

Antimikrobni agens v različnih koncentracijah dodajamo v tekoči agar, ki se ga nato v štirikotnih petrijevkah razliva tako, da količina agarja pada z ene strani proti drugi. Ko se strdi, čezenj prilijemo agar brez dodane protimikrobne snovi. Kmalu se pojavi gradient, ki je odvisen od sposobnosti difundiranja protimikrobnega sredstva skozi agar. Nato sledi cepitev kulture in inkubacija (Vigil in sod., 2005).

2.4.4 Metode z uporabo spiralne cepitve plošč

To je avtomatska metoda, pri kateri naprava avtomatsko vbrizgava določene koncentracije protimikrobnega sredstva v obliki arhimedove krivulje in hkrati cepi kulturo. Nastali gradient pada iz notranjosti proti zunanosti petrijevke. Po inkubaciji sledi avtomatsko odčitavanje rezultatov (Vigil in sod., 2005).

2.4.5 Inhibicijske krivulje

Pri tej metodi bujonu dodamo določene koncentracije protimikrobnega sredstva in testnega organizma. Sledi dolga inkubacija in med inkubacijo v različnih časovnih intervalih odvzemamo vzorce. Te vzorce nato cepimo na plošče ali kako drugače spremljamo rast. Sledi izris krivulj (Vigil in sod., 2005).

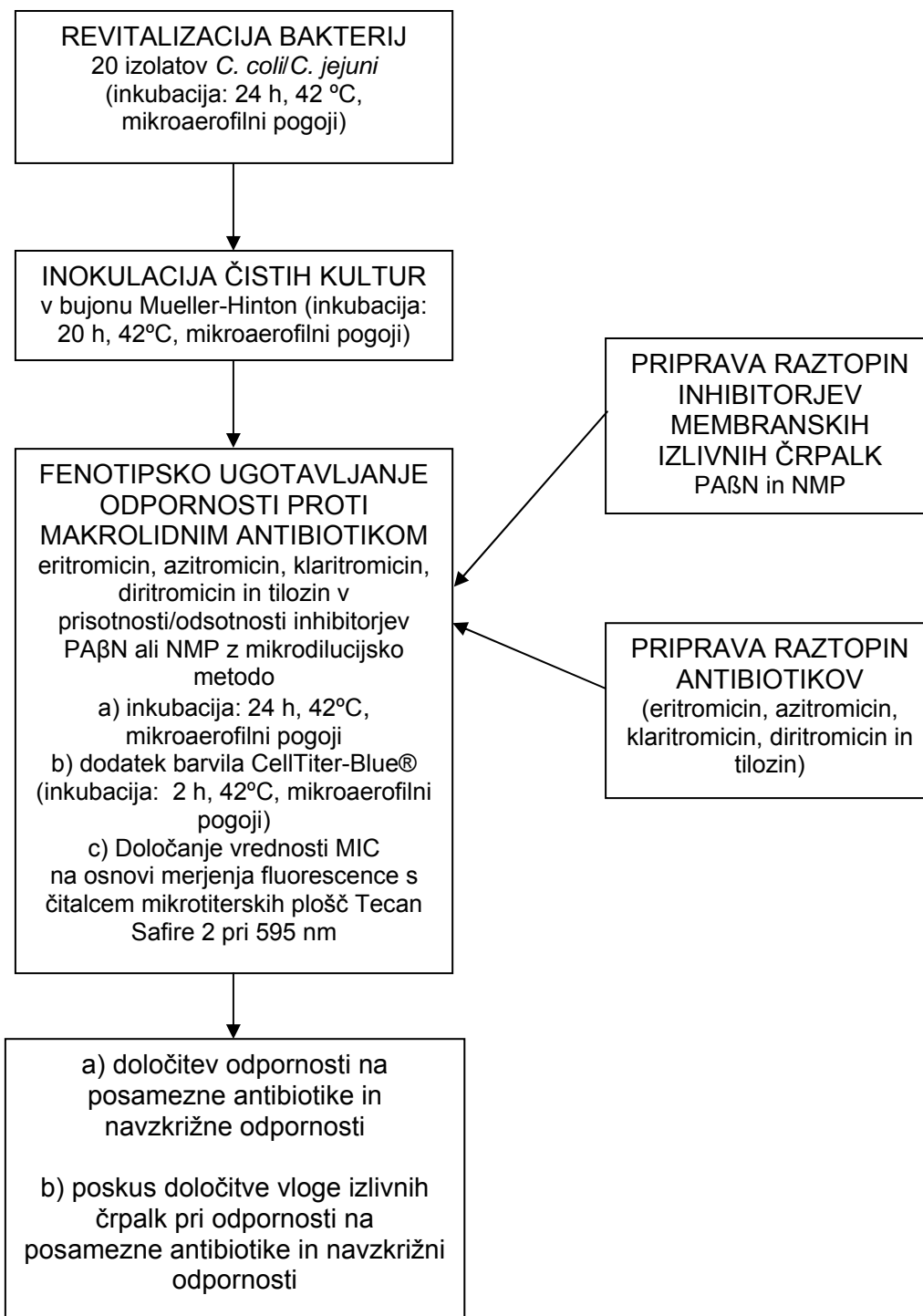
2.4.6 Izobologram

Za prikaz skupnega učinka različnih protimikrobnih snovi uporabljamo grafično predstavitev, katero imenujemo izobologram. Pri primerjanju antimikrobnih sredstev ločimo aditivni, antagonistični in sinergistični učinek (Vigil in sod., 2005).

Zaradi vse večje odpornosti mikroorganizmov na antibiotike je čedalje več raziskav usmerjenih v raziskovanje sinergističnega učinka različnih antimikrobnih sredstev. Najbolj znane naravne snovi, ki so jim dokazali sinergistični učinek z antibiotiki, so rastlinski ekstrakti, eterična olja in propolis. Sinergistični učinek določajo z različnimi metodami, kot sta Kirby-Bauerjev test in E-test (Fernandez in sod., 2005).

3 METODE IN MATERIAL

3.1 POTEK DELA



Slika 11: Shema poskusa diplomskega dela

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mikroorganizmi

Za proučevanje bakterijske odpornosti na izbrane antibiotike smo uporabili 20 izbranih izolatov *C. jejuni* in *C. coli* iz zbirke Katedre za živilsko mikrobiologijo med katerimi sta bila ATCC33559 in ATCC33560 referenčna izolata. Izolirana sta bila iz živalskega fecesa. Ostali so bili izbrani humani, živilski in živalski sevi. Iz zbirke smo jih izbrali na osnovi predhodno zbranih podatkov o odpornosti proti eritromicinu. Kulture so bile shranjene v tekočem gojišču BHI z dodatkom glicerola in defibrilirane konjske krvi pri temperaturi -80 °C. Sledila je revitalizacija kultur. Kulture so bile namnožene na selektivnem krvnem agarju CCDA. Ker bakterije rodu *Campylobacter* uvrščamo med mikroaerofilne mikroorganizme, je inkubacija potekala v kontrolirani atmosferi (3 % O₂, 10 % CO₂, 87 % N₂) pri temperaturi 42 °C.

3.2.1.1 Mikrobiološka gojišča

3.2.1.1.1 Agar CCDA

Sestava:

- Osnovni medij CCDA (Oxoid, CM 739);
- Dodatek za selektivnost CCDA Selective Supplement (Oxoid, SR155E);
- 500 ml dH₂O.

Preglednica 1: Sestava osnovnega medija za agar CCDA

SESTAVINE	KOLIČINA (g/l)
hranilni bujon	25,0
aktivno oglje	4,0
hidroliziran kazeinat	3,0
železov sulfat	0,25
natrijev piruvat	0,25
agar	12,0

Preglednica 2: Sestava dodatka za selektivnost CCDA Selective Supplement

SESTAVINE	KOLIČINA (mg/l)
cefoperazon	64,0
amfotericin	20,0

Priprava:

Zatehto 22,75 g osnovnega medija (preglednica 1) za agar CCDA raztopimo v 500 ml dH₂O ter ga steriliziramo 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Medij nato ohladimo na temperaturo 45 °C, dodamo raztopino CCDA dodatka za selektivnost

(preglednica 2) CCDA Selective Supplement (Oxoid, SR155E), ga premešamo ter razlijemo v petrijevke.

3.2.1.1.2 Tekoče gojišče Mueller Hinton bujon - MHB

Sestava:

- Osnovni medij Mueller Hinton (Oxoid, CM0405)
- 500 ml dH₂O
- 25 ml sterilne defibrilirane konjske krvi (Oxoid, SR048C)
- 1 steklenička dodatka za rast *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, SR232E)
- 1 steklenička dodatka za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid, SR069E)

Preglednica 3: Sestava osnovnega medija za MHB

SESTAVINE	KOLIČINA (g/l)
Mesni ekstrakt	300,0
Hidroliziran kazeinat	17,5
Škrob	1,5

Priprava:

Zatehto 10,5 g osnovnega medija (preglednica 3) raztopimo v 500 ml dH₂O ter steriliziramo 15 minut pri temperaturi 155 °C in tlaku 1,1 bar. Po sterilizaciji medij ohladimo v vodni kopeli (na 45 °C) in mu aseptično dodamo 25 ml defibrilirane konjske krvi, raztopino dodatka za rast ter raztopino dodatka za selektivnost. Vse skupaj dobro premešamo in pripravljeno gojišče hranimo pri temperaturi 4 °C. Če gojišča ne potrebujemo takoj, mu konjsko kri dodamo tik pred uporabo.

3.2.2 Priprava raztopin antibiotikov

3.2.2.1 Eritromicin (SIGMA-ALDRICH CO.)

Zatehto eritromicina (0,0256 g) smo raztopili v 5 ml absolutnega etanola in jo prefiltrirali skozi 0,2 µm filter zaradi mikrobioloških zahtev. 0,4 ml prefiltrirane raztopine smo nato dodali 1,6 ml gojišča MHB. 100 µl tako pripravljene raztopine antibiotika s koncentracijo 1024 µg/ml smo razredčili s 50 µl bakterijske kulture in koncentracija antibiotika je tako znašala 512 µg/ml.

3.2.2.2 Klaritromicin (FLUKA BIOCHEMIKA), Azitromicin (SIGMA-ALDRICH CO.), Diritromicin (SIGMA-ALDRICH CO.), Tilozin (USP standard)

Pri vseh antibiotikih smo postopali enako. Zatehto posameznega antibiotika (0,0064 g) smo raztopili v 1,25 ml absolutnega etanola. Raztopino smo nato premešali z vrtničnim

mešalnikom in jo prefiltrirali skozi 0,2 µm filter zaradi mikrobioloških zahtev. Nato smo odvzeli 0,4 ml prefiltrirane raztopine in jo zmešali z 1,6 ml gojišča MHB. 100 µl tako pripravljene raztopine antibiotika s koncentracijo 1024 µg/ml smo razredčili s 50 µl bakterijske kulture in koncentracija antibiotika je tako znašala 512 µg/ml.

3.2.3 Priprava inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk

3.2.3.1 Inhibitor PAβN (SIGMA-ALDRICH CO.)

Zatehtali smo 0,0010 g PAβN in ga raztopili v 2 ml ddH₂O vodi ter dobljeno raztopino premešali v vrtinčnem mešalniku in jo prefiltrirali skozi 0,2 µm filter zaradi mikrobioloških zahtev. Koncentracija topljenca je znašala 500 µg/ml.

3.2.3.2 Inhibitor NMP (Chess, Mannheim, Nemčija)

Zatehtali smo 0,0080 g NMP in ga raztopili v 1 ml absolutnega etanola ter dobljeno raztopino premešali v vrtinčnem mešalniku in jo prefiltrirali 0,2 µm filter zaradi mikrobioloških zahtev. Koncentracija topljenca je znašala 8000 µg/ml.

3.2.4 Priprava reagentov, raztopin in ostalih dodatkov

3.2.4.1 Fiziološka raztopina

Sestavine za pripravo KH₂PO₄:

- 3,4 g KH₂PO₄ (Kemika)
- 1100 ml dH₂O

Priprava:

Zatehto 3,4 g KH₂PO₄ smo raztopili v 100 ml dH₂O in uravnali pH na 7,2. Nato smo 1,25 ml pripravljene osnovne raztopine razredčili v 1000 ml dH₂O, premešali in sterilizirali v avtoklavu (15 minut, T = 12 °C).

3.2.4.2 Barvilo resazurin CellTiter-Blue[®] (Promega Corporation)

Barvilo je bilo skladiščeno v zamrzovalni omari na -20 °C. Pred uporabo smo ga tajali na sobni temperaturi, zaščitene pred svetlobo.

3.2.5 Laboratorijska oprema

- splošni mikrobiološki material: petrijeve plošče (Labor tehnika, Golias), cepilne zanke, avtomatske pipete in nastavki za pipete (Gilson, Eppendorf), merilni valji (Plastibrand), epice (Eppendorf), laboratorijske steklenice (Duran), plastični lončki (Labor tehnika Golias), baterijski pipetor (Eppendorf easypet);
- zaščitna mikrobiološka komora SMBC 122AV (Iskra PIO);
- digestorij (TIP382, Elektromedicina);
- tehtnici (Sartorius Analytic (v območju delovanja od 10 mg do 120g ± 0,01 mg) in Mettler Toledo (v območju delovanja od 0,5 g do 1510 g ± 0,01 g));
- inkubator (Kambič SP190);
- mikrovalovna pečica (Cook n'grill 1300, Sanyo);
- zamrzovalnik (LTH), nastavljen na – 20 °C;
- zamrzovalna omara (Heto Ultra Freeze), nastavljena na – 80 °C;
- hladilnik (Bosch);
- vrtnično mešalo (Yellowline, IKA);
- plinski gorilnik;
- plinska bomba z mešanico plina: 3% O₂, 10% CO₂, 87% N₂ (Istragas);
- anaerobni lonci (Anaeroyal 2,5l, Oxoid Ago 25A);
- injekcijske brizgalke (PB Plastik);
- filtrirni papir (Millipore; Isopore membrane filters 0,2 µm, GTBP);
- programska oprema: Microsoft Office, programski paket Magellan;
- centrifuga (5415C, Eppendorf Centrifuge);
- čitalec mikrotitrskih plošč (Tecan Safire 2);
- črne mikrotitrskne plošče z ravnim dnom (Nunc);
- 12 – kanalna pipeta (Eppendorf);
- kad za tekoče gojišče (Eppendorf);
- sterilizator-avtoklav, V= 40 dm³ (Sutjeska);

3.3 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija kultur

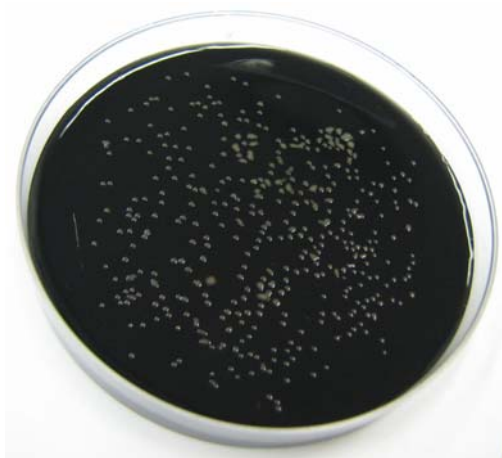
Posamezne izolate bakterij, ki so bili shranjeni v krioepruvetkah (z dodatkom BHI, glicerola, defibrilirane konjske krvi) pri -80 °C, smo s cepilno zanko aseptično prenesli na trdno gojišče CCDA. Petrijeve plošče, na katerih so bile nacepljene kulture kampilobakterjev, smo inkubirali v mikroaerofilnih pogojih (3 % O₂, 10 % CO₂, 87 % N₂) za 48 ur pri 42 °C, oziroma do pojava tipičnih kolonij.

3.3.2 Priprava inokuluma

Po končani inkubaciji so bile na selektivnem gojišču CCDA opazne sive kolonije kampilobakterjev. S cepilno zanko smo posamezne kolonije za vsak izolat posebej resuspendirali v tekočem gojišču MHB (4 ml), kateremu je bila dodana sterilna defibrilirana konjska kri (0,2 ml). Tako smo dobili koncentracijo 10^5 - 10^6 CFU/ml. Da smo zagotovili dobro disperzijo mikrobnih celic v gojišču, smo raztopino v eprugetah z vrtinčnim mešalom dobro premešali. Ta postopek je potekal v mikrobiološki komori, ki nam je pri delu zagotavljala aseptične pogoje. Nato smo epruvete, v katerih so bila gojišča s posameznimi izolati, inkubirali v mikroaerofilnih pogojih za 15 ur pri 42 °C.

3.3.3 Določanje koncentracije celic v inokulumu

Koncentracijo celic v inokulumu smo določali s štetjem bakterijskih kolonij na trdnem gojišču CCDA. Pojav kolonij na gojišču je pomenil, da so bile izolirane celice metabolično aktivne in so se bile sposobne deliti. Kolonije, ki so se pojavile na gojišču, so bile sive barve in različnih oblik. Najbolj pogosto so bile ploščate ali okrogle z neravnim robom (slika 12).



Slika 12: Rast kolonij bakterij *Campylobacter* na selektivnem gojišču CCDA

Poizkus smo izvedli v mikrobiološki komori, v kateri so bili vzpostavljeni aseptični pogoji. Naredili smo serijske razredčitve (po Kochu), največja razredčitev je bila -7. Uporabljali smo mikrocentrifugirke Eppendorf, v katerih je bilo 900 μ l fiziološke raztopine. Pri prvi razredčitvi smo odpipetirali 100 μ l inokuluma v epico s fiziološko raztopino ter vsebino dobro premešali. Nato smo iz te epice odpipetirali 100 μ l vsebine v novo epico. Tak postopek smo ponavljali do razredčitve -6, iz katere smo nato odpipetirali 100 μ l raztopine na gojišče CCDA. Pred tem smo tudi iz epice z razredčitvijo -5 odpipetirali 100 μ l raztopine na gojišče CCDA. Tako smo na ploščah z gojiščem dobili za vsak izolat razredčitvi -7 in -6. Petrijeve plošče smo nato za 24 ur inkubirali v mikroaerofilnih pogojih pri temperaturi 42 °C. Po končani inkubaciji smo ob gorilniku prešteli kolonije, ki so zrasle na ploščah. Za izračun povprečnega števila kolonij smo uporabili sledečo enačbo:

$$N = \frac{\Sigma c}{(a + 0,1b)d}$$

N...CFU/ml

Σc ... vsota kolonij na vseh ploščah

a...število plošč prve števné razredčitve

b...število plošč druge števné razredčitve

d...razredčitveni faktor (prve števné razredčitve)

3.3.4 Mikrodilucijska metoda v bujonu

3.3.4.1 Priprava koncentracij antibiotikov

Odpornost kampilobakterjev smo preizkušali z uporabo antibiotikov: eritromicin, azitromicin, klaritromicin, diritromicin in tilozin. Koncentracijski razmik je bil za vse antibiotike enak. Najvišja uporabljena koncentracija je bila 512 $\mu\text{g/ml}$, najnižja pa 0,063 $\mu\text{g/ml}$. Da so imeli antibiotiki na bakterije ustrezen učinek, smo jih morali po zatehti raztopiti v topilih, ki so zagotovili njihovo najboljšo topnost. Za raztapljanje vseh antibiotikov smo uporabili absolutni etanol. Po dodatku topila smo raztopine mešali v vrtničnem mešalniku, dokler ni bilo več vidnih delcev topljenca ter prefiltrirali. Epruvete, v katerih so bile prefiltrirane raztopine antibiotikov, smo nato ovili v alu folijo in jih shranili v hladilniku za maksimalno pet dni, saj smo sveže raztopine antibiotikov pripravljali vsak teden sproti. Tisti dan, ko smo na mikrotitersko ploščo dodajali reagente, smo 0,4 ml prefiltrirane raztopine antibiotikov dodatno razredčili z 1,6 ml gojišča MHB. Začetna koncentracija antibiotikov je tako znašala:

začetna raztopina eritromicina: $c = 0,0256 \text{ g}/5 \text{ ml} = 5120 \mu\text{g/ml}$

začetna raztopina azitromicina, klaritromicina, diritromicina, tilozina:

$c = 0,0064 \text{ g}/1,25 \text{ ml} = 5120 \mu\text{g/ml}$

masa antibiotika v topilu: $m = 5120 \mu\text{g/ml} \times 0,4 \text{ ml} = 2048 \mu\text{g}$

koncentracija antibiotika po dodatku gojišča MHB:

$2048 \mu\text{g}/(0,4+1,6)\text{ml} = 1024 \mu\text{g/ml}$

Ker smo po dodatku 100 μl raztopine antibiotika s koncentracijo 1024 $\mu\text{g/ml}$ v luknjice na mikrotiterski plošči dodali še kulturo v razmerju 1:1, je začetna koncentracija znašala 512 $\mu\text{g/ml}$.

3.3.4.2 Priprava kulture

Za pripravo inokuluma smo prenesli 150 μl namnožene 15-urne kulture v epruveto, v kateri je bilo 10 ml gojišča MHB. Tu je bilo pomembno, da smo 15-urno kulturo pred dodatkom v MHB dobro premešali, da smo tako dosegli homogeno razporeditev mikrobnih celic po celotnem volumnu. Iz epruvete, v kateri je bilo 10 ml gojišča z MHB s kulturo, smo v vdolbinice na mikrotiterski plošči nanašali 50 μl raztopine. Pred vsakim dodatkom te

raztopine v luknjico smo tudi to vsebino epruvete prav tako dobro premešali na vrtničnem mešalu.

3.3.4.3 Princip in izvedba metode

Mikrotitrna ploščica ima 96 luknjic. Vrstice so označene z črkami A, B, C, D, E, F, G, H, kolone pa s številkami od 1 do 12. Ploščo smo razdelili tako, da smo na njej lahko opravili analizo z dvema izolatoma za en antibiotik oz. enemu izolatoma za dva antibiotika. Ker smo v analizo vključili določanje vrednosti MIC brez prisotnosti inhibitorja ter določanje vrednosti MIC v prisotnosti inhibitorja, smo ploščico razdelili na tri dele (preglednica 5). Zaradi primerjave vrednosti MIC, dobljenih ob prisotnosti in odsotnosti inhibitorja PABN in NMP, smo pri raztopini antibiotika in gojišča dodali ali 4,17 μ l inhibitorja PABN s koncentracijo 500 μ g/ml ali 2,04 μ l NMP s koncentracijo 8000 μ g/ml.

Na vsaki plošči smo merili fluorescenco za samo gojišče (»blank«). Tako smo izmerili vpliv samega gojišča na izmerjeno vrednost. Dobljeno vrednost smo nato odšteli od izmerjene vrednosti za posamezno koncentracijo antibiotika. Naredili smo še test »pozitivne kontrole«. To smo storili tako, da smo v luknjice dodali samo gojišče in kulturo. Izmerjena vrednost v tej luknjici nam je povedala o metabolični aktivnosti uporabljene kulture. Podobno smo naredili tudi v vdolbinici, v katero smo poleg gojišča in kulture dodali še inhibitor. S tem poizkusom smo testirali, če je imel dodatek inhibitorja vpliv na rast bakterij.

V luknjico, v kateri je bila največja koncentracija antibiotika, smo najprej z avtomatsko pipeto dodali 100 μ l že prej pripravljene raztopine antibiotika s koncentracijo 1024 μ g/ml. V vse ostale vdolbinice smo dodali 50 μ l gojišča MHB. Nato smo iz luknjice, v katero smo dodali največjo koncentracijo antibiotika, prenesli 50 μ l raztopine v naslednjo vdolbinico navpično navzdol in dobro premešali. Nato smo iz te vdolbinice prenesli 50 μ l raztopine v naslednjo, ter spet dobro premešali. Tak postopek smo ponavljali vse do luknjice, kjer je bila najmanjša koncentracija antibiotika (0,063 μ g/ml). Tak način priprave razredčitev nam je zagotovil, da se je koncentracija antibiotika zmanjševala za polovico po koloni navzdol. Ker smo raztopine prenašali iz luknjice, kjer je bila večja koncentracija v naslednjo, je končni volumen v vseh luknjicah znašal 50 μ l. Iz zadnje vdolbinice smo 50 μ l raztopine zavrgli. Pri vsakem antibiotiku smo opravili tri serije razredčitev, saj je bila prva serija brez dodanega inhibitorja, drugi dve pa sta bili z dodatkom PABN in NMP. Kjer je bil potreben dodatek inhibitorja, smo dodali še 4,17 μ l PABN oz. 2,04 μ l NMP. Pri vseh treh antibiotikih smo postopali enako. Ko smo napravili ustrezne razredčitve, smo v vse luknjice (razen v »blank«) dodali po 50 μ l standardizirane čiste kulture *Campylobacter*. Po njenem dodatku smo vsebino v luknjici dobro premešali (preglednica 4). Tako smo dobili končne delovne koncentracije testiranega antibiotika. Po končanem postopku smo mikrotitrsko ploščo pokrili s pokrovom, jo dali v posodo, ki je dobro tesnila in jo prepihali z mešanico plina (3 % O₂, 10 % CO₂, 87 % N₂). Nato smo posodo, v kateri je bila mikrotitrna ploščica, dobro zaprli ter jo inkubirali 24 ur pri 42 °C.

Preglednica 4: Oznaka luknjic v mikrotitrski ploščici in njihova vsebina

Oznaka luknjice	Dodani reagenti v posamezni luknjici
BL (1A)	Prazni vzorec: 100 µl MHB
PC S1 (1B)	Pozitivna kontrola: 50 µl MHB + 50 µl kulture
PC S1 + I ₁ (3A)	50 µl MHB+ 50 µl kulture + 4,17 µl PAβN
PC S1+I ₂ (5A)	50 µl MHB+ 50 µl kulture + 2,04 µl NMP
1R (1x razredčitev)	100 µl ant. (c=512 µg/ml) + 50 µl kulture
2R (2x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=256 µg/ml) + 50 µl kulture
3R (3x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=128 µg/ml) + 50 µl kulture
4R (4x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=64 µg/ml) + 50 µl kulture
5R (5x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=32 µg/ml) + 50 µl kulture
6R (6x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=16 µg/ml) + 50 µl kulture
7R (7x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=8 µg/ml) + 50 µl kulture
8R (8x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=4 µg/ml) + 50 µl kulture
9R (9x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=2 µg/ml) + 50 µl kulture
10R (10x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=1 µg/ml) + 50 µl kulture
11R (11x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=0,5 µg/ml) + 50 µl kulture
12R (12x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=0,250 µg/ml) + 50 µl kulture
13R (13x razredčitev)	50µl raztopine MHB in ant. (c=0,125 µg/ml) + 50 µl kulture
14R (14x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=0,063 µg/ml) + 50 µl kulture

Preglednica 5: Prikaz mikrotitrne plošče po končanem dodajanju reagentov in kulture

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	S1-7R ERI	PC-S1+I₁	S1-8R ERI+I ₁	PC-S1+I₂	S1-8R ERI+I ₂	PC-S1	S1-8R AZI	PC-S1+I₁	S1-8R AZI+I ₁	PC-S1+I₂	S1-8R AZI+I ₂
B	PC-S1	S1-8R ERI	S1-1R ERI+I ₁	S1-9R ERI+I ₁	S1-1R ERI+I ₂	S1-9R ERI+I ₂	S1-1R AZI	S1-9R AZI	S1-1R AZI+I ₁	S1-9R AZI+I ₁	S1-1R AZI+I ₂	S1-9R AZI+I ₂
C	S1-1R ERI	S1-9R ERI	S1-2R ERI+I ₁	S1-10R ERI+I ₁	S1-2R ERI+I ₂	S1-10R ERI+I ₂	S1-2R AZI	S1-10R AZI	S1-2R AZI+I ₁	S1-10R AZI+I ₁	S1-2R AZI+I ₂	S1-10R AZI+I ₂
D	S1-2R ERI	S1-10R ERI	S1-3R ERI+I ₁	S1-11R ERI+I ₁	S1-3R ERI+I ₂	S1-11R ERI+I ₂	S1-3R AZI	S1-11R AZI	S1-3R AZI+I ₁	S1-11R AZI+I ₁	S1-3R AZI+I ₂	S1-11R AZI+I ₂
E	S1-3R ERI	S1-11R ERI	S1-4R ERI+I ₁	S1-12R ERI+I ₁	S1-4R ERI+I ₂	S1-12R ERI+I ₂	S1-4R AZI	S1-12R AZI	S1-4R AZI+I ₁	S1-12R AZI+I ₁	S1-4R AZI+I ₂	S1-12R AZI+I ₂
F	S1-4R ERI	S1-12R ERI	S1-5R ERI+I ₁	S1-13R ERI+I ₁	S1-5R ERI+I ₂	S1-13R ERI+I ₂	S1-5R AZI	S1-13R AZI	S1-5R AZI+I ₁	S1-13R AZI+I ₁	S1-5R AZI+I ₂	S1-13R AZI+I ₂
G	S1-5R ERI	S1-13R ERI	S1-6R ERI+I ₁	S1-14R ERI+I ₁	S1-6R ERI+I ₂	S1-14R ERI+I ₂	S1-6R AZI	S1-14R AZI	S1-6R AZI+I ₁	S1-14R AZI+I ₁	S1-6R AZI+I ₂	S1-14R AZI+I ₂
H	S1-6R ERI	S1-14R ERI	S1-7R ERI+I ₁	/	S1-7R ERI+I ₂	/	S1-7R AZI	/	S1-7R AZI+I ₁	/	S1-7R AZI+I ₂	/

ERI = ERITROMICIN; ERI + I₁ = ERITROMICIN + PAβN; ERI + I₂ = ERITROMICIN + NMP
 AZI = AZITROMICIN; AZI + I₁ = AZITROMICIN + PAβN; AZI + I₂ = AZITROMICIN + NMP
 PC-S1 = POZITIVNA KONTROLA; PC-S1+I₁ = POZITIVNA KONTROLA S PAβN; PC-S1+I₂ = POZITIVNA KONTROLA Z NMP
 BL = BLANK;

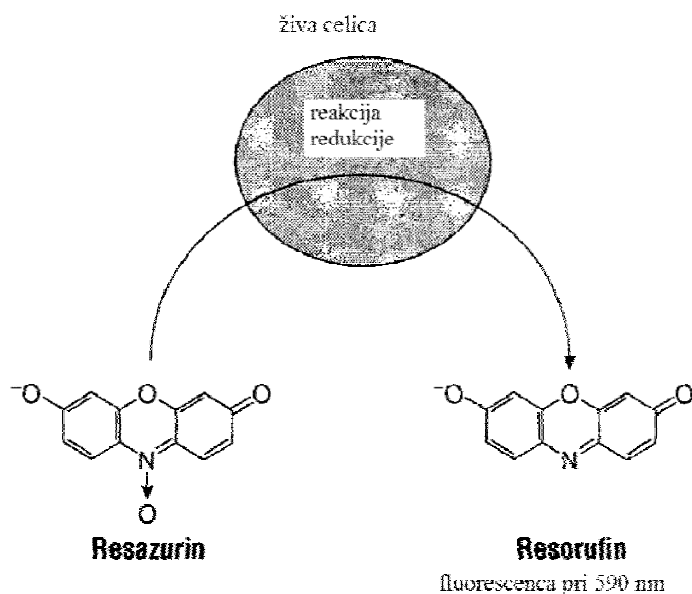
3.3.4.4 Določitev živosti bakterijskih celic

Po končani inkubaciji smo v vse luknjice dodali 15 μl reagenta CellTiter-Blue[®], ki se uporablja za določanje živih celic na mikrotitrskih ploščah (slika 14). Sledila je inkubacija mikrotitrne plošče za 2 uri pri 42 °C v mikroaerofilnih pogojih in v temi.

Reagent CellTiter-Blue[®] vsebuje indikatorsko barvilo resazurin, ki meri metabolično kapaciteto celic- je indikator živosti. Žive celice ohranijo sposobnost redukcije resazurina v resorufin, ki močno fluorescira (slika 13). Nežive celice hitro izgubijo metabolično kapaciteto, ne reducirajo indikatorskega barvila in tako ne proizvajajo fluorescentnega

signala. Količina proizvedene fluorescence je sorazmerna številu živih celic. Linearno območje in nizka meja detekcije sta odvisna od vrste mikroorganizma in njegove sposobnosti redukcije resazurina (Riss in Moravec, 2003).

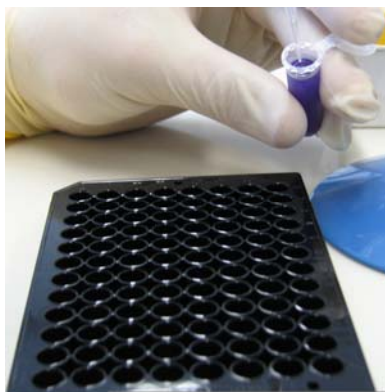
Indikatorsko barvilo resazurin je temno modre barve in ima majhno intrinzično fluorescenco, dokler ni reduciran v resorufin, ki je roza barve in močno fluorescira. Živost se lahko spremlja na osnovi fluorescence ali absorbance (Riss in Moravec, 2003).



Slika 13: Redukcija resazurina (Riss in Moravec, 2003)

Spremembo barve smo opazili brez dodatne opreme (slika 15), fluorescenco pa izmerili s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Safire 2. Uporabili smo naslednje pogoje:

- valovna dolžina vzbujanja: 550 nm
- valovna dolžina merjenja emitirane fluorescence: 595 nm
- razmik med valovnimi dolžinami: 20 nm
- z – pozicija: 7828 μm
- »optimal gain«: 37



Slika 14: Dodajanje barvila CellTiter-Blue® v luknjice na mikrotitrski plošči



Slika 15: Prikaz mikrotitrne plošče po končani analizi. Rdečkasto-roza obarvane luknjice kažejo, da so v njih žive mikrobne celice, saj so bile sposobne reducirati resazurin v resorufin. Nežive mikrobne celice so v luknjicah, ki so temnejše. V teh luknjicah barvilo ostane modre barve. MIC predstavlja zadnjo luknjico v koloni, ki ni spremenila barve. Dodane reagentne in koncentracije antibiotikov prikazujeta preglednici 4 in 5.

Spektrofotometer rezultat izrazi kot relativno fluorescentno enoto (RFU). Te enote smo nato preračunali v % rasti po naslednji formuli:

$$\text{rast (\%)} = \frac{(RFU - \text{praznivzorec})_{\text{vzorec}}}{(RFU - \text{praznivzorec})_{PC - S1}} \times 100$$

RFU... relativna fluorescentna enota

Prazni vzorec... relativna fluorescentna enota gojišča

PC - S1... pozitivna kontrola

To pomeni, da je odstotek rasti, ki je v rezultih tudi grafično prikazan, izražen glede na rast pozitivne kontrole, izmerjene na vsaki merjeni mikrotitrski ploščici.

Učinkovitost inhibitorja (U) in s tem vlogo membranskih črpalk pri odpornosti proti testiranim antibiotikom smo izračunali iz izmerjenih vrednosti MIC.

$$U = \text{MIC}_{\text{brez inhibitorja}} / \text{MIC}_{\text{z inhibitorjem}}$$

Po izračunu učinkovitosti posameznega inhibitorja proti testiranemu makrolidnim antibiotikom smo izračunali povprečni učinek glede na tip odpornosti vsakemu testiranemu antibiotiku in dodanemu inhibitorju. To smo izračunali po naslednji formuli:

$$\bar{U} = \frac{\sum U}{n}$$

\bar{U} ...povprečna učinkovitost za inhibitor glede na tip odpornosti sevov proti izbranemu antibiotiku

U...učinkovitost za vsak izolat in inhibitor glede na tip odpornosti sevov proti izbranemu antibiotiku

n...število izolatov v vsakem razredu glede na tip odpornosti

4 REZULTATI

V eksperimentalni del raziskave smo vključili 20 izolatov, med katerimi je bilo 7 izolatov perutninskega, 4 prašičjega, 5 humanega izvora, 2 sta bila izolirana iz vode in zadnja 2 pa sta bila referenčna vzorca.

Testiranje bakterijske občutljivosti je potekalo s 5 makrolidnimi antibiotiki (eritromicin, azitromicin, klaritromicin, diritromicin in tilozin) v enakih koncentracijskih območjih (od 512 µg/ml do 0,063 µg/ml).

Za ugotavljanje bakterijske občutljivosti smo uporabili mikrodilucijsko metodo v bujonu, pri kateri smo določali minimalno inhibitorno koncentracijo določenega antibiotika- MIC in je veljala tudi kot merilo za občutljivost bakterij na preiskovane antibiotike. MIC je tista koncentracija antibiotika, ki še inhibira rast bakterij in smo ga MIC določali grafično.

Skladno s hipotezami diplomske naloge smo določali tudi MIC makrolidnih antibiotikov pri izbranih izolatih *Campylobacter* v prisotnosti oz. odsotnosti subinhibitornih koncentracij inhibitorja membranskih izlivnih črpalk fenilalanilarginin-β-naftilamida (PAβN) in 1-(1-naftilmetil)-piperazina (NMP). Inhibitor membranskih izlivnih črpalk naj bi povečal občutljivost mikroorganizma za določen antibiotik.

Bakterijsko odpornost na posamezen antibiotik smo določali z vrednostjo MIC posameznih izolatov brez dodatka inhibitorja PAβN in z njegovim dodatkom. Naloga inhibitorja je, da onemogoča izhajanje antibiotika iz celic in tako pripomore k njegovemu večjemu učinku. Razmerje obeh vrednosti MIC je prikazalo učinek inhibitorja membranskih izlivnih črpalk na povečevanje občutljivosti določenega izolata na posamezen antibiotik. Enako je veljalo tudi za inhibitor NMP.

Rezultati določanja MIC so prikazani grafično, in sicer je prikazan procent rasti glede na pozitivno kontrolo na isti ploščici. Rezultati so bili zbrani na enak način za vseh 20 testiranih izolatov, za grafično predstavitev določanja MIC pa smo izbrali odporne izolate ob upoštevanju enakih mejnih vrednosti kot pri eritromicinu. Na osnovi predhodne določitve koncentracije celic na ploščicah po razredčitvah je bilo na 2-kratni vrednosti rezultata praznega vzorca, to je relativna fluorescentna vrednost gojišča, 10^4 - 10^5 živih celic, zato smo zadnjo razredčitev na ploščici pred to vrednostjo vzeli za MIC. Vse vrednosti MIC so zbrane tudi v zbirnih preglednicah za posamezen antibiotik, in sicer izmerjeno brez in z dodatkom inhibitorja PAβN in NMP.

4.1 ODPORNOST BAKTERIJ *Campylobacter* NA MAKROLIDNE ANTIBIOTIKE

V študijo smo vključili 18 izolatov rodu *Campylobacter* različnega izvora in 2 referenčna seva, pri katerih smo določali odpornost. Odpornost smo določali s 5 makrolidnimi antibiotiki (eritromicin, azitromicin, klaritromicin, diritromicin in tilozin). Vsi dobljeni rezultati (MIC) so predstavljeni v zbirni preglednici 6 in 7.

Preglednica 6: Zbirna preglednica odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* na eritromicin, azitromicin in klaritromicin

IZOLAT			TESTIRANI MAKROLIDNI ANTIBIOTIKI		
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC ERITROMICINA (µg/ml)	MIC AZITROMICINA (µg/ml)	MIC KLARITROMICINA (µg/ml)
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	32	0,250
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	4	128
FC 10	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	0,125	4
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	>512	512	128
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	512	256
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	512	256
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	>512	256
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	512	0,063	1
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	8	16	2
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	8	<0,063	1
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	512	256	512
10162	<i>C. spp</i>	Humani	8	<0,063	<0,063
10522	<i>C. spp</i>	Humani	16	<0,063	64
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	32	0,125	32
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	64	512	128
2235	<i>C. coli</i>	Humani	512	512	256
809	<i>C. coli</i>	Voda	512	16	512
803	<i>C. coli</i>	Voda	512	8	64
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	1	<0,063	1
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	2	0,125	<0,063

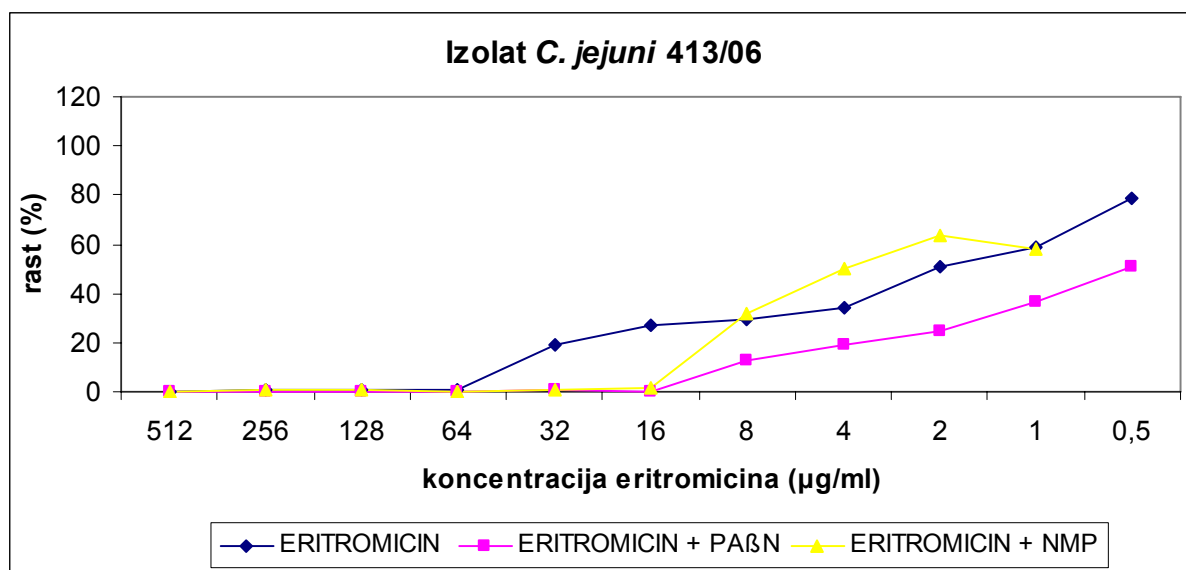
Preglednica 7: Zbirna preglednica odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* na diritromicin in tilozin

IZOLAT			TESTIRANI MAKROLIDNI ANTIBIOTIKI	
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC DIRITROMICINA (µg/ml)	MIC TILOZINA (µg/ml)
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	0,5	4
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	32	8
FC 10	<i>C. coli</i>	Perutnina	0,5	4
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	512
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	128	512
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	512
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	128	>512
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	0,5	2
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	1	512
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	0,5	2
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	32	512
10162	<i>C. spp</i>	Humani	32	512
10522	<i>C. spp</i>	Humani	0,125	1
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	0,250	128
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	0,5	16
2235	<i>C. coli</i>	Humani	0,250	512
809	<i>C. coli</i>	Voda	>512	512
803	<i>C. coli</i>	Voda	64	1
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	0,250	1
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	0,5	2

4.2 ODPORNOST BAKTERIJ *Campylobacter* NA MAKROLIDNE ANTIBIOTIKE BREZ IN Z DODATKOM INHIBITORJEV

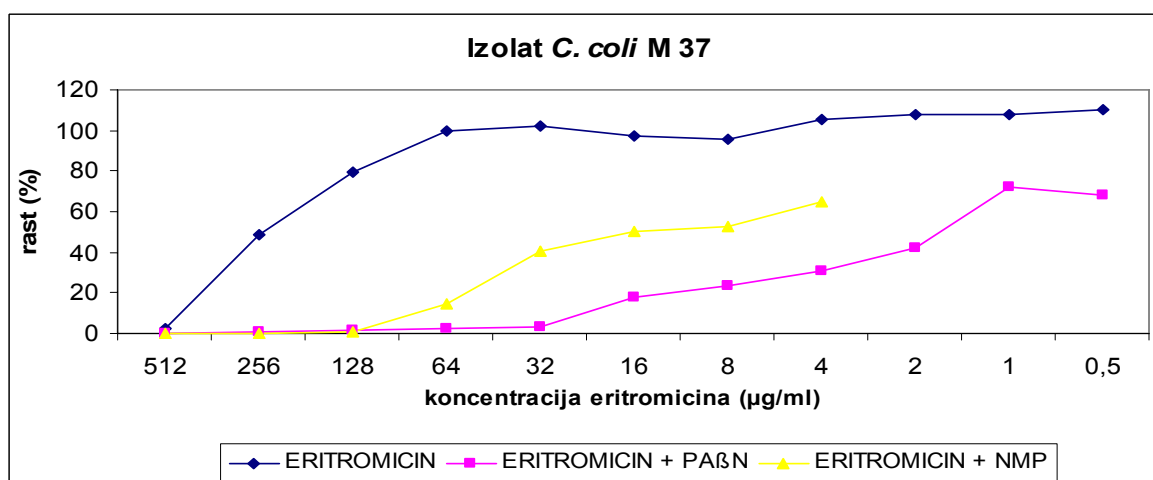
4.2.1 Eritromicin

Izolat *C. jejuni* 413/06 je odporen na eritromicin, saj je njegova vrednost MIC 64 µg/ml. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal vrednost MIC za eritromicin na 16 µg/ml (slika 16).



Slika 16: Grafičnega določanje vrednosti MIC za eritromicin pri izolatu *C. jejuni* 413/06

Izolat *C. coli* M 37 je zelo odporen na eritromicin, saj je njegova vrednost MIC 512 µg/ml (slika 17). Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal vrednost MIC za eritromicin na 128 µg/ml pri dodatku NMP oz. na 32 µg/ml pri dodatku PAβN, kar kaže na večjo učinkovitost inhibitorja PAβN v primerjavi z inhibitorjem NMP.



Slika 17: Grafično določanje vrednosti MIC za eritromicin pri izolatu *C. coli* M 37

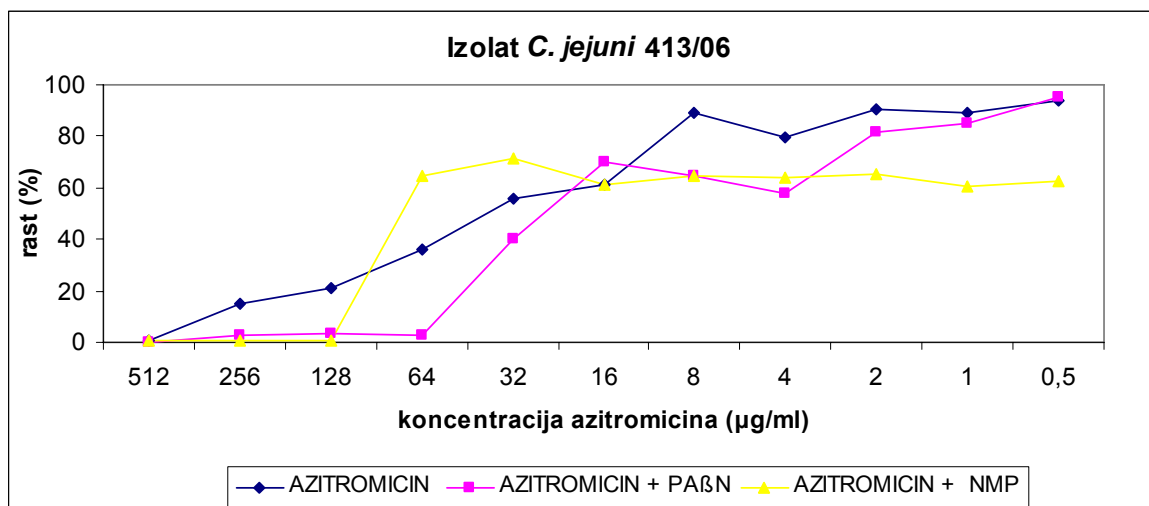
V študijo smo vključili 18 odpornih izolatov rodu *Campylobacter* različnega izvora na eritromicin in 2 referenčna seva. Od tega je bilo 11 izolatov tipa HLR, 7 tipa LLR, nobenega pa občutljivega. Vrednosti MIC za eritromicin v odsotnosti inhibitorja so se nahajale v območju od 512 µg/ml do 4 µg/ml. Spremljali smo bakterijsko odpornost na eritromicin ob dodatku dveh inhibitorjev izlivnih membranskih črpalk, PAβN in NMP. Vrednost MIC eritromicina z dodatkom enega od inhibitorjev za posamezen izolat se je zmanjšala v primerjavi z vrednostjo MIC eritromicina v odsotnosti inhibitorja pri vseh testiranih izolatih. Vsi dobljeni rezultati so predstavljeni v zbirni preglednici 8.

Preglednica 8: Zbirna preglednica odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* na eritromicin v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN in NMP

Izolat			ERITROMICIN		
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC (µg/ml)	MIC + PAβN (µg/ml)	MIC + NMP (µg/ml)
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	<0,063	1
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	0,125	0,5
FC 10	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	0,063	0,5
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	>512	32	128
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	32	128
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	32	128
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	32	128
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	512	32	< 4
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	8	0,125	0,125
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	8	0,063	0,250
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	512	32	32
10162	<i>C. spp</i>	Humani	8	0,063	8
10522	<i>C. spp</i>	Humani	16	4	16
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	32	4	8
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	64	16	16
2235	<i>C. coli</i>	Humani	512	16	16
809	<i>C. coli</i>	Voda	512	8	32
803	<i>C. coli</i>	Voda	512	32	<2
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	1	0,250	1
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	2	0,063	0,063

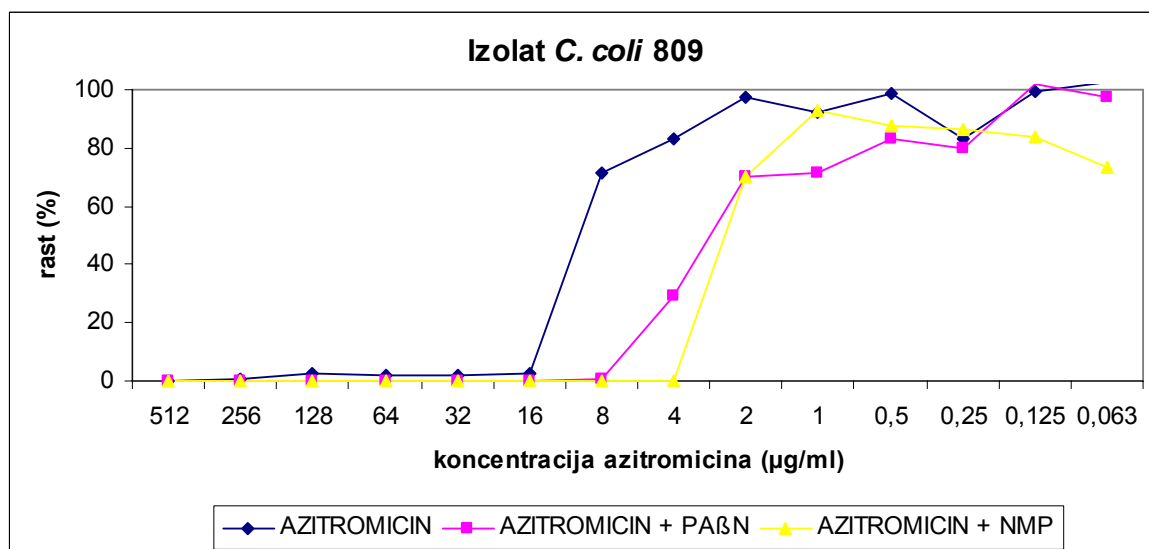
4.2.2 Azitromicin

Izolat *C. jejuni* 413/06 je zelo odporen na azitromicin, saj je njegova vrednost MIC >512 µg/ml. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal MIC za azitromicin na 128 µg/ml pri dodatku NMP oz. na 64 µg/ml pri dodatku PAβN (slika 18).



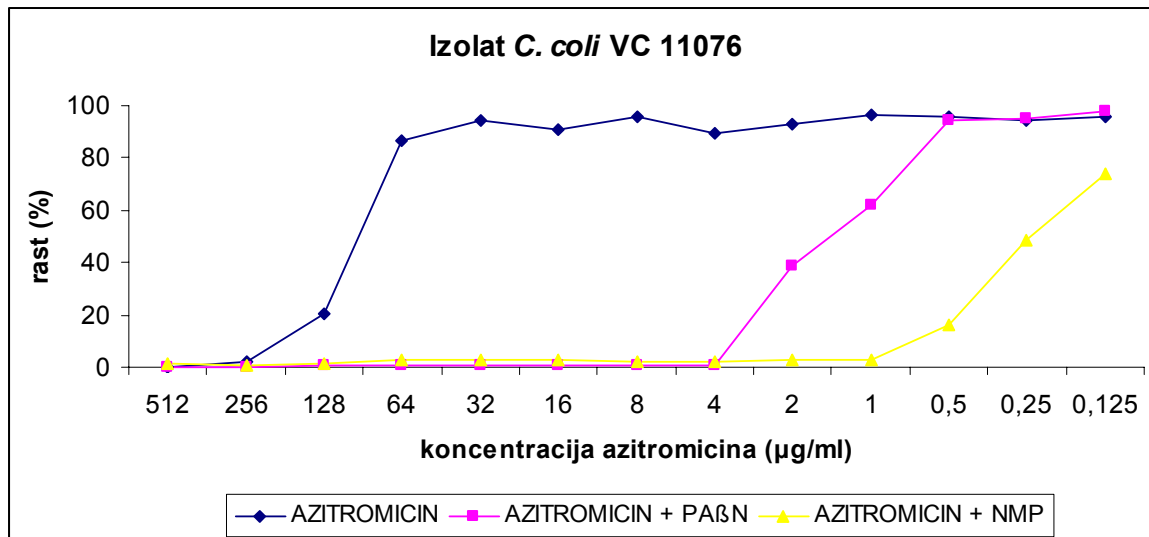
Slika 18: Grafično določanje vrednosti MIC za azitromicin pri izolat *C. jejuni* 413/06

Izolat *C. coli* 809 je odporen na azitromicin, saj je njegova MIC 16 µg/ml. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal MIC za azitromicin na 4 µg/ml pri dodatku NMP oz. na 8 µg/ml pri dodatku PAβN (slika 19).



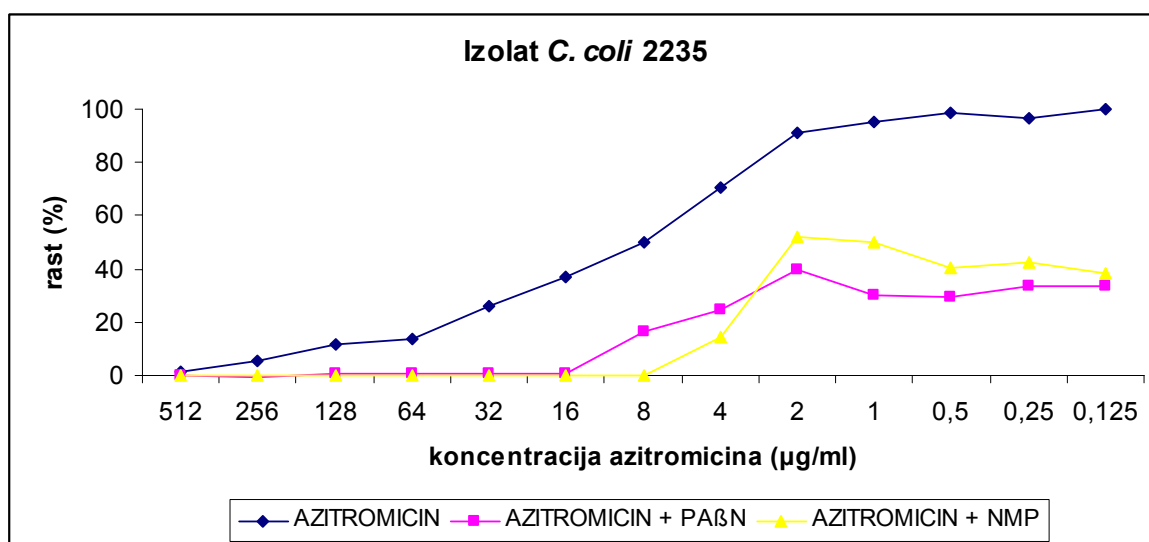
Slika 19: Grafično določanje vrednosti MIC za azitromicin pri izolat *C. coli* 809

Izolat *C. coli* VC 11076 je odporen na azitromicin, saj je njegova MIC 256 µg/ml. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal MIC za azitromicin na 1 µg/ml pri dodatku NMP oz. na 4 µg/ml pri dodatku PAβN (slika 20).



Slika 20: Grafično določanje vrednosti MIC za azitromicin pri izolatu *C. coli* VC 11076

Izolat *C. coli* 2235 je odporen na azitromicin, saj je njegova MIC 512 µg/ml. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal MIC za azitromicin na 8 µg/ml pri dodatku NMP oz. na 16 µg/ml pri dodatku PAβN (slika 21).



Slika 21: Grafično določanje vrednosti MIC za azitromicin pri ozolatu *C. coli* 2235

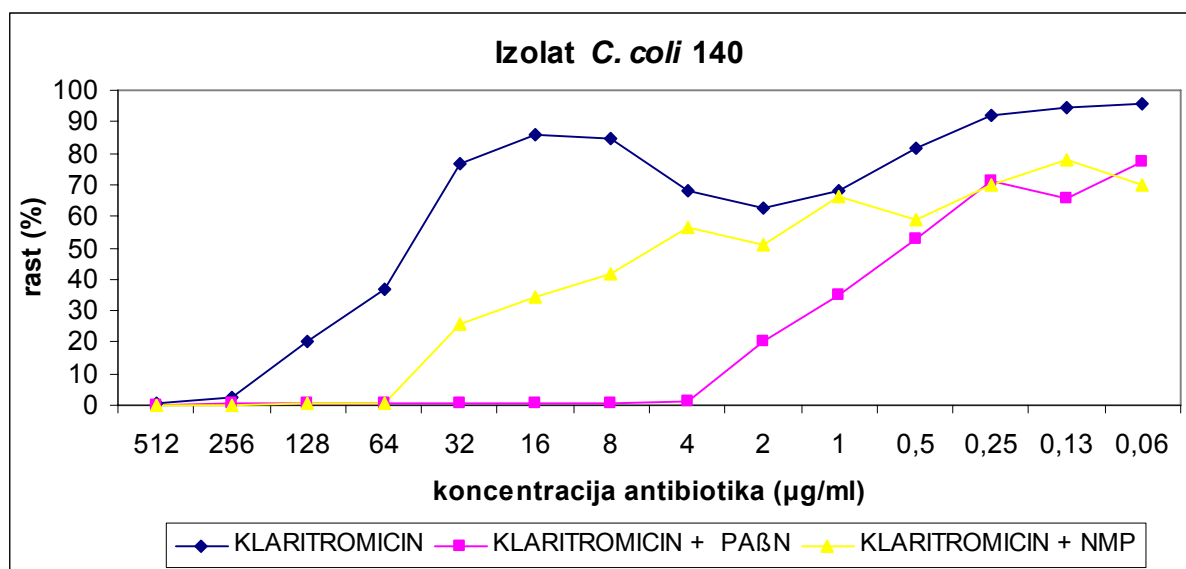
V študijo smo vključili 18 izolatov rodu *Campylobacter* iz mesa, vode in humanih kliničnih izolatov in 2 referenčna seva, pri katerih smo spremljali bakterijsko odpornost na azitromicin. Če smo za azitromicin uporabili enake mejne vrednosti kot za eritromicin, je bilo med 18 izolati 8 izolatov tipa HLR, 6 tipa LLR, ostali so bili občutljivi. Vrednosti MIC za azitromicin v odsotnosti inhibitorja so bile v območju od 512 µg/ml do 0,063 µg/ml. Po dodatku enega od inhibitorjev se je večini izolatov odpornost zmanjšala, razen pri dodatku NMP izolat u GC 154. Vsi dobljeni rezultati so predstavljeni v zbirni preglednici 9.

Preglednica 9: Zbirna preglednica odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* na azitromicin v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN in NMP

Izolat			AZITROMICIN		
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC (µg/ml)	MIC + PAβN (µg/ml)	MIC + NMP (µg/ml)
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	32	16	32
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	1	0,250
FC 10	<i>C. coli</i>	Perutnina	0,125	<0,063	<0,063
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	16	1
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	8	1
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	2	0,5
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	>512	8	256
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	0,063	<0,063	<0,063
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	16	4	<0,063
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	<0,063	<0,063	<0,063
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	256	4	1
10162	<i>C. spp</i>	Humani	<0,063	<0,063	<0,063
10522	<i>C. spp</i>	Humani	<0,063	<0,063	<0,063
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	0,125	<0,063	<0,063
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	512	64	128
2235	<i>C. coli</i>	Humani	512	16	8
809	<i>C. coli</i>	Voda	16	8	4
803	<i>C. coli</i>	Voda	8	2	4
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	<0,063	<0,063	<0,063
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	0,125	<0,063	<0,063

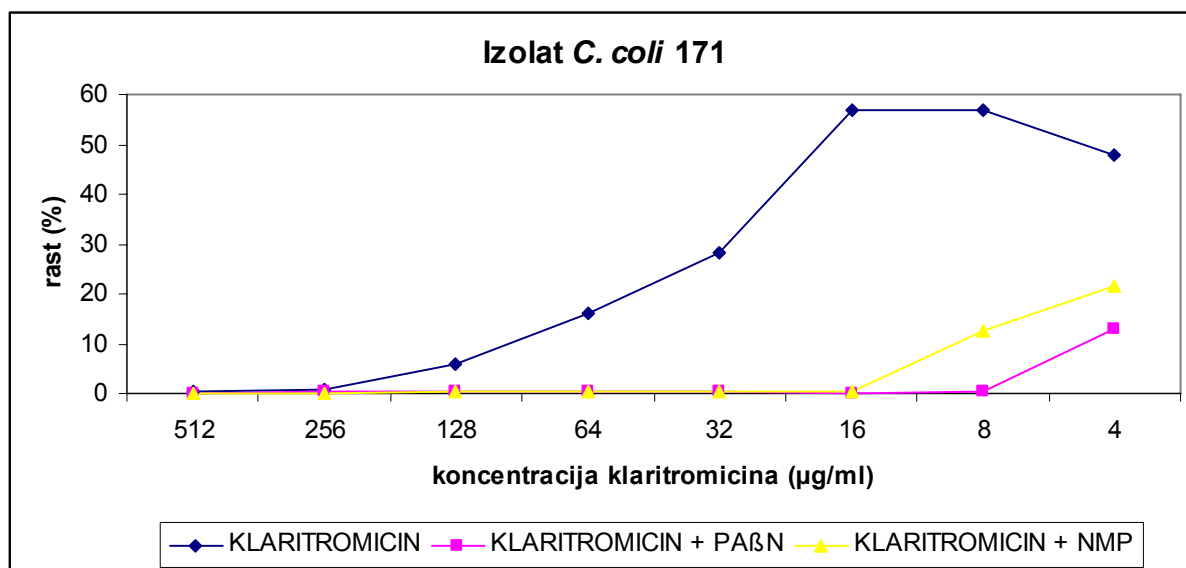
4.2.3 Klaritromicin

Izolat *C. coli* 140 je zelo odporen na klaritromicin, saj je njegova vrednost MIC 256 µg/ml. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal MIC za klaritromicin na 64 µg/ml pri dodatku NMP oz. na 4 µg/ml pri dodatku PAβN, kar kaže na večjo učinkovitost inhibitorja PAβN v primerjavi z inhibitorjem NMP (slika 22).



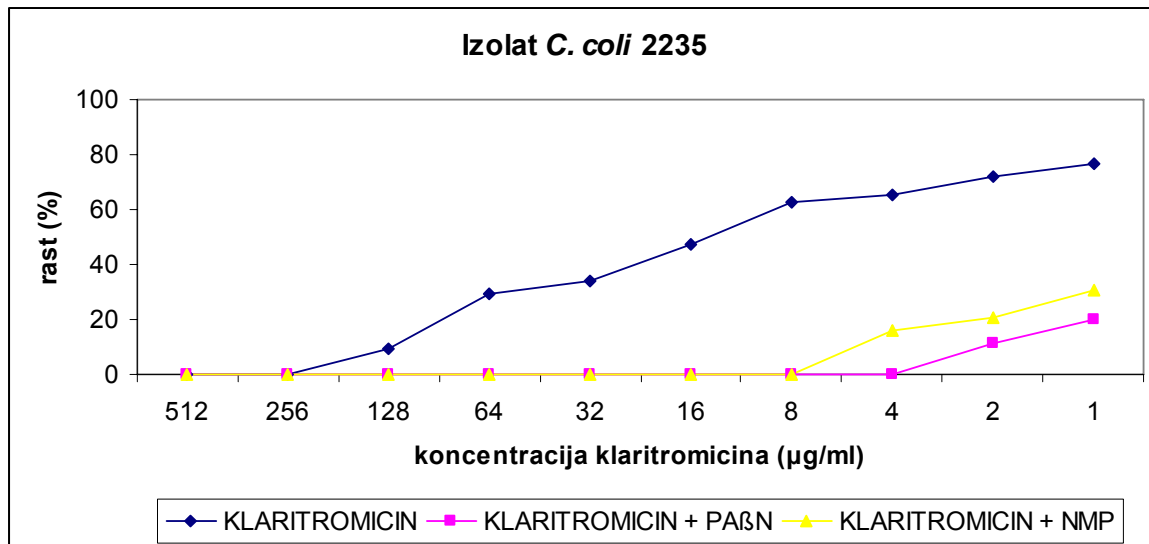
Slika 22: Grafično določanje vrednosti MIC za klaritromicin pri izolatu *C. coli* 140

Izolat *C. coli* 171 je zelo odporen na klaritromicin, saj je njegova vrednost MIC 256 µg/ml. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal vrednost MIC za klaritromicin na 16 µg/ml pri dodatku NMP oz. na 8 µg/ml pri dodatku PAβN (slika 23).



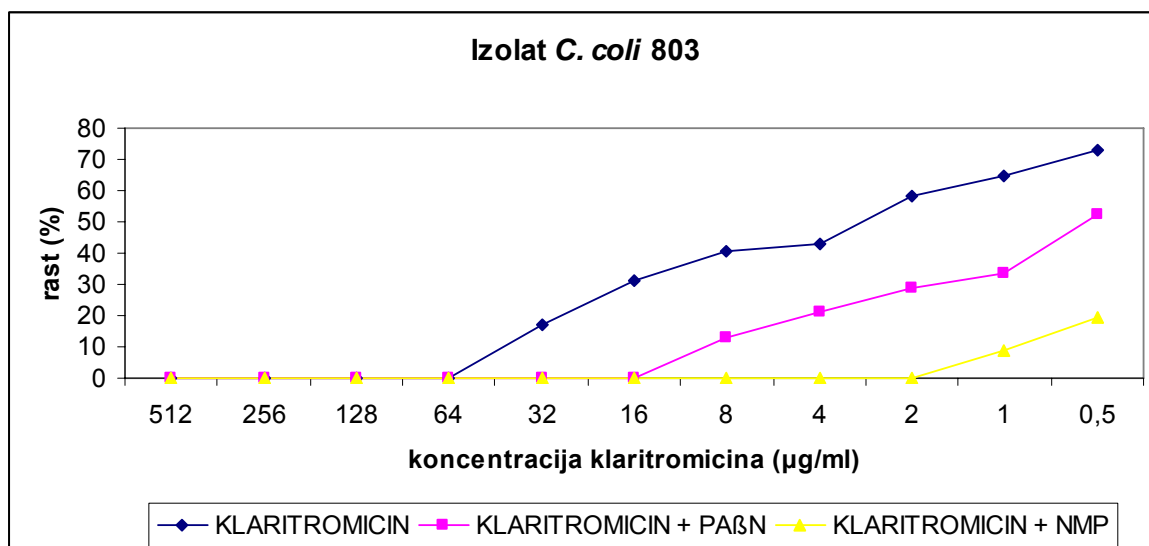
Slika 23: Grafično določanje vrednosti MIC za klaritromicin pri izolatu *C. coli* 171

Izolat *C. coli* 2235 je zelo odporen na klaritromicin, saj je njegova vrednost MIC 256 $\mu\text{g/ml}$. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal vrednost MIC za klaritromicin na 8 $\mu\text{g/ml}$ pri dodatku NMP oz. na 4 $\mu\text{g/ml}$ pri dodatku PA β N (slika 24).



Slika 24: Grafično določanje vrednosti MIC za klaritromicin pri izolatu *C. coli* 2235

Izolat *C. coli* 803 je odporen na klaritromicin, saj je njegova vrednost MIC 64 $\mu\text{g/ml}$. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal vrednost MIC za klaritromicin na 2 $\mu\text{g/ml}$ pri dodatku NMP oz. na 16 $\mu\text{g/ml}$ pri dodatku PA β N, kar kaže na večjo učinkovitost inhibitorja NMP v primerjavi z inhibitorjem NMP (slika 25).



Slika 25: Grafično določanje vrednosti MIC za klaritromicin pri izolatu *C. coli* 803

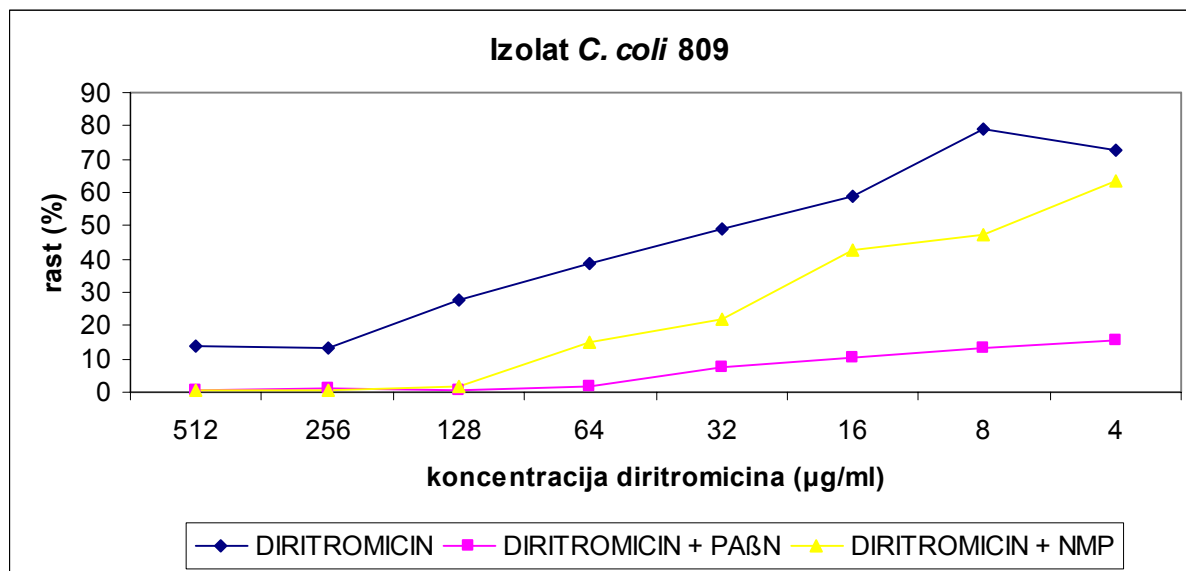
V študijo smo vključili 18 izolatov rodu *Campylobacter* različnega izvora in 2 referenčna seva, pri katerih smo spremljali bakterijsko odpornost na klaritromicin. Med 18 izolati je bilo 13 sevov odpornih, 5 pa občutljivih za klaritromicin, če smo upoštevali enake mejne vrednosti kot pri eritromicinu. Med 13 odpornimi izolati je bilo 12 izolatov tipa HLR, 1 pa tipa LLR. Vrednost MIC za klaritromicin v odsotnosti inhibitorja so se nahajale v območju od 512 µg/ml do 0,063 µg/ml. Po dodatku posameznega inhibitorja se je odpornost izolatom znižala. Vsi dobljeni rezultati so predstavljeni v zbirni preglednici 10.

Preglednica 10: Zbirna preglednica odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* na klaritromicin v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN in NMP

Izolat			KLARITROMICIN		
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC (µg/ml)	MIC + PAβN (µg/ml)	MIC + NMP (µg/ml)
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	0,250	<0,063	<0,063
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	128	2	16
FC 10	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	0,250	1
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	128	4	8
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	256	8	16
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	256	4	64
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	256	<4	128
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	1	<0,063	<0,063
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	2	<0,063	<0,063
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	1	<0,063	<0,063
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	512	4	16
10162	<i>C. spp</i>	Humani	<0,063	<0,063	<0,063
10522	<i>C. spp</i>	Humani	64	<1	4
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	32	4	8
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	128	<1	<1
2235	<i>C. coli</i>	Humani	256	4	8
809	<i>C. coli</i>	Voda	512	32	<4
803	<i>C. coli</i>	Voda	64	16	2
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	1	<0,063	<0,063
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	<0,063	<0,063	<0,063

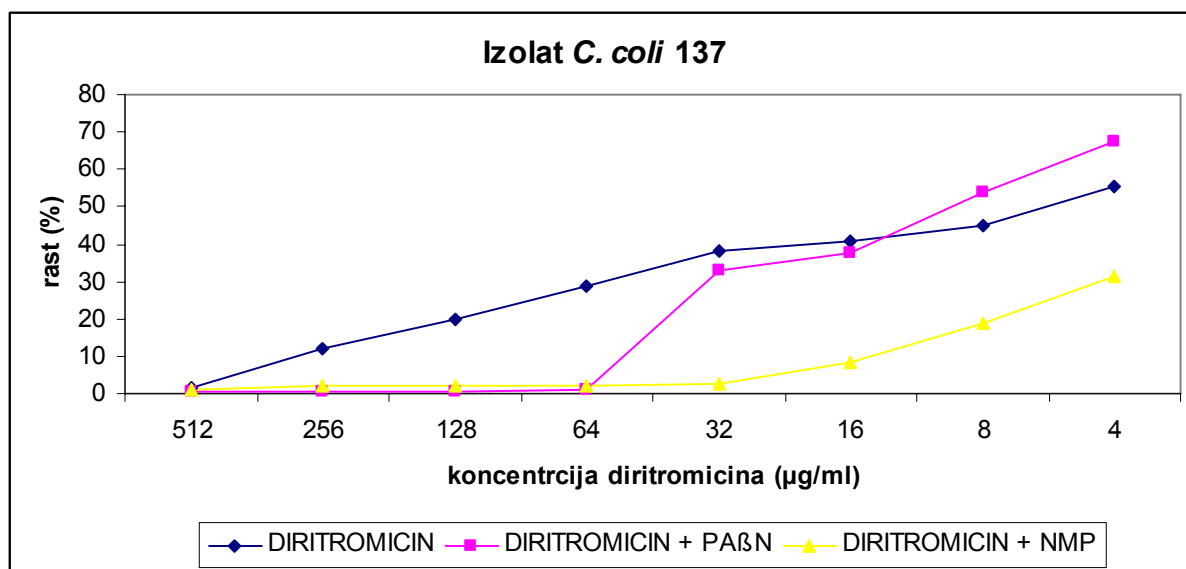
4.2.4 Diritromicin

Izolat *C. coli* 809 je zelo odporen na diritromicin, saj je njegova vrednost MIC večja od 512 µg/ml. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal vrednost MIC za diritromicin na 128 µg/ml pri dodatku NMP oz. na 64 µg/ml pri dodatku PAβN (slika 26).



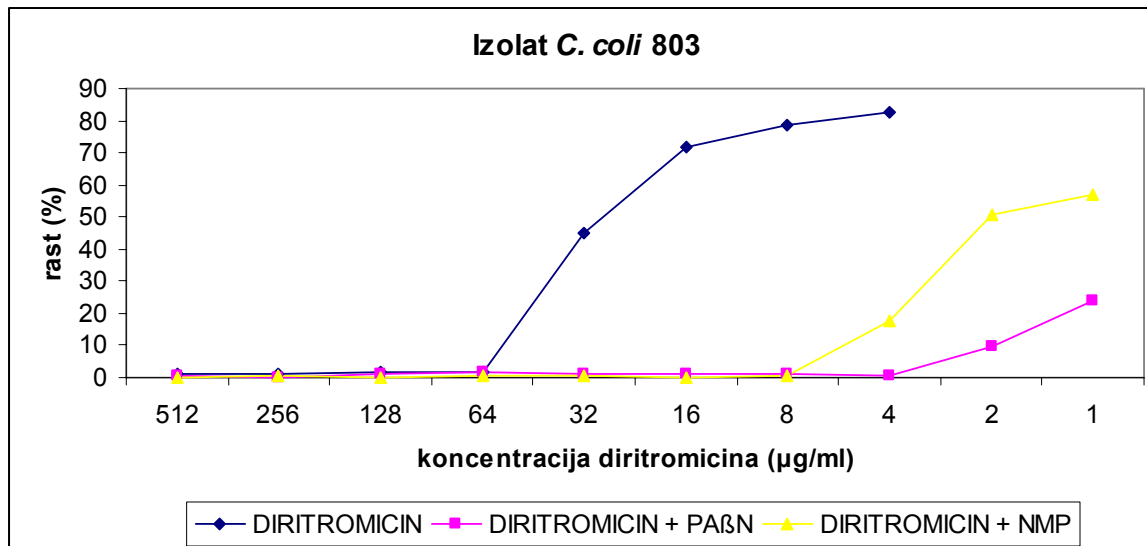
Slika 26: Grafično določanje vrednosti MIC za diritromicin pri izolatu *C. coli* 809

Izolat *C. coli* 137 je zelo odporen na diritromicin, saj je njegova vrednost MIC 512 µg/ml. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal vrednost MIC za diritromicin na 32 µg/ml pri dodatku NMP oz. na 64 µg/ml pri dodatku PABN (slika 27).



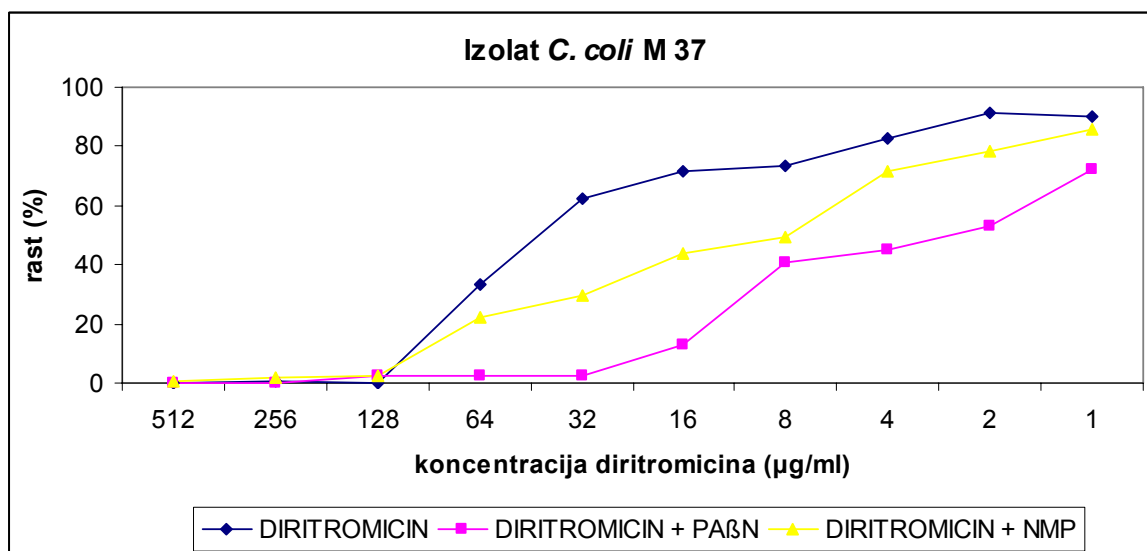
Slika 27: Grafično določanje vrednosti MIC za diritromicin pri izolatu *C. coli* 137

Izolat *C. coli* 803 je odporen na diritromicin, saj je njegova vrednost MIC 64 $\mu\text{g/ml}$. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal vrednost MIC za diritromicin na 8 $\mu\text{g/ml}$ pri dodatku NMP oz. na 4 $\mu\text{g/ml}$ pri dodatku PA β N (slika 28).



Slika 28: Grafično določanje vrednosti MIC za diritromicin pri izolatu *C. coli* 803

Izolat *C. coli* M 37 je odporen na diritromicin, saj je njegova vrednost MIC 128 $\mu\text{g/ml}$. Dodatek inhibitorja PA β N je zmanjšal vrednost MIC za diritromicin na 32 $\mu\text{g/ml}$. Dodatek inhibitorja NMP ni imel učinka na spremembo odpornosti (slika 29).



Slika 29: Grafično določanje vrednosti MIC za diritromicin pri izolatu *C. coli* M 37

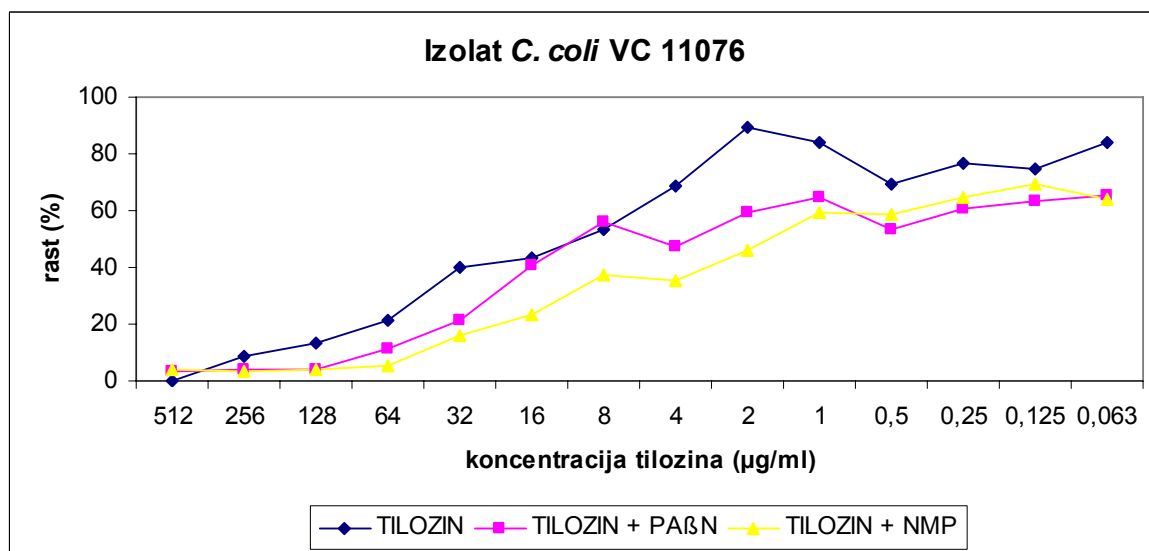
V študijo smo vključili 18 izolatov rodu *Campylobacter* različnega izvora in 2 referenčna seva, pri katerih smo spremljali bakterijsko odpornost na diritromicin. Med 18 izolati je bilo 9 sevov odpornih, 9 pa občutljivih, če smo upoštevali enake mejne vrednosti kot pri eritromicinu. Med 9 odpornimi izolati je bilo vseh 9 tipa HLR. Vrednost MIC za diritromicin v odsotnosti inhibitorja so se nahajale v območju od 512 µg/ml do 0,063 µg/ml. Po dodatku posameznega inhibitorja se je odpornost izolatov zmanjšala, razen sevu M 37 se ob dodatku NMP odpornost ni spremenila. Vsi dobljeni rezultati so predstavljeni v zbirni preglednici 11.

Preglednica 11: Zbirna preglednica odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* na diritromicin v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN in NMP

Izolat			DIRITROMICIN		
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC (µg/ml)	MIC + PAβN (µg/ml)	MIC + NMP (µg/ml)
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	0,5	<0,063	<0,063
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	32	8	4
FC 10	<i>C. coli</i>	Perutnina	0,5	<0,063	<0,063
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	64	32
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	128	32	8
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	64	<4
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	128	32	128
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	0,5	<0,063	<0,063
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	1	<0,063	<0,063
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	0,5	<0,063	<0,063
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	32	4	8
10162	<i>C. spp</i>	Humani	32	4	4
10522	<i>C. spp</i>	Humani	0,125	<0,063	<0,063
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	0,250	<0,063	<0,063
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	0,5	<0,063	<0,063
2235	<i>C. coli</i>	Humani	0,250	<0,063	<0,063
809	<i>C. coli</i>	Voda	>512	64	128
803	<i>C. coli</i>	Voda	64	4	8
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	0,250	<0,063	<0,063
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	0,5	<0,063	<0,063

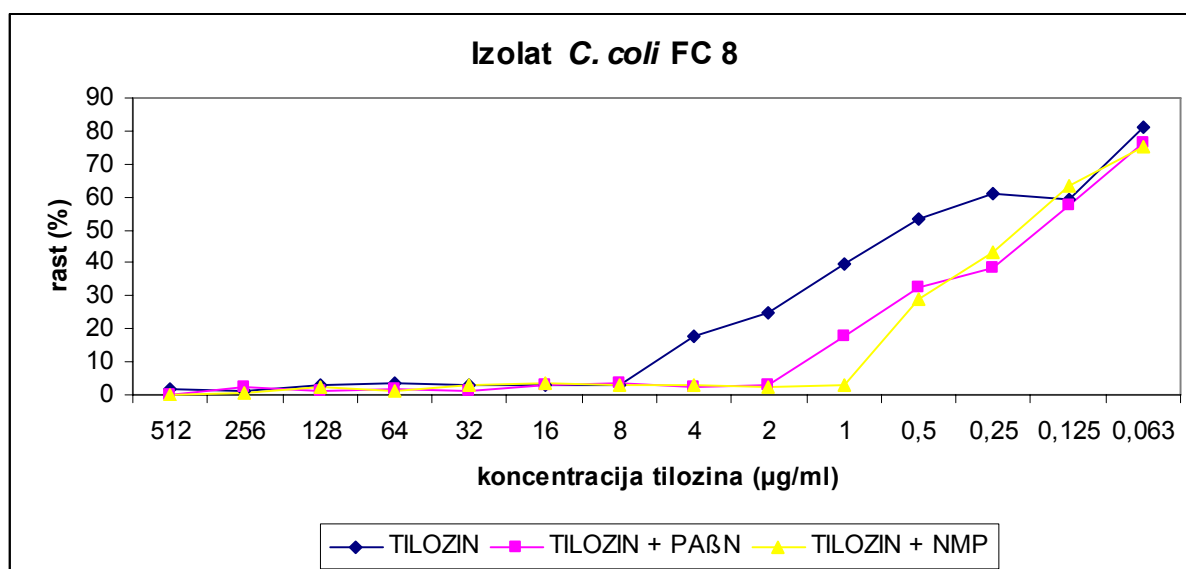
4.2.5 Tilozin

Izolat *C. coli* VC 11076 je zelo odporen na tilozin, saj je njegova vrednost MIC 512 µg/ml. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal vrednost MIC za tilozin na 64 µg/ml pri dodatku NMP oz. na 128 µg/ml pri dodatku PAβN (slika 30).



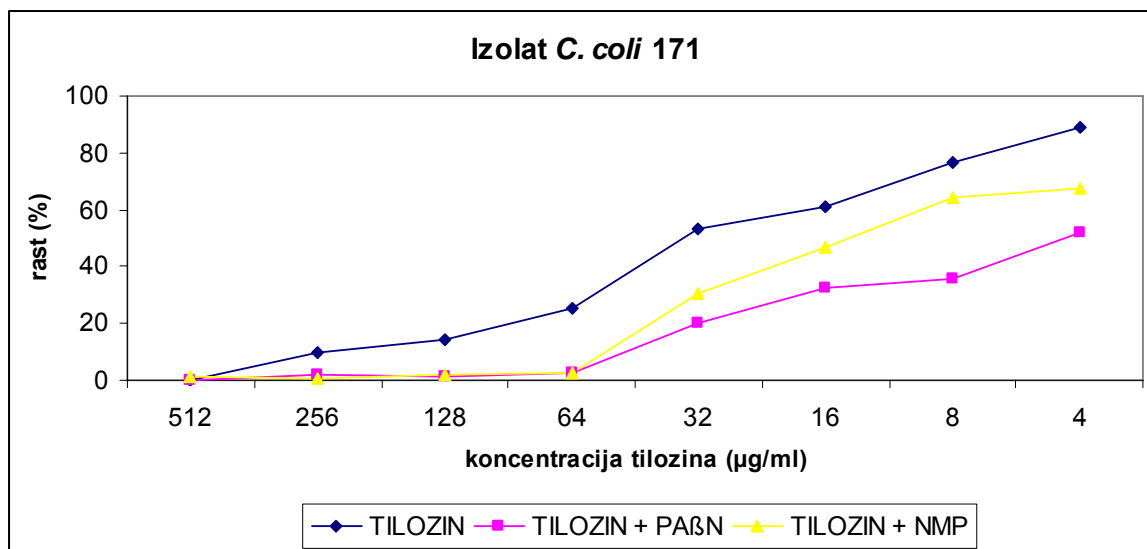
Slika 30: Grafično določanje vrednosti MIC za tilozin pri izolatu *C. coli* VC 11076

Izolat *C. coli* FC 8 je odporen na tilozin, saj je njegova vrednost MIC 8 µg/ml. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal vrednost MIC za tilozin na 1 µg/ml pri dodatku NMP oz. na 2 µg/ml pri dodatku PAβN (slika 31).



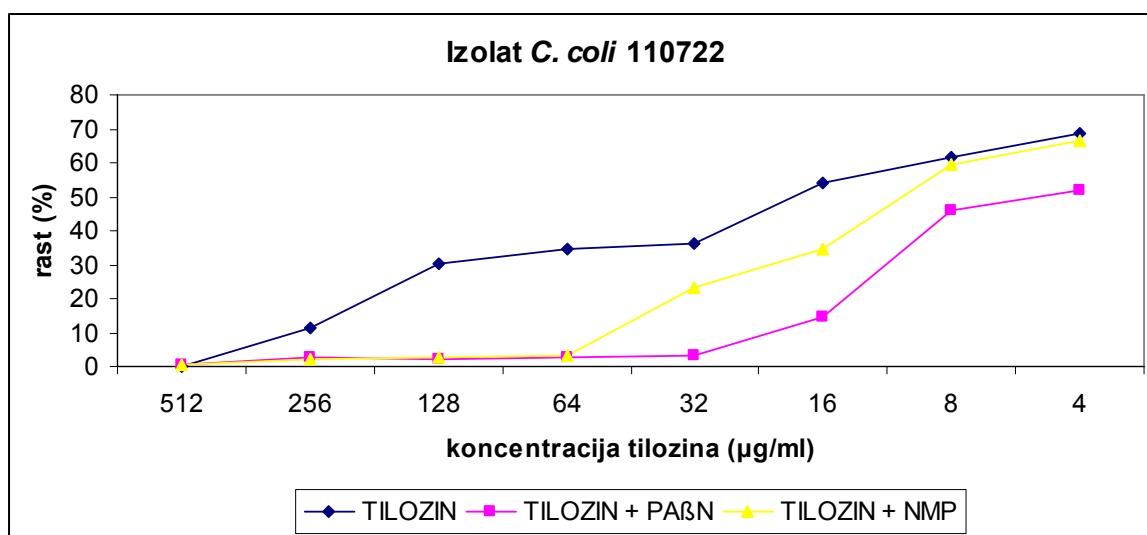
Slika 31: Grafično določanje vrednosti MIC za tilozin pri izolatu *C. coli* FC 8

Izolot *C.coli* 171 je odporen na tilozin, saj je njegova vrednost MIC 512 $\mu\text{g/ml}$. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal vrednost MIC za tilozin na 64 $\mu\text{g/ml}$ pri dodatku obeh inhibitorjev (slika 32).



Slika 32: Grafično določanje vrednosti MIC za tilozin pri izolatu *C. coli* 171

Izolot *C. coli* VC 110722 je odporen na tilozin, saj je njegova vrednost MIC 512 $\mu\text{g/ml}$. Dodatek obeh posameznih inhibitorjev je zmanjšal vrednost MIC za tilozin na 64 $\mu\text{g/ml}$ pri dodatku NMP oz. na 32 $\mu\text{g/ml}$ pri dodatku PA β N (slika 33).



Slika 33: Grafično določanje vrednosti MIC za tilozin pri izolatu *C. coli* VC 110722

V študijo smo vključili 18 izolatov rodu *Campylobacter* iz mesa, vode in kliničnih vzorcev in 2 referenčna vzorca, pri katerih smo spremljali bakterijsko odpornost na tilozin. Ob upoštevanju enakih mejnih vrednosti kot pri eritromicinu je bilo med 18 izolati 14 odpornih izolatov, 4 pa so bili občutljivi. Med odpornimi je bilo 10 izolatov tipa HLR, 4 pa tipa LLR. Vrednosti MIC tilozina v odsotnosti inhibitorja so bile v območju od 512 µg/ml do 0,063 µg/ml. Po dodatku posameznega inhibitorja se je odpornost izolatov zmanjšala. Vsi dobljeni rezultati so predstavljeni v zbirni preglednici 12.

Preglednica 12: Zbirna preglednica odpornosti bakterij rodu *Campylobacter* na tilozin v prisotnosti oz. odsotnosti inhibitorjev PAβN in NMP

Izolat			TILOZIN		
Oznaka	Vrsta	Izvor	MIC (µg/ml)	MIC + PAβN (µg/ml)	MIC + NMP (µg/ml)
GC 154	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	2	2
FC 8	<i>C. coli</i>	Perutnina	8	2	1
FC 10	<i>C. coli</i>	Perutnina	4	2	0,5
137	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	32	32
171	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	64	64
140	<i>C. coli</i>	Perutnina	512	128	32
M 37	<i>C. coli</i>	Perutnina	>512	64	32
VC 7114	<i>C. coli</i>	Svinjina	2	<0,063	<0,063
VC 110722	<i>C. coli</i>	Svinjina	512	32	64
VC 110725	<i>C. coli</i>	Svinjina	2	<0,063	<0,063
VC 11076	<i>C. coli</i>	Svinjina	512	128	64
10162	<i>C. spp</i>	Humani	512	32	32
10522	<i>C. spp</i>	Humani	1	<0,063	<0,063
119/06	<i>C. coli</i>	Humani	128	64	64
413/06	<i>C. jejuni</i>	Humani	16	8	4
2235	<i>C. coli</i>	Humani	512	256	128
809	<i>C. coli</i>	Voda	512	32	16
803	<i>C. coli</i>	Voda	1	<0,063	<0,063
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Živalski iztrebki	1	<0,063	<0,063
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Živalski iztrebki	2	<0,063	<0,063

4.3 RELATIVNA UČINKOVITOST INHIBITORJEV PAßN IN NMP NA ZMANJŠANJE ODPORNOSTI PROTI MAKROLIDNIM ANTIBIOTIKOM

Vsem 18 izolatom smo izračunali relativno učinkovitost inhibitorjev PAßN in NMP na zmanjšanje odpornosti proti makrolidnim antibiotikom. V preglednicah 13 in 14 smo vsakemu izolatu za vsak testiran antibiotik pripisali tip odpornosti na določen antibiotik. Za vsak izolat in antibiotik posebej so v zbirni preglednici 13 in 14 predstavljeni učinki in tipi glede na odpornost na eritromicin.

Preglednica 13: Tip seva glede na odpornost na določen antibiotik in prikaz relativne učinkovitosti (U) inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk na zmanjšano odpornost na eritromicin, azitromicin in klaritromicin

Izolat	ERITROMICIN			AZITROMICIN			KLARITROMICIN		
	TIP	U _{PAßN}	U _{NMP}	TIP	U _{PAßN}	U _{NMP}	TIP	U _{PABN}	U _{NMP}
GC 154	LLR	≥64	4	HLR	2	1	S	≥4	≥4
FC 8	LLR	32	8	LLR	4	16	HLR	64	8
FC 10	LLR	64	8	S	≥2	≥2	LLR	16	4
137	HLR	≥16	≥4	HLR	32	512	HLR	32	16
171	HLR	16	4	HLR	64	512	HLR	32	16
140	HLR	16	4	HLR	256	1024	HLR	64	4
M 37	HLR	16	4	HLR	≥64	≥2	HLR	≥64	2
VC 7114	HLR	16	≥128	S	≥1	≥1	S	≥16	≥16
VC110722	LLR	64	64	LLR	4	≥64	S	≥32	≥32
VC 110725	LLR	128	32	S	≥1	≥0	S	≥16	≥16
VC 11076	HLR	16	16	HLR	64	256	HLR	128	32
10162	LLR	128	1	S	≥1	≥1	S	≥0	≥0
10522	LLR	4	1	S	≥1	≥1	HLR	≥64	16
119/06	HLR	8	4	S	≥2	≥2	HLR	8	4
413/06	HLR	4	4	HLR	8	4	HLR	>≥128	≥128
2235	HLR	32	32	HLR	32	64	HLR	64	32
809	HLR	64	16	LLR	2	4	HLR	17	≥128
803	HLR	16	≥256	LLR	4	2	HLR	4	32

LEGENDA:

LLR...srednje odporni sevi

HLR...visoko odporni sevi

S...občutljivi sevi

Preglednica 14: Tip seva glede na odpornost na določen antibiotik in prikaz relativne učinkovitosti (U) inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk na zmanjšano odpornost na diritromicin in tilozin

Izolat	DIRITROMICIN			TILOZIN		
	TIP	U _{PAβN}	U _{NMP}	TIP	U _{PAβN}	U _{NMP}
GC 154	S	≥8	≥8	LLR	2	2
FC 8	HLR	4	8	LLR	4	8
FC 10	S	≥8	≥8	LLR	2	8
137	HLR	8	16	HLR	16	16
171	HLR	4	16	HLR	8	8
140	HLR	8	≥128	HLR	4	16
M 37	HLR	4	0	HLR	≥8	≥16
VC 7114	S	≥8	≥8	S	≥32	≥32
VC110722	S	≥16	≥16	HLR	16	8
VC 110725	S	≥8	≥8	S	≥32	≥32
VC 11076	HLR	8	4	HLR	4	8
10162	HLR	8	8	HLR	16	16
10522	S	≥2	≥2	S	≥16	≥16
119/06	S	≥4	≥4	HLR	2	2
413/06	S	≥8	≥8	LLR	2	4
2235	S	≥4	≥4	HLR	2	4
809	HLR	≥8	≥4	HLR	16	32
803	HLR	16	8	S	≥16	≥16

LEGENDA:

LLR...srednje odporni sevi

HLR...visoko odporni sevi

S...občutljivi sevi

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Razlogi in posledice prisotnosti odpornih izolatov kampilobakterjev pri ljudeh in živalih

V številnih zahodnoevropskih državah so v zadnjih dvajsetih letih opazili povečano odpornost kampilobakterjev na različne antibiotike. Znanstveniki so bili mnenja, da uporaba protimikrobnih sredstev v veterinarski in humani medicini, pa tudi kot pospeševalcev rasti v moderni, intenzivni reji živali, namenjenih za prehrano ljudi, vpliva na povečanje bakterijske odpornosti proti različnim antibiotikom (Quinn in sod., 2007).

Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) in ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) pozivata k zmanjševanju porabe makrolidnih antibiotikov v veterinarski medicini. Tako bi se zmanjšala možnost tveganja okužb ljudi s kampilobakterji, odpornimi na makrolidne antibiotike. Temu problemu se posveča tudi Evropska skupnost, ki je pretirano uporabo makrolidnih antibiotikov v veterinarski medicini omejila z vrsto predpisov (Alban in sod., 2008). Zadnje raziskave pa kažejo na velik porast razširjenosti odpornih sevov med humanimi izolati, kljub prepovedi njihove uporabe kot rastnih dodatkov že skoraj desetletje. Ta fenomen pripisujejo čedalje boljši in natančnejši diagnostiki (Phillips, 2007).

Kljub naraščanju odpornosti kampilobakterjev na fluorokinolone in makrolide se te vrste antibiotikov najpogosteje uporablja pri zdravljenju kampilobakterioz. Njihovo uporabo pri okužbi s kampilobakterji zasledimo zlasti pri hujših primerih infekcije. Neučinkovito zdravljenje lahko pripelje do hudih zdravstvenih težav, lahko tudi do večjega tveganja za smrt bolnika (Quinn in sod., 2007).

V letu 2005 so Kurinčič in sod. poročali o odpornosti testiranih izolatov kampilobakterjev, izoliranih iz piščančjega mesa v slovenskem prostoru na različne antibiotike. Največji delež izolatov je bil odpornih na ciprofloksacin. Poročali so tudi o odpornosti na makrolide, ki pa je bila ugotovljena pri manjšem številu izolatov.

V eksperimentalni del smo vključili 20 izolatov, med katerimi sta bila 2 referenčna seva. Glede na predhodne rezultate (Kurinčič in sod., 2007; Medja, 2007) smo iz zbirke izbrali samo odporne izolate na eritromicin. Glede odpornosti na antibiotik eritromicin smo izolate kampilobakterjev razdelili na tri razrede: visoke odporne izolate (vrednost MIC večja ali enaka 32 µg/ml), srednje odporne izolate ($4 \mu\text{g/ml} \leq \text{MIC} \leq 16 \mu\text{g/ml}$) ter občutljive izolate ($\text{MIC} < 4 \mu\text{g/ml}$). Uradne mejne vrednosti (angl. breakpoints) pri kampilobakterjih za ostale testirane makrolidne antibiotike niso predpisane. V nekaterih člankih so pri kampilobakterjih navedene uporabljene mejne vrednosti za azitromicin in klaritromicin, medtem ko za tilozin in diritromicin nismo našli citiranih vrednosti. Prav

zaradi teh dejstev in zaradi lažje primerjave med vsemi testiranimi makrolidi smo se odločili za enake mejne vrednosti med S, LLR in HLR pri vseh testiranih antibiotikih.

Uporaba mikrodilucijske metode za določanje vrednosti MIC še ni tako uveljavljena metoda, saj do danes še ni priznana kot referenčna metoda zaradi pomanjkanja mednarodnih standardov pri interpretaciji rezultatov. Avtorji študij, v katerih so določali bakterijsko odpornost na posamezne protimikrobne snovi, so se posluževali tudi drugih metod. Tako so v nekoliko starejših publikacijah Mamelli in sod. (2003), Payot in sod. (2004) uporabljali agar dilucijsko metodo na ploščah, Ge in sod. (2002) pa so uporabljali poleg agar dilucijske metode v bujonu še metodo difuzije v agarju z diski ter E-test.

Največja prednost uporabe mikrodilucijske metode, ki smo jo uporabili, je bila v majhni porabi materiala in razredčevanje raztopin ni bilo časovno zamudno. Metoda je tudi avtomatizirana in lahko poteka za več izolatov hkrati. Slabost te metode je v uporabi zelo majhnih količin dodanih reagentov, gojišč, kulture ter dragih aparatov. Velika slabost te metode je tudi težka določitev vrednosti MIC, kar zahteva analitika z veliko izkušnjami. Bakterijsko živost lahko spremljamo na čitalcu mikrotitrskih ploščic preko merjenja luminiscence, fluorescence ali absorbance. Glavni dejavniki pri izbiri metode so fizikalno-kemijske lastnosti gojišč, testirane protimikrobne snovi ter barvila, ki jih pri analizi uporabljamo.

Uporabljene raztopine antibiotikov in inhibitorja so se v raztopini gojišča dobro topile. Ker so bile te komponente dobro topne v polarnem tekočem gojišču, smo s tem zagotovili stik z bakterijskimi celicami. Da so te spojine, lahko dobro prehajale v notranjost bakterijskih celic, so morale imeti amfipatični karakter, torej tudi nepolarni del molekule, ki je olajšal njihov prehod preko celičnih membran. Njihova protimikrobna učinkovitost je bila zato zelo dobra.

Med 18 vključenimi izolati kampilobakterjev v eksperimentalni del te naloge je bilo glede na odpornost na eritromicin 61 % izolatov tipa HLR in 39 % tipa LLR. Enako delitev smo upoštevali tudi pri ostalih testiranih antibiotikih. Med 18 izolati je bilo na azitromicin odpornih 55 %, na klaritromicin 72 %, na diritromicin 50 %, na tilozin pa 78 % testiranih izolatov. Med 55 % odpornimi izolati glede na azitromicin je bilo 67 % izolatov tipa HLR, 33 % pa tipa LLR. Med 72 % odpornimi izolati glede na klaritromicin je bilo 92 % izolatov HLR, 7 % pa tipa LLR. Med 50 % odpornimi izolati glede na diritromicin je bilo 89 % izolatov HLR, 11 % pa tipa LLR. Med 78 % odpornimi izolati glede na tilozin je bilo 71 % izolatov HLR, 29 % pa tipa LLR.

Največjo skrb pri zdravljenju infekcij s kampilobakterji zbuja zlasti njihova odpornost na makrolide in fluorokinolone. Veliko tveganje za zdravje ljudi predstavlja zlasti dolgo trajanje bolezni, saj lahko privede do številnih zapletov pri nadaljnjem zdravljenju. Vsak izolat, ki je odporen na nek antibiotik, predstavlja tveganje za zdravljenje in tveganje za prenos odpornosti na druge izolate (Quinn in sod., 2007).

Kot MDR izolat smo označili izolat, ki je bil odporen na vsaj tri od petih antibiotikov. Za spodnjo mejno vrednost MIC, ki je še pomenila odpornost izolata na antibiotik, smo glede na pomanjkanje uradnih mejnih vrednosti za posamezen antibiotik izbrali koncentracijo

4 µg/ml, ki je največkrat uporabljena kot mejna vrednost v objavljenih publikacijah. Res pa je, da je inštitut CLSI (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute) predlagal dvig te vrednosti za eritromicin na 8 µg/ml (CLSI, 2006).

MDR fenotip je bil določen pri vseh izolatih, razen izolata VC 7114, kar dokazuje, da membranske izlivne črpalke CmeABC ne delujejo samo na eno vrsto antibiotika, na kar nakazuje tudi literatura. Zelo zanimivo pa je tudi dejstvo, da močno navzkrižno odpornost kažejo sevi, izolirani predvsem iz perutnine. 8 izolatov je razvilo navzkrižno odpornost na vse testirane antibiotike. Med njimi je izredno močno navzkrižno odpornost možno zaslediti pri 4 izolatih (137, 171, 140, M 37), kjer je vrednost MIC na posamezen antibiotik minimalno 128 µg/ml. Število preiskovanih sevov je bilo sicer za taka opažanja zelo majhno, vendar je vseeno zanimivo, da smo največji delež določili pri izolatih, ki so bili izolirani iz perutnine. To je najverjetneje posledica uporabe antibiotikov v prireji živali kot pospeševalcev rasti. Na to dejstvo so opozorili tudi Berrang in sodelavci (2007). Ugotovili so, da vsakodnevni dodatek tilozina k prehrani piščancev vodi do zmanjšanja števila kampilobakterjev na mesu, vendar preostali nato pridobijo odpornost na eritromicin.

V naslednjih korakih smo želeli ugotoviti, kateri mehanizmi so vključeni pri odpornosti bakterij na makrolidne antibiotike. Naši rezultati so potrdili ugotovitve, da je v povečano bakterijsko odpornost vključen tudi sistem membranskih izlivnih črpalk.

5.1.2 Relativni učinek inhibitorjev na občutljivost sevov za makrolidne antibiotike

V zadnjih letih je možno zaslediti objave številnih študij, v katerih avtorji obravnavajo mehanizme, ki bakterijam, med drugim tudi kampilobakterjem, omogočajo povečano odpornost na različne protimikrobne snovi. Točkovne mutacije, ki omogočajo povečano odpornost kampilobakterjev proti makrolidnim antibiotikom, so znane že nekaj časa. Konec prejšnjega stoletja so znanstveniki začeli posvečati vedno večjo pozornost iskanju ostalih mehanizmov, kateri pomembno vplivajo na povečano bakterijsko odpornost. Membranske izlivne črpalke so ene najpomembnejših izmed njih. Njihovo prisotnost so dokazali pri številnih, taksonomsko različnih bakterijah.

Ker se membranske izlivne črpalke med seboj razlikujejo po zgradbi, načinu delovanja ter po izčrpavanju specifičnih protimikrobnih snovi, jih danes uvrščamo v pet večjih skupin. Lin in sod. (2002) so v svoji raziskavi preučevali delovanje in zgradbo membransko-proteinskega sistema pri kampilobakterjih. Navedli so, da je zgrajen iz treh različnih beljakovinskih struktur in je lociran v bakterijski celični steni. Ge in sod. pa so naredili še korak dalje in so leta 2005 objavili točno sekvenco genoma, ki kodira zapis za sintezo posameznih komponent membranske izlivne črpalke.

Relativne učinke inhibitorjev smo računali samo pri izolatih razredov HLR in LLR. Za občutljive seve nismo računali učinka posameznih inhibitorjev. Literatura navaja (Kern in sod., 2006) delitev sevov glede na učinek inhibitorja v 2 skupini. Ločimo skupino z do vključno 4-kratno učinkovitostjo in skupino do vključno 16-kratno učinkovitostjo. Pri tistih izolatih, pri katerih nismo mogli določiti dejanskega učinka, smo pri nadaljnji obdelavi

podatkov uporabili minimalni določen učinek. Po podatkih iz literature (Kirst in Sides, 1989) imajo vsi testirani antibiotiki podoben vpliv na bakterije rodu *Campylobacter* kot eritromicin.

Kern in njegova skupina sodelavcev so v letu 2006 kot prvi začeli preizkušati dodatek inhibitorja NMP določenim antibiotikom. Preizkusili so ga na bakterijah rodu *Enterobacteriaceae* in *Acinetobacter baumannii*. Inhibitor NMP pa do sedaj znanih podatkih še ni bil testiran na kampilobakterjih.

5.1.2.1 Eritromicin

V naši nalogi smo dokazali, da dodatek inhibitorja izlivnih črpalk PAβN eritromicinu vrednost MIC sevov razreda LLR zmanjša, tako da postanejo občutljivi (preglednica 8 in 13). Vpliv inhibitorja je viden tudi v razredu S, kjer smo pri 2 referenčnih sevih ugotovili še dodatno znižanje vrednosti MIC (preglednica 8). Pri sevih LLR razreda prisotnost inhibitorja prispeva do največ 128-kratnega povečanja občutljivosti na eritromicin (preglednica 13). Do podobnih zaključkov so prišli tudi drugi avtorji (Payot in sod., 2004; Mamelli in sod., 2005; Corcoran in sod., 2005; Cagliero in sod., 2005). Ti avtorji so poročali, da ima v izlivnem mehanizmu LLR razreda pomembno vlogo zlasti črpalka CmeABC, kar so dokazali z usmerjeno mutagenezo in z uporabo mutantov. Iz tega dejstva pa lahko sklepamo, da so take vrednosti MIC značilne za to črpalko.

Pri visoko odpornih sevih- HLR je dodatek inhibitorja PAβN privedel do največ 64-kratnega povečanja občutljivosti sevov za eritromicin (preglednica 13). Do podobnih rezultatov so prišli tudi drugi avtorji (Kurinič in sod., 2005; Corcoran in sod., 2005; Gibreel in sod., 2005). Ta ugotovitev dokazuje, da prisotnost membranskih izlivnih črpalk, zlasti črpalke CmeABC, ni bil edini mehanizem, ki je vplival na povečano odpornost HLR izolatov na eritromicin.

Preglednica 15: Relativni učinek inhibitorja membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov za eritromicin

ERITROMICIN			
	Visoko odporni izolati (HLR) (MIC ≥ 32 µg/ml)	Srednje odporni izolati (LLR) (4 µg/ml ≤ MIC ≤ 16 µg/ml)	Občutljivi izolati (S) (MIC < 4 µg/ml)
Število izolatov	11	7	0
Izračunani povprečni učinek inhibitorja PAβN	20	70	/
Izračunani povprečni učinek inhibitorja NMP	69	43	/

Izmed analiziranih izolatov je bilo na eritromicin visoko odpornih (HLR) 11 izolatov, 7 jih je bilo srednje odpornih (LLR). Občutljivih (S) izolatov ni bilo. Med 18 izolati je kar 15

(83 %) izolatov imelo najmanj 16-kratno povečanje občutljivosti ob dodatku PAβN. Ob dodatku NMP pa 8 (44 %) izolatov (preglednica 13).

Učinkovitost inhibitorja PAβN je bila najvišja pri LLR izolatih, saj se je vrednost MIC pri njih v povprečju zmanjšala za 70-krat. Izračunani povprečni učinek inhibitorja PAβN je pri HLR izolatih znašal 20. Tako smo dokazali, da so efluksne črpalke najpomembnejše pri LLR izolatih (preglednica 15).

Učinkovitost inhibitorja NMP je bila za razliko od PAβN najvišja pri HLR izolatih. Ti rezultati verjetno nakazujejo na prisotnost različnih tarčnih in vezavnih mest za ta dva inhibitorja v membranskih črpalkah kampilobakterjev (preglednica 15).

5.1.2.2 Azitromicin

Med 18 odpornimi izolati na eritromicin je bilo na azitromicin visoko odpornih 8 izolatov, 4 so bili srednje odporni in 6 je bilo občutljivih (preglednica 9). Med 12 odpornimi izolati na azitromicin je 6 (50 %) izolatov imelo več kot 16-kratno povečanje občutljivosti ob dodatku PAβN in 7 (58 %) izolatov ob dodatku NMP (preglednica 13 in 16).

Preglednica 16: Relativni učinek inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov za azitromicin

AZITROMICIN			
	Visoko odporni izolati (HLR) (MIC ≥ 32 µg/ml)	Srednje odporni izolati (LLR) (4 µg/ml ≤ MIC ≤ 16 µg/ml)	Občutljivi izolati (S) (MIC < 4 µg/ml)
Število izolatov	8	4	6
Izračunani povprečni učinek inhibitorja PAβN	65	4	/
Izračunani povprečni učinek inhibitorja NMP	297	22	/

Inhibitor PAβN je pri odpornih sevih na azitromicin povzročil od 2 do 256-kratno zmanjšanje vrednosti MIC za ta antibiotik (preglednica 13). Razlike med sevi so bile zelo velike. Še posebej močan učinek je viden pri izolatu *C. coli* 140, podobno pa tudi pri ostalih HLR izolatih iz piščančjega mesa. Inhibitor NMP je pri odpornih sevih na azitromicin povzročil od 2 do 512-kratno zmanjšanje vrednosti MIC. Pri izolatu GC 154 inhibitor NMP ni imel učinka, čeprav je šlo za odporen sev. Tu je vpleten nek drug vzrok. Pri 5 izolatih (VC 110722, 137, 171, VC 11076, 140) pa je imel zelo velik učinek, čeprav pri nobenem HLR izolatu ni povrnil občutljivosti, temveč le zmerno odpornost (preglednica 9, 13 in 16).

Učinkovitost inhibitorjev PAβN in NMP je bila najvišja pri HLR izolatih. Njuna učinkovitost se močno razlikuje v korist inhibitorja NMP, kar kaže na različen mehanizem delovanja obeh inhibitorjev ali pa imata sploh različno tarčno membransko črpalko. Učinek inhibitorja NMP na sev 140 je bil izredno močan (1024-kratni učinek). Zelo močan učinek inhibitorja NMP je viden pri vseh izolatih perutninskega izvora (preglednica 16).

Glede na eritromicin, kjer so bile efluksne črpalke pri inhibitorju PAβN najpomembnejše pri LLR izolatih, so za azitromicin pomembnejše pri HLR izolatih, kjer je izračunani povprečni učinek inhibitorja PAβN 3-krat večji kot pri eritromicinu (preglednica 16). Efluksne črpalke pri inhibitorja NMP so tudi pomembnejše pri HLR izolatih za azitromicin, enako kot pri eritromicinu, le s to razliko, da je povprečni izračunani učinek inhibitorju NMP znašal kar 297, kar je 4-krat več kot pri eritromicinu. Iz teh dejstev lahko sklepamo, da je za azitromicin odpornost tipa HLR bolj pomembna neka druga črpalka, ki je bolj občutljiva na NMP v primerjavi s PAβN, kot pa sama mutacija, ki je značilna za HLR izolate pri eritromicinu.

5.1.2.3 Klaritromicin

Med 18 odpornimi izolati na eritromicin je bilo na klaritromicin visoko odpornih 12 izolatov, 1 je bil srednje odporen in 5 je bilo občutljivih (preglednica 10 in 17). Med 12 odpornimi izolati na klaritromicin je 12 (85 %) izolatov imelo več kot 16-kratno povečanje občutljivosti ob dodatku PAβN in 7 (54 %) izolatov ob dodatku NMP (preglednica 13).

Preglednica 17: Relativni učinek inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov za klaritromicin

KLARITROMICIN			
	Visoko odporni izolati (HLR) (MIC ≥ 32 µg/ml)	Srednje odporni izolati (LLR) (4 µg/ml ≤ MIC ≤ 16 µg/ml)	Občutljivi izolati (S) (MIC < 4 µg/ml)
Število izolatov	12	1	5
Izračunani povprečni učinek inhibitorja PAβN	56	16	/
Izračunani povprečni učinek inhibitorja NMP	35	4	/

Inhibitor PAβN je pri odpornih sevih na klaritromicin povzročil od 4 do najmanj 128-kratno zmanjšanje vrednosti MIC. Močan učinek je viden pri 7 izolatih (VC 11076, 140, M 37, 413/06, FC 8, 10522, 2235). Inhibitor NMP je pri odpornih sevih na klaritromicin povzročil od 2 do najmanj 128-kratno zmanjšanje vrednosti MIC. Pri 2 izolatih (413/06, 809) pa je imel močan učinek (preglednica 13 in 17).

Njuna učinkovitost se močno razlikuje v korist inhibitorja PAβN, kar kaže na različen mehanizem delovanja obeh inhibitorjev. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi avtorji, ampak na drugih testnih organizmih (Kern in sod., 2006; Pannek in sod., 2006; Schumacher in sod., 2006).

Glede na eritromicin, kjer so bile efluksne črpalke pri inhibitorju PAβN najpomembnejše pri LLR izolatih, so za klaritromicin pomembnejše pri HLR izolatih, kjer je izračunani povprečni učinek inhibitorja PAβN skoraj 3-krat večji kot pri HLR izolatih za eritromicin. Efluksne črpalke pri inhibitorju NMP so tudi pomembnejše pri HLR izolatih za klaritromicin. Izračunani povprečni učinek inhibitorja NMP pa je za 1-krat manjši pri izolatih HLR v primerjavi z eritromicinom. Iz teh dejstev lahko sklepamo, da so efluksne črpalke za klaritromicin pomembnejše pri HLR kot pri LLR izolatih ne glede na inhibitor. Predvidevamo, da je učinkovitost posameznega inhibitorja posledica različnih vezavnih mest v sami črpalci.

5.1.2.4 Diritromicin

Med 18 odpornimi izolati na eritromicin je bilo na diritromicin visoko odpornih 9 izolatov, 9 je bilo občutljivih, nobeden ni bil srednje odporen (preglednica 11). Med 9 odpornimi izolati na diritromicin sta 2 (22 %) izolata imela več kot 16-kratno povečanje občutljivosti ob dodatku PAβN in 3 (33 %) izolati ob dodatku NMP (preglednica 14 in 18).

Preglednica 18: Relativna učinek inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov za diritromicin

DIRITROMICIN			
	Visoko odporni izolati (HLR) (MIC ≥ 32 µg/ml)	Srednje odporni izolati (LLR) (4 µg/ml ≤ MIC ≤ 16 µg/ml)	Občutljivi izolati (S) (MIC < 4 µg/ml)
Število izolatov	9	0	9
Izračunani povprečni učinek inhibitorja PAβN	8	/	/
Izračunani povprečni učinek inhibitorja NMP	22	/	/

Inhibitor PAβN je pri odpornih sevih na diritromicin povzročil od 4 do najmanj 16-kratno zmanjšanje vrednosti MIC. Inhibitor NMP je pri odpornih sevih na diritromicin povzročil od 4 do najmanj 128-kratno zmanjšanje vrednosti MIC. Pri izolatu M 37 NMP ni imel učinka. Pri izolatu 140 pa je imel močan učinek (preglednica 14).

Učinek inhibitorja PAβN je več kot 2-krat manjši kot pri eritromicinu. Podobno je tudi pri učinku inhibitorja NMP, kjer je učinek 3-krat manjši. Kljub temu pa se za diritromicin

učinkovitost razlikuje v korist inhibitorja NMP, kar kaže na različna vezavna mesta v sami črpalki. Za diritromicin nismo imeli primera za tip LLR.

5.1.2.5 Tilozin

Med 18 odpornimi izolati na eritromicin je bilo na tilozin visoko odpornih 10 izolatov, 4 so bili srednje odporni in 4 so bili občutljivi (preglednica 12). Med 14 odpornimi izolati na tilozin so 4 (29 %) izolati imeli več kot 16-kratno povečanje občutljivosti ob dodatku PABN in 5 (36 %) izolatov ob dodatku NMP (preglednica 14 in 19).

Preglednica 19: Relativni učinek inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov za tilozin

TILOZIN			
	Visoko odporni izolati (HLR) (MIC \geq 32 μ g/ml)	Srednje odporni izolati (LLR) (4 μ g/ml \leq MIC \leq 16 μ g/ml)	Občutljivi izolati (S) (MIC < 4 μ g/ml)
Število izolatov	10	4	4
Izračunani povprečni učinek inhibitorja PABN	9	3	/
Izračunani povprečni učinek inhibitorja NMP	13	6	/

Inhibitor PABN je pri odpornih sevih na tilozin povzročil od 2 do najmanj 16-kratno zmanjšanje vrednosti MIC. Inhibitor NMP je pri odpornih sevih na tilozin povzročil od 2 do najmanj 32-kratno zmanjšanje vrednosti MIC (preglednica 14). Do podobnega zaključka je prišel tudi Cagliero in sod. v letu 2005.

Glede na eritromicin, kjer so bile efluksne črpalke pri inhibitorju PABN najpomembnejše pri LLR izolatih, so za tilozin efluksne črpalke pomembnejše pri HLR rezultatih, kjer je izračunani povprečni učinek inhibitorja PABN več kot 2-krat manjši kot pri HLR izolatih za eritromicin. Efluksne črpalke pri inhibitorju NMP so tudi pomembnejše pri HLR izolatih, kjer je izračunani povprečni učinek 5-krat manjši kot pri eritromicinu. Iz teh dejstev lahko sklepamo, da so efluksne črpalke pomembnejše pri HLR kot pri LLR izolatih ne glede na inhibitor. Njuna učinkovitost za tilozin se razlikuje v korist inhibitorja NMP, kar kaže na različna vezavna mesta v sami črpalki.

5.1.3 Mehanizmi, vpleteni v navzkrižno odpornost sevov *Campylobacter*

Ker se membranske izlivne črpalke med seboj razlikujejo po zgradbi, načinu delovanja ter po izčrpavanju specifičnih protimikrobnih snovi, jih danes razvrščamo v pet večjih skupin (razredov). Piddock (2006) je v svoji raziskavi preučevala delovanje in zgradbo RND

membransko-proteinskega sistema pri kampilobakterjih. Navedla je, da je zgrajen iz treh različnih beljakovinskih struktur in je lociran v bakterijski celični steni. Ge in sod. (2005) pa so objavili točno sekvenco genoma, ki kodira zapis za sintezo posameznih komponent membranske izlivne črpalke. Avtorji navajajo, da so bakterije z njihovo pomočjo zmožne iz svoje notranjosti izčrpavati številne (po kemijski zgradbi nesorodne) protimikrobne snovi. Poleg različnih antibiotikov omenjajo tudi barvila, težke kovine, žolčne soli in detergente (Lin in sod., 2002).

Odpornost proti večim makrolidnim antibiotikom smo potrdili pri vseh testiranih izolatih, razen pri izolatu VC 7114. Poleg tega smo potrdili tudi vpletenost izlivnih črpalk v mehanizem odpornosti. To dokazuje, da membranske izlivne črpalke CmeABC ne delujejo samo na eno vrsto antibiotika, na kar nakazuje tudi literatura. Različne učinke posameznih inhibitorjev lahko pripišemo različnim vezavnim mestom ali celo različnim mehanizmom delovanja na ta vezavna mesta v celici. Nekateri avtorji so pojasnili navzkrižno odpornost s prekrivajočimi se vezavnimi mesti v ribosomski podenoti 50S (Gibreel in Taylor, 2006; Mahamoud, 2007)

5.2 SKLEPI

- Z mikrodilucijsko metodo smo 18 izbranim sevom kampilobakterjev, odpornih na eritromicin, določili vrednosti MIC za azitromicin, klaritromicin, diritromicin in tilozin, ki so se gibale med 0,063 µg/ml in 512 µg/ml. S primerjavo vrednosti MIC eritromicina in ostalih makrolidnih antibiotikov smo potrdili navzkrižno odpornost pri 94 % testiranih izolatih. Med njimi je bilo 47 % takih, ki so razvili navzkrižno odpornost na vse testirane makrolidne antibiotike. Močno navzkrižno odpornost smo potrdili predvsem pri izolatih perutninskega izvora.
- Istim izbranim sevom smo določili vrednosti MIC ob prisotnosti subinhibitorne koncentracije inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk PABN in NMP. Ugotovili smo, da imajo membransko izlivne črpalke pomembno vlogo pri povečani odpornosti na makrolide. Inhibitorja PABN in NMP sta različno zmanjšala občutljivost izolatov na antibiotike. Učinek je bil odvisen od vrste antibiotika in testiranega seva, oz. njegove odpornosti – potrdili smo vpletenost izlivnih črpalk v odpornost predvsem pri sevih z visoko vrednostjo MIC ($MIC \geq 16 \mu\text{g/ml}$).
- Iz analize dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da so membranske izlivne črpalke vpletene v navzkrižno odpornost sevov *Campylobacter* na makrolidne antibiotike. Za bolj specifične zaključke o mehanizmu delovanja so potrebne nadaljnje raziskave.

6 POVZETEK

Kampilobakterji so znani povzročitelji črevesnih infekcij pri domačih in divjih živalih kakor tudi pri človeku. Skozi evolucijo so podobno kot ostale po Gramu negativne bakterije, razvili številne obrambne mehanizme proti antibiotikom in ostalim protimikrobnim učinkovinam. V številnih evropskih državah so okužbe s kampilobakterji povezane s hrano. Najbolj pogost razlog za okužbo je uživanje kontaminiranih ali premalo temperaturno obdelanih živil, še posebej perutnine. Med glavne razloge za povečano bakterijsko odpornost na številne protimikrobne snovi lahko uvrstimo nespametno uporabo protimikrobnih sredstev v veterinarski in humani medicini pa tudi kot pospeševalcev rasti v moderni, intenzivni reji živali, namenjenih za prehrano ljudi. Poleg tega se je treba tudi zavedati, da so bakterije v procesu proizvodne verige živil izpostavljene številnim fizikalno-kemijskim stresom. Njihovo preživetje je odvisno od lastne sposobnosti prilagajanja na trenutne razmere v okolju, ki jih obdaja, zato so razvile številne mehanizme, ki povečujejo njihovo odpornost.

Za zdravljenje kampilobakterioz se v glavnem uporabljajo 3 različne vrste antibiotikov. Vse večjo zaskrbljenost v skrbi za zdravje ljudi pa predstavljajo tiste bakterije, ki so odporne proti makrolidom, fluorokinolonom ter tetraciklinom hkrati. Glavna mehanizma, ki bakterijam omogočata zaznavanje in prilagajanje na okolje s povečano koncentracijo protimikrobnih snovi, so točkovne mutacije in membranske izlivne črpalke.

V nalogo smo vključili 18 živilskih in humanih izolatov *Campylobacter* spp., katerim smo z mikrodilucijsko metodo preko merjenja fluorescentnega signala določali minimalno koncentracijo izbranega antibiotika, ki še inhibira bakterijsko metabolično aktivnost brez ali z dodatkom posameznega inhibitorja (MIC). Kot protimikrobne snovi smo uporabili 5 makrolidnih antibiotikov: eritromicin, azitromicin, klaritromicin, diritromicin in tilozin. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, ali inhibitorja izlivnih črpalk PAβN in NMP vplivata na delovanje izlivnih črpalk, ki so odgovorne za iznos protimikrobnih snovi iz celice in pojavnost navzkrižne odpornosti proti izbranim makrolidnim antibiotikom

Po končanem eksperimentalnem delu smo določali vrednosti MIC za posamezne makrolidne antibiotike. Ugotovili smo, da na visoko odpornost na makrolidne antibiotike vplivajo tudi membranske izlivne črpalke (zlasti CmeABC). Dokazali smo tudi, da imajo membransko izlivne črpalke največjo vlogo pri povečani odpornosti na makrolide, pri odpornih izolatih ($MIC \geq 4 \mu\text{g/ml}$), kjer sta inhibitorja PAβN in NMP različno zmanjševala občutljivost izolatov na antibiotike. Ugotovili smo tudi, da ima inhibitor NMP boljši učinek kot PAβN na večino testiranih antibiotikov, razen na klaritromicin, kar lahko zasledimo tudi v literaturi pri drugih testnih organizmih. To nakazuje na prisotnost različnih tarčnih in vezavnih mest za ta dva inhibitorja v sami črpalci in na njuno sposobnost prehoda skozi permeabilno membrano v celico.

Pri večini izmed 18 analiziranih izolatov smo določili navzkrižno odpornost na testirane makrolidne antibiotike, kar dokazuje, da membranske izlivne črpalke CmeABC ne delujejo samo na eno vrsto antibiotika, na kar nakazuje tudi literatura. Zelo zanimivo pa je tudi dejstvo, da močno navzkrižno odpornost kažejo izolati izolirani predvsem iz perutnine.

VIRI

Akiba M., Lin J., Barton Y., Zhang Q. 2006. Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 52-60

Alban L., Okholm Nielsen E., Dahl J. 2008. A human health risk assessment for macrolide-resistant *Campylobacter* associated with the use of macrolides in Danish pig production. *Preventive Veterinary Medicine*, 83: 115-129

Andlovic A. 2002. Kampilobakterji. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 217-220

Angenent L.T., Mau M., George U., Zahn J.A., Raskin L. 2008. Effect of the presence of the antimicrobial tylosin in swine waste on anaerobic treatment. *Water Research*, 42, 10-11: 2377-2384

Berrang M.E., Ladely S.R., Meinersmann R.J., Fedorka-Cray P.J. 2007. Subtherapeutic tylosin phosphate in broiler feed affects *Campylobacter* on carcasses during processing. *Poultry Science*, 86: 1229-1233

Black R.E., Levine M.M., Clements M.L., Hughes T.P., Blaser M.J. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *Journal of Infectious Diseases*, 157: 472-479

Bohnert J.A., Kern W.V. 2005. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 2: 849-852

Cagliero C., Mouline C., Payot S., Cloeckert A. 2005. Involvement of the CmeABC efflux pump in the macrolide resistance of *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 948 - 950

Canillac N., Mourey A. 2001. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*: 36, 3: 261-268

Charvalos E., Tselentis Y., Hamzhepour M.M., Köhler T., Pechere J.-D. 1995. Evidence for an efflux pump in multidrug-resistant *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39, 9: 2019-2022

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne. Cit. po: Lin J., Yan M., Sahin O., Pereira S., Chang Y.J., Zhang Q. 2007. Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 5: 1678-1686

Corcoran D., Quinn T., Cotter L., Fanning S. 2006. An investigation of the molecular mechanisms contributing to high-level erythromycin resistance in *Campylobacter*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27, 1: 40-45

EFSA. 2007a. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. Parma, EFSA– European Food Safety Authority (http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale1178620753812_1178671312912.htm) (04.04.2008): 310 str.

EFSA. 2007b. Slovenia: Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs in 2006. Parma, EFSA – European Food Safety Authority (http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale1178620753812_1178676772406.htm) (03.04. 2008): 315 str.

Ge B., Bodeis S., Walker R.D., White D.G., Zhao S., McDermott P.F., Meng J. 2002. Comparison of the E-test and agar dilution for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50: 487 - 494

Ge B., McDermott P.F., White D.G., Meng J. 2005. Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 8: 3347-3354

Gibreel A., Taylor D.E. 2006. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 243-255

Holasova M., Karpiskova R., Karpiskova S., Babak V., Schlegelova J. 2007. Comparison of methods for the determination of antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp. human and the food chain isolates. *Veterinarni Medicina*, 52, 4: 169-173

Jorgensen J.H., Ferraro M.J. 1998. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 26: 973-980

Fernandez Junior A., Balestrin E.C., Betoni J.E.C., Orsi R.O. 2005. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Memorias de Instituto Oswaldo Cruz*, 100, 5: 563-566

Kaatz G.W. 2006. Bacterial efflux pump inhibition: A potential means to recover clinically relevant activity of substrate antimicrobial agents. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14: 1-30

Kanatani M.S., Guglielmo B.J. 1994. The new macrolides-azithromycin and clarithromycin. *Western Journal of Medicine*, 160: 31-37

Kern W.V., Steinke P., Schumacher P., Schuster S., von Baum H., Bohnert J.A. 2006. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 339-343

Ketley J.M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*, 143: 5-21

Khan S.J., Roser D.J., Davies C.M., Peters G.M., Stuetz R.M., Tucker R., Ashbolt N.J. 2007. Chemical contaminants in feedlot wastes: Concentrations, effects and attenuation. *Environment International*. Doi 1016/j.envint.2007.10.007

Kirst H.A., Sides G.D. 1989. New directions for macrolide antibiotics: Structural modifications and in vitro activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 9: 1413-1418

Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 427-438

Kurinčič M., Berce I., Zorman T., Smole Možina S. 2005. The prevalence of multiple antibiotic resistance in *Campylobacter* spp. from retail poultry meat. *Food Tehnology and Biotechnology*, 43, 2: 157-163

Kurinčič M., Botteldoorn N., Herman L., Smole Možina S. 2007. Mechanisms of erythromycin resistance of *Campylobacter* spp. isolated from food, animals and humans. *International Journal of Food Microbiology*, 120: 186-190

Lin J., Akiba M., Sahin O., Zhang Q. 2005. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 3: 1067-1075

Lin J., Martinez A. 2006. Effect of efflux pump inhibitors on bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 5: 966-972

Lin J., Michel L.O., Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 7: 2124-2131

Lin J., Yan M., Sahin O., Pereira S., Chang Y.J., Zhang Q. 2007. Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 5: 1678-1686

Lomovskaya O., Bostian K.A. 2006. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic-A vision for applied use. *Biochemical Pharmacology*, 71: 910-918

Lomovskaya O., Zgurskaya H.I., Totrov M., Watkins W. 2007. Waltzing transporters and the dance macabre between humans and bacteria. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6: 56 - 65

Luber P., Bartelt E., Genschow E., Wagner J., Hahn H. 2003. Comparison of broth microdilution, E-test and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 3: 1062-1068

Mahamoud A., Chevalier J., Alibert-Franco S., Kern W.V. 2007. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 6: 1223-1229

Mamelli L., Amoros J.-P., Pagès J.-M., Bolla J.-M. 2003. A phenylalanine–arginine β -naphthylamide sensitive multidrug efflux pump involved in intrinsic and acquired resistance of *Campylobacter* to macrolides. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 3: 237-241

Mamelli L., Prouzet-Maulcón V., Pagès J.-M., Mégraud F., Bolla J.-M. 2005. Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: role of efflux pumps and target mutations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 3: 491-497

Marquez B. 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, 87: 1137-1147

Martinez A., Lin J. 2006. Effect of an efflux pump inhibitor on the function of the multidrug efflux pump CmeABC and antimicrobial resistance in *Campylobacter*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3, 4: 393-402

McDermott P. F., Bodeis-Jones S.M., Fritsche T.R., Jones N.R., Walker J. D. 2005. Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 6163-6168

Medja B. 2007. Mehanizmi odpornosti bakterij *Campylobacter jejuni* in *C. coli* proti izbranim antibiotikom. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 72 str

Moore, J.E., Corcoran, D., Dooley, J.S.G, Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., McDowell, D.A., Megraud, F., Millar, B.C., O'Mahony, R., O'Riordan, L., O'Rourke, M., Rao, J.R., Rooney, P.J., Sails, A., Whyte, P. 2005. *Campylobacter*. *Veterinary Research* 36, 351–382

MpexPharmaceuticals. 2008. Efflux pump inhibitor program: structural organization of the tripartite efflux system. San Diego, MpexPharmaceuticals

<http://images.google.si/imgres?imgurl=http://www.mpexpharma.com/images/illustration.gif&imgrefurl=http://www.mpexpharma.com/efflux.html&h=320&w=447&sz=25&hl=sl&start=4&tbnid=sFhiSRO40swSZM:&tbnh=91&tbnw=127&prev=/images%3Fq%3Defflux%2Bpump%26gbv%3D2%26hl%3Dsl%26sa%3DG> (17.3.2008): 1 str.

Pagès J.-M., Masi M., Barbe J. 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends in Molecular Medicine*, 11, 8: 382-389

Pannek S., Higgins P.G., Steinke P., Jonas D., Akova M., Bohnert J.A., Seifert H., Kern W.V. 2006. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- β -naphthylamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 970-974

Payot S., Avrain L., Magras C., Praud K., Cloeckaert A., Chaslus-Dancla E. 2004. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23, 5: 468-472

Payot S., Bolla J.-M., Corcoran D., Fanning S., Mégraud F., Zhang Q. 2006. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes and Infection*, 8, 7: 1967-1971

Phillips I. 2007. Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effect in relation to human health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30: 101-107

Piddock L.J.V. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 2: 382-402

Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 20-51

Pumbwe L., Piddock L.J.V. 2002. Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiology Letters*, 206: 185-189

Pumbwe L., Randall L.P., Woodward M.J., Piddock L.J.V. 2005. Evidence for multiple-antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* not mediated by CmeB or CmeF. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 4: 1289-1293

Riss T., Moravec R. 2003. Introducing CellTiter-Blue® cell viability assay. *Promega Notes*, 83: 10-13

Quinn T., Bolla J.-M., Pagès J.-M., Fanning S. 2007. Antibiotic-resistant *Campylobacter*: could efflux pump inhibitors control infection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 6: 1230-1236

Sefton A. 2002. Mechanisms of antimicrobial resistance and their clinical relevance in the new millenium. *Drugs*, 62, 4:557-566

Seme K. 2002. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439-446

Schumacher P., Steinke P., Bohnert J.A., Akova M., Jonas D., Kern W.V. 2006. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* other than *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemterapy*, 57: 344-348

Sigma- Aldrich. 2008a. L-Phenylalanine β -naphthylamide, St. Louis, Sigma-Aldrich Co. (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/P3762>) (20.03.2008): 1 str.

Sigma- Aldrich. 2008b. 1-(1-Naphthylmethyl)piperazine, St. Louis, Sigma-Aldrich Co. (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/ALDRICH/651699>) (20.03.2008): 1 str.

Skirrow M.B., Butzler J.P. Foreword. 2000. V: *Campylobacter*. Nachamkin I, Blaser M.J. (eds.). Washington DC, ASM Press, 2000: 17-23

Snelling W. J., Matsuda M., Moore J. E., Dooley J.S.G. 2005. Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 297-302

van Vliet A.H.M., Ketley J.M. 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 45-56

Vester B., Douthwaite S. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S *rRNA*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 1: 1-12

Vigil A.L.M., Palou E., Parish M. E., Davidson P. M. 2005. Methods for activity assay and evaluation of results. V: *Antimicrobials in food*. Davidson P. M., Sofos J. N. Branen A.L. (eds.). New York, CRC Press, 659-680

Wintermeyer S.M., Abdel-Rahman S.M., Nahata M.C. 1996. Dirithromycin: a new macrolide. *Annals of Pharmacotherapy*, 30, 10: 1141-1149

Yim G. 2007. Attack of the superbugs: Antibiotic resistance. *The Science Creative Quarterly*, 3: Sept. 07- Apr. 08

<http://images.google.si/imgres?imgurl=http://www.scq.ubc.ca/wp-content/uploads/2006/08/HorizontalTransfer.gif&imgrefurl=http://www.scq.ubc.ca/%3Fp%3D410&h=321&w=365&sz=29&hl=sl&start=8&tbnid=XCy8mrSZ2e8OyM:&tbnh=106&tbnw=121&prev=/images%3Fq%3Dmechanism%2Bof%2Bantibiotics%26gbv%3D2%26svnum%3D10%26hl%3Ds> (15.3.2008): 1 str.

Yu K.W., Neu H.C. 1990. In vitro activity of dirithromycin (LY 237216) compared with activities of other macrolide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34, 9: 1839-1842

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so mi v času študija stali ob strani in me spodbujali. Posebej pa bi se zahvalila:

Mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za vse spodbudne besede in koristne napotke že med samim študijem ter za pomoč pri načrtovanju in izdelavi diplomske naloge.

Recenzentki prof. dr. Veroniki Abram za skrben in natančen pregled diplomske naloge.

Mariji Kurinčič za pomoč pri praktičnem delu in za strokovne nasvete med pisanjem diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi Jani Avbelj za pomoč v laboratoriju.

Najlepša hvala Ivici Hočevar za pregled diplomskega dela in za urejanje literaturnih virov ter Barbari Slemenik za prijaznost in za pomoč pri iskanju literature.

Posebna zahvala je namenjena tudi moji družini in prijateljem za vso podporo v času študija.