

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tjaša KAPEL

**ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM PRI
BAKTERIJAH *Campylobacter jejuni* IN *Campylobacter
coli* IZ ŽIVIL, OKOLJA IN BOLNIKOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tjaša KAPEL

**ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM PRI BAKTERIJAH
Campylobacter jejuni IN *Campylobacter coli* IZ ŽIVIL, OKOLJA IN
BOLNIKOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *Campylobacter jejuni* AND
Campylobacter coli FROM FOOD, ENVIRONMENTAL AND HUMAN
CLINICAL SAMPLES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek študija živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Sonja Smole Možina in za recenzentko prof. dr. Lea Gašperlin.

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Recenzentka: prof. dr. Lea GAŠPERLIN

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tjaša Kapel

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.24/.26: 579.61: 615.33 (043)= 163.6
KG patogeni mikroorganizmi/*Campylobacter jejuni/Campylobacter coli*/ kampilobakterioze/klasične metode odkrivanja/kontaminirane površinske vode/ kontaminirano piščanče meso/prehranska veriga ljudi/antibiogram/odpornost proti antibiotikom/
AV KAPEL, Tjaša
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/GAŠPERLIN, Lea (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2012
IN ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM PRI BAKTERIJAH *Campylobacter jejuni* IN *Campylobacter coli* IZ ŽIVIL, OKOLJA IN BOLNIKOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 61 str., 27 sl., 17 pregl., 2 pril., 98 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Bakterije rodu *Campylobacter* so pogosti povzročitelji črevesnih okužb pri ljudeh. Dodatno skrb vzbujajo podatki o naraščajoči odpornosti teh bakterij proti antibiotikom. Da bi lahko ocenili pomen prenosa odpornosti proti antibiotikom preko prehranske verige na ljudi, kar je osnovni pogoj za uspešno omejevanje tega tveganja za zdravje ljudi, je pomembno stalno spremljanje pojava odpornih sevov, tako v živilih, kot tudi v okolju in bolnikih. V eksperimentalni del naloge smo vključili 60 sevov bakterij *Campylobacter*, izoliranih iz površinskih vod, živil in humanih kliničnih vzorcev v letu 2010 in 2011. Najprej smo s klasično metodo izolirali bakterije *Campylobacter jejuni* in *C. coli* iz površinskih vod po metodi ISO 17995:2005 in iz živil po metodi ISO 102721-1, nato pa s klasičnimi in molekularnimi identifikacijskimi testi potrdili 19 izolatov iz površinskih vod in 21 izolatov iz živil. 20 humanih kliničnih sevov smo pridobili na Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor. Skupno 60 izolatom smo z mikrodilucijsko metodo določili odpornost proti sedmim antibiotikom (gentamicinu, streptomycinu, ciprofloksacinu, tetraciklinu, eritromicinu, nalidiksinski kislini in kloramfenikolu). Najpogosteje smo potrdili odpornost proti ciprofloksacinu in nalidiksinski kislini, največkrat pri živilskih (90,5 %, 71,4 %) in humanih sevih (85 %, 70 %), redkeje pri okoljskih sevih (15,8 %, 21,1 %). Prav tako je bila odpornost pogostejša pri živilskih izolatih za antibiotike streptomycin (38,1 %), tetraciklin (42,9 %) in eritromycin (33,3 %). Za slednjega smo pri okoljskih in humanih sevih potrdili 100-odstotno občutljivost. Sevi *C. coli* so bili pogosteje odporni proti antibiotikom kot *C. jejuni*, vendar so med humanimi izolati redki. Rezultati analize odpornosti proti antibiotikom so primerljivi med živilskimi in humanimi sevi vrste *C. jejuni*. Izolati površinskih vod so bili bistveno bolj občutljivi na testirane antibiotike, zato rezultati ne nakazujejo neposredne vpletenenosti teh vzorcev pri prenosu okužbe na človeka ali živali.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24/.26: 579.61: 615.33 (043)= 163.6
CX pathogens/*Campylobacter jejuni*/*Campylobacter coli*/campylobacteriosis/classical culturing methods/contaminated surface water/contaminated chicken meat/food chain/antibiogram/antibiotic resistance
AU KAPEL, Tjaša
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/GAŠPERLIN, Lea (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2012
IN ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *Campylobacter jejuni* AND *Campylobacter coli* FROM FOOD, ENVIRONMENTAL AND HUMAN CLINICAL SAMPLES
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 61 p., 27 fig., 17 tab., 2 ann., 98 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Campylobacter* has become a frequent cause of human gastroenteritis. As the number of patients is still increasing, the resistance of campylobacters to some antibiotics is alarming, too. Being aware of the significance of antibiotic resistance transfer via the food chain as an essential issue for public health, the existence of resistant bacteria in food samples as well as in the environment and in patients has to be monitored. In our study in 2010 and 2011, we tested 60 *Campylobacter* isolates from the surface water, food and human clinical samples. First, *Campylobacter jejuni* and *C. coli* were isolated from water samples (17995:2005) and from chicken meat samples (ISO 102721 – 1:2006). Classical and molecular identification tests confirmed 19 isolates from the surface water and 21 isolates from meat samples. Additionally, 20 human clinical isolates from the Institute of Public Health Maribor were included in study. Finally, the microdilution method was used to determine the resistance of 60 isolates of *Campylobacter* against seven antibiotics (gentamicin, streptomycin, ciprofloxacin, tetracycline, erythromycin, nalidixic acid and chloramphenicol). The resistance to ciprofloxacin and nalidixic acid was detected most frequently; the highest percentages of resistant bacteria were isolated from food (90.5 % and 71.4 %), human stool (85 % and 70 %) and the surface water (15.8 % and 21.1 %). Furthermore, the highest prevalence of resistance of food isolates was confirmed for streptomycin (38.1 %), tetracycline (42.9 %), and erythromycin (33.3 %). Environmental and human isolates revealed 100 % sensitivity to erythromycin. *C. coli* isolates have been proven to be more resistant to antibiotics than *C. jejuni*. The results of the antibiotic resistance are comparable for food and human clinical isolates, especially when only *C. jejuni* is considered. On the other hand, the isolates from the surface water samples have been proven to be much more sensitive to antibiotics tested. The results do not indicate their role in the transmitting the infection to humans or animals.

KAZALO VSEBINE

| | str. |
|-------------------------------------|------|
| Ključna dokumentacijska informacija | III |
| Key words documentation | IV |
| Kazalo vsebine | V |
| Kazalo slik | VIII |
| Kazalo preglednic | IX |
| Kazalo prilog | X |
| Okrajšave in simboli | XI |

| | |
|--|-----------|
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 CILJI EKSPERIMENTALNEGA DELA | 2 |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i> | 3 |
| 2.2 PATOGENEZA..... | 4 |
| 2.3 EPIDEMIOLOGIJA | 5 |
| 2.3.1 Humane kampilobakterioze | 5 |
| 2.3.2 Prenos bakterij <i>Campylobacter</i> spp. z živili..... | 7 |
| 2.3.3 Preprečevanje prenosa bolezni..... | 10 |
| 2.4 ODPORNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i> PROTI ANTIBIOTIKOM | 10 |
| 2.4.1 Antibiotiki na splošno..... | 10 |
| 2.4.2 Razvoj bakterijske odpornosti | 12 |
| 2.4.2.1 Mehanizmi odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i> | 13 |
| 2.4.3 Prevalenca odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i> proti antibiotikom..... | 14 |
| 2.5 METODE DELA S KAMPILOBAKTRI V LABORATORIJU | 17 |
| 2.5.1 Izolacija in identifikacija | 17 |
| 2.5.1.1 Klasičen postopek..... | 18 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5.1.2 Molekularna metoda | 19 |
| 2.5.2 Ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom | 19 |
| 2.5.2.1 Difuzijske metode..... | 19 |
| 2.5.2.2 Dilucijske metode | 19 |
| 2.5.2.3 Primerjava metod določanja odpornosti | 21 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 22 |
| 3.1 POTEK DELA..... | 22 |
| 3.2 MATERIALI | 23 |
| 3.2.1 Mikroorganizmi in analizirani vzorci..... | 23 |
| 3.2.2 Gojišča | 23 |
| 3.2.2.1 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Bolton..... | 23 |
| 3.2.2.2 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Preston..... | 24 |
| 3.2.2.3 Trdno selektivno gojišče mCCDA (modificirani ogljeni cefoperazon deoksiholatni agar) | 25 |
| 3.2.2.4 Komercialno pripravljeno gojišče Sensititre® (Treck Diagnostic Systems) | 25 |
| 3.2.3 Priprava reagentov in raztopin | 26 |
| 3.2.3.1 Reagenti in raztopine za izvedbo hidrolize indoksil acetata (ISO 10272-1:2006(E))..... | 26 |
| 3.2.3.2 Reagenti in raztopine za izvedbo hidrolize hipurata (ISO 10272-1:2006(E)) | 26 |
| 3.2.3.3 Priprava raztopin antibiotikov | 26 |
| 3.2.4 Laboratorijski pribor in oprema | 27 |
| 3.3 METODE DELA..... | 28 |
| 3.3.1 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i> v površinskih vodah s klasično metodo (ISO 17995:2005)..... | 28 |
| 3.3.1.1 Priprava suspenzije celic s specifično težo 0,5 po McFarlandu za pozitivno kontrolo..... | 28 |
| 3.3.2 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i> v perutninskem mesu s klasično metodo (ISO 10272-1) | 29 |
| 3.3.3 Ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom z bujonsko mikrodilucijsko metodo na ploščicah Sensititre® (Trek Diagnostic Systems)..... | 29 |
| 3.3.3.1 Priprava kulture | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.3.2 Potek dela | 30 |
| 4 REZULTATI..... | 32 |
| 4.1 REZULTATI PREISKAV VZORCEV NA PRISOTNOST BAKTERIJ <i>Campylobacter</i> | 33 |
| 4.1.1 Površinske vode | 33 |
| 4.1.2 Živila | 33 |
| 4.2 REZULTATI MIKRODILUCIJSKE METODE DOLOČANJA MIK..... | 33 |
| 4.2.1 Površinske vode | 33 |
| 4.2.2 Živila | 37 |
| 4.2.3 Humaní sevi..... | 41 |
| 4.2.4 Primerjava rezultatov vseh vzorcev..... | 43 |
| 5 RAZPRAVA IN SKLEPI..... | 45 |
| 5.1 RAZPRAVA..... | 45 |
| 5.1.1 Analiza rezultatov ugotavljanja prisotnosti in odpornosti proti antibiotikom bakterij <i>Campylobacter</i> površinskih vod in piščančjega mesa | 45 |
| 5.1.1.1 Površinske vode..... | 45 |
| 5.1.1.2 Piščanče meso..... | 46 |
| 5.1.1.3 Odpornost humanih izolatov | 48 |
| 5.1.1.4 Pojav mnogokratne odpornosti pri vseh izolatih | 49 |
| 5.1.1.5 Primerjava med izolati..... | 50 |
| 5.2 SKLEPI..... | 52 |
| 6 POVZETEK..... | 53 |
| 7 VIRI | 54 |
| ZAHVALA | |
| PRILOGE | |

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Slika 1: Značilna oblika bakterij rodu <i>Campylobacter</i> spp. (Cordemans, 2008)..... | 3 |
| Slika 2: Značilna rast kampilobaktrov na gojišču z ogljem – mCCDA agar (foto: Kapel T). | 4 |
| Slika 3: Značilna rast kampilobaktrov na gojišču z dodano krvjo – krvni agar (foto: Kapel T). | 4 |
| Slika 4: Primerjava prijavljenih primerov črevesnih okužb pri ljudeh, povzročenih s salmonelami in kampilobaktri v Sloveniji v letih 2006-2010 (IVZ, 2011). | 7 |
| Slika 5: Pogostost bakterij <i>Campylobacter</i> pri živalih na farmi in na mesu (v klavnici, proizvodnji in prodaji) (EFSA, 2007, 2009, 2010a, 2011a, 2012a; Smole Možina in sod., 2011). | 8 |
| Slika 6: Pogostost bakterij <i>Campylobacter</i> v mesu v Sloveniji od leta 2006 do 2010 (VURS, 2010). | 9 |
| Slika 7: Pogostost kontaminiranih vzorcev mesa z bakterijami <i>Campylobacter</i> spp. v EU v letih 2007, 2008, 2009, 2010 (EFSA, 2012a). | 10 |
| Slika 8: Odstotek odpornosti proti posameznim antibiotikom bakterij <i>Campylobacter</i> spp., izoliranih iz ljudi v EU v letu 2010 (EFSA, 2012b). | 15 |
| Slika 9: Odstotek odpornosti proti posameznim antibiotikom bakterij <i>Campylobacter</i> spp., izoliranih iz perutninskega mesa v EU v letu 2010 (EFSA, 2012b). | 16 |
| Slika 10: Odstotek odpornih izolatov <i>Campylobacter</i> proti posameznim antibiotikom (izoliranih iz mesa in mesnih pripravkov brojlerjev in puranov – razsekovalnice in prodaja na drobno, feces in koža brojlerjev in puranov – razsekovalnice) Slovenija, 2008-2010 (VURS, 2010). | 17 |
| Slika 11: Primer prikaza difuzijske in dilucijske metode določanja protimikrobne odpornosti (Filipič, 1996). | 20 |
| Slika 12: Postopek celotnega eksperimentalnega dela..... | 22 |
| Slika 13: Prikaz odkrivanja bakterij <i>Campylobacter</i> v vodi po klasični metodi (ISO 17995:2005). | 28 |
| Slika 14: Prikaz odkrivanja bakterij <i>Campylobacter</i> v perutninskem mesu po klasični metodi (ISO 10272-1). | 29 |
| Slika 15: Shema mikrotitrtske ploščice Sensititre® za določanje odpornosti proti antibiotikom..... | 30 |
| Slika 16: Mikrotitrtska ploščica Sensititre® za določanje odpornosti proti 7 antibiotikom (foto: Kapel T.). | 31 |
| Slika 17: Prevalenca odpornosti proti antibiotikom sevov <i>C. jejuni</i> iz površinskih vod.... | 35 |
| Slika 18: Prevalenca odpornosti proti antibiotikom sevov <i>C. coli</i> iz površinskih vod. | 36 |
| Slika 19: Prevalenca odpornosti proti antibiotikom sevov <i>Campylobacter</i> spp. iz površinskih vod. | 36 |
| Slika 20: Prevalenca odpornosti proti antibiotikom sevov <i>C. jejuni</i> iz živil. | 38 |
| Slika 21: Prevalenca odpornosti proti antibiotikom sevov <i>C. coli</i> iz živil. | 39 |
| Slika 22: Prevalenca odpornosti proti antibiotikom sevov <i>Campylobacter</i> spp. iz živil... ... | 39 |
| Slika 23: Mnogokratna odpornost proti antibiotikom sevov <i>Campylobacter jejuni</i> iz živil (upoštevani antibiotiki gentamicin, ciprofloksacin, tetraciklin in eritromicin). | 40 |

| | |
|---|----|
| Slika 24: Mnogokratna odpornost proti antibiotikom sevov <i>Campylobacter coli</i> iz živil (upoštevani antibiotiki gentamicin, ciprofloksacin, tetraciklin in eritromicin). | 40 |
| Slika 25: Mnogokratna odpornost proti antibiotikom sevov <i>Campylobacter</i> spp. iz živil (upoštevani antibiotiki gentamicin, ciprofloksacin, tetraciklin in eritromicin). | 40 |
| Slika 26: Prevalenca odpornosti kampilobaktrov iz humanih kliničnih vzorcev. | 42 |
| Slika 27: Primerjava rezultatov odpornosti proti antibiotikom za izolate <i>Campylobacter</i> iz površinskih vod, živil in humanih kliničnih vzorcev. | 44 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Preglednica 1: Število prijavljenih primerov kampilobakterioze in salmoneloze in število prijavljenih primerov na 100.000 prebivalcev v Sloveniji in EU, 2006-2010 (EFSA, 2007, 2009, 2010a, 2011a, 2012a; IVZ, 2009, 2010)..... | 6 |
| Preglednica 2: Sestava osnovnega medija za gojišče Bolton (OxoidCM0983) | 24 |
| Preglednica 3: Sestava dodatka za selektivnost Bolton Broth selective supplement (Oxoid CM0983)..... | 24 |
| Preglednica 4: Sestavine dodatka za selektivnost v gojišču Preston (ISO 17995:2005(E)) | 24 |
| Preglednica 5: Sestavine dodatka zarast v gojišču Preston(ISO 17995:2005(E))..... | 24 |
| Preglednica 6: Sestava osnovnega medija CCDA (Oxoid CM0739)..... | 25 |
| Preglednica 7: Sestava dodatka za selektivnost CCDA (Oxoid SR0155) | 25 |
| Preglednica 8: Sestavine osnovnega medija Mueller-Hinton (Oxoid CM0337) | 26 |
| Preglednica 9: Primerjava odpornosti <i>Campylobacter jejuni</i> in <i>Campylobacter coli</i> proti antibiotikom po smernicah Evropske Unije (EUCAST, 2011) | 32 |
| Preglednica 10: Prikaz vrednosti MIK za antibiotike gentamicin, streptomicin, ciprofloksacin, tetraciklin, eritromicin, nalidiksinska kislina in kloramfenikol za izolate <i>Campylobacter</i> iz površinskih vod. | 34 |
| Preglednica 11: Prevalenca odpornosti (%) pri kampilobaktrih iz površinskih vod..... | 35 |
| Preglednica 12: Prikaz vrednosti MIK za antibiotike gentamicin, streptomicin, ciprofloksacin, tetraciklin, eritromicin, nalidiksinska kislina in kloramfenikol za izolate <i>Campylobacter</i> iz živil..... | 37 |
| Preglednica 13: Prevalenca odpornosti kampilobaktrov iz živil (%). | 38 |
| Preglednica 14: Prikaz vrednosti MIK za antibiotike gentamicin, streptomicin, ciprofloksacin, tetraciklin, eritromicin, nalidiksinska kislina in kloramfenikol za izolate <i>Campylobacter</i> iz humanih kliničnih vzorcev. | 41 |
| Preglednica 15: Prevalenca odpornosti kampilobaktrov iz humanih kliničnih vzorcev v številu (N) in odstotkih. | 42 |
| Preglednica 16: Prevalenca odpornosti izolatov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> iz površinskih vod in živil (%). | 43 |
| Preglednica 17: Primerjava prevalence odpornosti/občutljivosti izolatov analiziranih vzorcev. | 43 |

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati identifikacije bakterij *Campylobacter* s klasično (ISO 17995:2005) in molekularno metodo (PCR v realnem čadu) v vzorcih površinskih vod

Priloga B: Rezultati identifikacije bakterij *Campylobacter* s klasično metodo (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih perutninskega mesa

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|-------------------|---|
| CAMHBT | tekoče gojišče Mueller Hinton s pufrom TES |
| CAMHBT+LHB | tekoče gojišče Mueller Hinton s pufrom TES in dodatkom defibrinirane konjske krvi |
| CDC | Center za nadzor in preprečevanje bolezni (angl. Centers for Disease Control and Prevention) |
| CFU | število kolonijskih enot (angl. colony forming units) |
| CHL | kloramfenikol (angl. Chloramphenicol) |
| CIP | ciprofloxacin (angl. Ciprofloxacin) |
| <i>C. jejuni</i> | <i>Campylobacter jejuni</i> |
| <i>C. coli</i> | <i>Campylobacter coli</i> |
| dH ₂ O | destilirana voda |
| DNK | deoksiribonukleinska kislina |
| EFSA | Evropska agencija za varnost hrane (angl. European Food Safety Authority) |
| ERY | eritromicin (angl. Erythromycin) |
| GBS | Guillain-Barré-ov sindrom |
| GEN | gentamicin (angl. Gentamicin) |
| GryA | giraza A |
| HACCP | Analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk (angl. Hazard Analysis Critical Control Point) |
| ISO | Mednarodna organizacija za standardizacijo (angl. International Organization of Standardization) |
| IVZ | Inštitut za varovanje zdravja (National Institute of Public Health) |
| mCCDA | modificirani ogljeni cefoperazni deoksiholatni agar (angl. Modified Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar) |
| MIK | minimalna inhibitorna koncentracija (angl. MIC – minimim inhibitory concentration) |
| NAL | nalidiksinska kislina (angl. Nalidixic acid) |
| NK | negativna kontrola |
| PCR | verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction) |
| PK | pozitivna kontrola |
| QRDR | regija kinolonskih odpornostnih determinant (angl. Quinolone Resistance Determining Region) |
| rRNK | ribosomska ribonukleinska kislina |
| STR | Streptomycin (angl. Streptomycin) |
| VBNC | živo, vendar negojljivo stanje (angl. Viable But Not Culturable) |
| VURS | Veterinarska uprava Republike Slovenije (Veterinary Administration of the Republic of Slovenia) |
| WHO | Svetovna zdravstvena organizacija (angl. Word Health Organization) |
| ZZV MB | Zavod za zdravstveno varstvo Maribor (Institute of Public Health Maribor) |

1 UVOD

Bakterije rodu *Campylobacter* so majhni in ukrivljeni po Gramu negativni bacili, kateri so zaradi polarnih flagel gibljivi. Najbolje rastejo pri temperaturi med 37 °C in 42 °C v mikroaerofilni atmosferi. To so pogoji gastrointestinalnega trakta živali, ki je njihov naravni življenjski prostor. Najdemo jih predvsem v črevesju perutnine, nekoliko redkeje tudi v črevesju prašičev, goveda in drobnice.

Kampilobaktri povzročajo številne bolezni pri živalih in ljudeh. Bolezni, ki jih povzročajo, imenujemo kampilobakterioze. To so zoonoze, ki so zelo razširjene po vsem svetu. Človek se okuži z uživanjem okužene hrane, vode ali mleka in z neposrednim stikom z okuženimi živalmi (Andlovic, 2002). Pojav teh bolezni je v zadnjih letih pogostejši od pogostosti pojavljanja salmoneloz, kar je problem tako v živilski industriji, kot v medicini. Vzrok okužb s hrano je predvsem kontaminacija mesa s črevesno vsebinou živali v klavnici, ki jo je težko preprečiti, še posebej v klavnici perutnine. Zaradi navzkrižne kontaminacije lahko tako postanejo vir okužbe tudi druga živila in delovne površine med samim pripravo hrane (Van Deun in sod., 2007).

Vir sporadičnih okužb pri ljudeh je predvsem kontaminirano piščanče meso, redkeje povzročata izbruhe neobdelana pitna voda in kontaminirano surovo mleko. Okužbe s kampilobaktri potekajo predvsem kot vodene driske in minejo same po sebi v nekaj dneh z zadostnim nadomeščanjem tekočine. V redkejših primerih, ko nastopi hujša oblika bolezni s krvavo drisko ter traja več kot sedem dni, je potrebno antibiotično zdravljenje.

Glede na to, da so kampilobaktri, kot povzročitelji bakterijskih gastroenteritisov pri ljudeh v zadnjem desetletju v številnih razvitih državah na samem vrhu, skrb zbuja podatki o njihovi naraščajoči odpornosti proti nekaterim antibiotikom, ki se uporabljajo v humani in veterinarski medicini, pa tudi v prireji živali za hrano ljudi (Aarestrup in Engberg, 2001).

Odkritje in uporaba antibiotikov, je pomenila eno največjih revolucionarnih pridobitev v sodobni medici, tako v humani kot tudi v veterinarski. Pri ljudeh se uporablja za zdravljenje infekcijskih bolezni, pri živalih pa poleg terapevtskih namenov še kot profilaktiki v preprečevanju širjenja nalezljivih bolezni in kot pospeševalci rasti (Berce in sod., 2004). Slednja je v zadnjih letih zelo omejena, vendar uporaba antibiotikov, predvsem neustrezna in nekritična, omogoča selekcijo bakterijskih sevov, odpornih proti antibiotikom in celo usmerja evolucijo medicinsko pomembnih bakterij v razvoj odpornih vrst, kar se v praksi kaže z vse pogostejšimi neuspehi antibiotičnega zdravljenja (Seme, 2002). Tako je za učinkovito zdravljenje okužb s patogenimi bakterijami, med katere spada tudi *Campylobacter*, pomembno poznavanje mehanizmov, ki povečajo bakterijsko odpornost in vzrokov za nastanek le-teh. Zdravili izbora za zdravljenje kampilobakterioz v zelo redkih primerih, ko je potrebno antibiotično zdravljenje, sta makrolid eritromicin in fluorokinolon ciprofloxacin. Pred uvedbo kinolonov v veterinarsko praks je bila odpornost *Campylobacter* spp. proti kinolonom nepoznana. Čeprav so že pred tem uporabljali v humane namene makrolide, pojava odpornih sevov niso opazili. Po uvedbi in uporabi fluorokinolonov pri živalih pa je po celem svetu prišlo do porasta odpornosti

izoliranih *Campylobacter* spp. (Berce in sod., 2002). Tako lahko vzroke za pojav visoke odpornosti proti antibiotikom iščemo predvsem v prekomerni uporabi le-teh v veterini.

1.1 CILJI EKSPERIMENTALNEGA DELA

Namen našega eksperimentalnega dela je bil najprej pridobiti seve bakterij rodu *Campylobacter*, vrst *C. jejuni* in *C. coli*, iz različnih virov, pri čemer smo vključili izolacijo iz okoljskih vzorcev (vzorcev površinskih vod), živilskih vzorcev (vzorcev piščančjega mesa iz prodaje) ter iz humanih kliničnih vzorcev, pridobljenih v letu 2011.

Naslednji cilj pa je bila določitev odpornosti izoliranih sevov, proti sedmim različnim antibiotikom (gentamicin, streptomicin, ciprofloxacin, tetraciklin, eritromicin, nalidiksinska kislina in kloramfenikol) z mikrodilucijsko metodo v bujonu in primerjava dobljenih rezultatov glede na vir sevov in aktualne tendence naraščajoče odpornosti proti antibiotikom pri nas in v svetu.

Konkretni eksperimentalni cilji naloge so bili sledeči:

- Pridobitev primerljivega števila izolatov rodu *Campylobacter* iz okoljskih, živilskih in humanih vzorcev (vzorcev vod, piščančjega mesa in kliničnih vzorcev);
- Določitev minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) sedmih različnih antibiotikov za seve, pridobljene iz vzorcev površinskih vod, živil in bolnikov;
- Analiza odpornosti proti antibiotikom med humanimi, živilskimi in okoljskimi izolati;
- Potrditev pomena prenosa odpornosti bakterij *Campylobacter* spp. preko prehranske verige.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo naslednje:

- Površinske vode in piščanče meso so kontaminirani z bakterijami rodu *Campylobacter*, zato bodo dober vir za izolacijo okoljskih in živilskih sevov za nadaljnje analize odpornosti izolatov proti antibiotikom;
- Okoljski, živilski in humani izolati so podvrženi različnim pogojem, zato bo odpornost izolatov proti antibiotikom različna;
- Prevalenca odpornosti živilskih izolatov bo bolj podobna humanim izolatom kot okoljskim, ker je piščanče meso bolj pomemben vektor prenosa okužbe s kampilobaktri kot površinske vode.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU *Campylobacter*

Bakterije rodu *Campylobacter*, iz družine Campylobacteraceae, so po Gramu negativne in po obliki spiralno zavite paličice, ki so gibljive zaradi flageliranosti celic (imajo enopolarne ali bipolarne bičke). Celice so dolge 0,5-5 µm in široke od 0,2-0,8 µm. Bakterije ne tvorijo spor in ne fermentirajo ali oksidirajo ogljikovih hidratov (Humphrey in sod., 2007). Rastejo v temperaturnem območju med 37 in 45 °C z vrednostjo pH medija med 5,8 in 8,0 (Kelana in Griffiths, 2003). Optimalna temperatura rasti je 42 °C, zato jih pri tej temperaturi gojimo tudi laboratorijsko. Te temperature jih uvršajo med termotolerantne bakterije, najpomembnejši vrsti med njimi sta *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* (Hansson, 2007). Ne rastejo pri temperaturah pod 30 °C in s tem izključujejo možnost razmnoževanja v hrani. Njihova sposobnost preživetja pada pri ohlajanju ali zamrzovanju, kljub temu pa obstaja možnost, da preživijo pri teh pogojih daljše obdobje (Adams in Moss, 2008).



Slika 1: Značilna oblika bakterij rodu *Campylobacter* spp. (Cordemans, 2008).

Kampilobaktri so razmeroma počasi rastoče bakterije, ki zahtevajo posebne pogoje za gojenje. Kot mikroaerofilni mikroorganizmi najbolje rastejo pri znižani koncentraciji kisika v atmosferi s 5-10 % CO₂ in 3-5 % O₂ na hranilnih gojiščih s 5-10 % krvi (Hansson, 2007).

Pri različnih stresnih pogojih (pomanjkanje hranil, vode, nizka temperatura in prisotnost zraka) ali v primeru starih kultur se spremenijo v kokoidno obliko (Smole Možina in Uzunović-Kamberović, 2005).

Kokoidna oblika je lahko speče stanje bakterije, v katerem je bakterija negoljiva, ampak metabolno aktivna in se lahko v primerenem gostitelju povrne v prvotno stanje, ali pa degenerativna, neviabilna oblika (Klančnik in sod., 2006). Takih organizmov ne moremo izolirati z metodami gojitve, toda vseeno ostajajo infektivni (Rollinson in Colwell, 1986).

Prehod kampilobaktrov v živo, a negoljivo stanje (Viable but Non-Culturable – VBNC) spodbudi izpostavitev oksidativnemu stresu, nizkim temperaturam in stradanje. Navadno ga spremlja tudi morfološka spremembra iz spiralne v kokoidno obliko, vendar to ni nujno (Klančnik in sod., 2006).

Morfologija rasti bakterij *Campylobacter spp.* je lahko različna in odvisna od sestavin gojišča. Na agarjih, ki vsebujejo kri, najbolj tipična morfologija variira od krožnih kolonij do nepravilnih z gladkimi robovi, ki so značilno sivkaste in rahlo rožnate barve s kovinskim sijajem. Na gojiščih, ki temeljijo na oglju, rastejo sivkasto do bele kolonije s kovinskim sijajem (Hansson, 2007).



Slika 2: Značilna rast kampilobaktrov na gojišču z ogljem – mCCDA agar (foto: Kapel T.).



Slika 3: Značilna rast kampilobaktrov na gojišču z dodano krvjo – krvni agar (foto: Kapel T.).

2.2 PATOGENEZA

Za človeka in živali so bakterije *Campylobacter* pogosto patogene. Pri ljudeh se običajno pojavi akutna bakterijska okužba, medtem ko je pri živalih okužba nema, brez vidnih simptomov in znakov bolezni. So izjemno infektivni, zato lahko okužbo pri ljudeh povzroči že majhno število celic. Infektivna doza je med 500 in 10.000 celic in je odvisna od vrste in stanja bakterijskih celic ter dovezetnosti gostitelja, njegove imunske odpornosti in zdravstvenega stanja (Humphrey in sod., 2007). Glavna vrsta, vpletena pri infekcijah s kampilobaktri, je *C. jejuni*, ki je odgovoren za 80-85 % vseh enteričnih infekcij kampilobaktrov pri ljudeh, in *C. coli* kot druga (10-15 %). Ostali kampilobaktri, kot so *C. lari*, *C. upsaliensis* in *C. fetus*, so redko potrjeni (Moore in sod., 2005).

Okužba z bakterijami *Campylobacter* se najpogosteje pokaže kot akutni gastroenteritis, ki ga spremljajo vnetje in vodena driska, v hujši obliki kot krvava driska. Simptomi, ki se pojavljajo, so bolečine v trebuhu, slabo počutje in vročina (Andlovic, 2002), ter minejo v

nekaj dneh. Običajno se bolezen razvije v dveh ali treh dneh po zaužitju kontaminirane hrane in simptomi izginejo po edem tednu (Moore in sod., 2005). Tako bolezen poteka kot kratkotrajna driska, le v hujših primerih traja dlje kot teden dni. Zapleti so redki in se pojavljajo kot zunaj črevesna vnetja, npr. meningitis (Andlovic, 2002). Bakterije *Campylobacter* najprej kolonizirajo tanko črevesje in se nato razširijo še v debelo črevo, katero je tarčni organ bolezni (Poly in Guerry, 2008). Prva faza bakterijske infekcije je naseljevanje mukoznega sloja, ki prekriva črevesne epitelne celice. Črevesne okužbe povzročajo le gibljivi sevi, ki so se sposobni pritrdiriti na črevesno sluznico. Značilno je uničenje površine sluznice in s tem nastanek vnetja (Andlovic, 2002). Predvsem so ogroženi posamezniki s pomanjkanjem želodčne kisline.

2.3 EPIDEMIOLOGIJA

Kampilobaktri so v naravi zelo razširjeni in živijo kot komenzali ali povzročitelji bolezni v prebavilih, sečilih in rodilih številnih domačih in divjih živali (govedo, ovce, prašiči, perutnina, koze, psi, mačke, glodalci in zlasti različne ptice). *C. jejuni* najdemo v črevesju številnih živalskih vrst, medtem ko je *C. coli* razširjen predvsem med prašiči (Andlovic, 2002). V južnoevropskih državah, predvsem na Balkanu, je epidemiologija kampilobaktrov nakoliko drugačna. Bolj je razširjena vrsta *C. coli*, tako pri živalih (npr. perutnini) kot tudi povzročitelj okužb pri ljudeh (Smole M. in Uzunović-Kamberović, 2005).

Okužbe pri ljudeh s kampilobaktri so lahko posledica uživanja različnih živil, predvsem mesa, surovega mleka in mlečnih izdelkov, redkeje pride do okužbe z uživanjem rib in ribjih izdelkov, školjk ter zelenjave. Glavni viri sporadičnih okužb ljudi so kontakt s perutnino, uživanje premalo toplotno obdelanega mesa, uživanja vode iz neobdelanih vodnih virov, ter kontakt s hišnimi ljubljenčki in drugimi živalmi. Uživanje kontaminirane pitne vode in surovega mleka je pogosteje vzrok večjih izbruhov (EFSA, 2010a). Izbruhi, povezani s kontaminacijo pitne vode s *C. jejuni*, so predvsem skupni nordijskim državam, in sicer Švedski, Norveški in Finski, kjer v redko poseljenih območjih za podzemne vode ne uporabljajo dezinfekcije (Moore in sod., 2005).

V zadnjem času je eden izmed dejavnikov tveganja nastanka bolezni tudi vedno pogostejša potovanja po svetu in s tem posledično pojav potovalnih drisk.

Kampilobakterioza se pojavlja po vsem svetu, predvsem v zmernem pasu in ima značilnosti sezonskega obolenja, saj se več primerov obolenj pojavi v poznih spomladanskih in poletnih mesecih (Humphrey in sod, 2007). V tem času so znani dejavniki tveganja za bolezen bolj izraženi (uživanje premalo toplotno obdelanega mesa (priprava mesa na žaru), okužene hrane ali vode, surovega mleka, neposreden stik s hišnimi ljubljenčki, domačimi živalmi, kopanje v jezerih in potovanja v tujino) (Ekdale in sod., 2005). V manj razvitih državah zbolevajo predvsem otroci do 2 let, v razvitih pa mladi odrasli (18 do 45 let) (Andlovic, 2002).

2.3.1 Humane kampilobakterioze

Nalezljive bolezni, med katere spadajo tudi akutne črevesne okužbe, so najpogostejše bolezni v populaciji. Pomembne niso samo zaradi njihove pogostosti, temveč tudi zaradi

možnih trajnih posledic. Zato je pomembno pri preprečevanju nastanka le-teh njihovo spremljanje tako v Sloveniji in Evropski uniji kot po svetu.

V večini držav članic Evropske unije se izvaja sistem nadzora nad zoonozami – okužbami, ki se prenašajo z živali na človeka. Pri ljudeh sta danes najpogostejsa povzročitelja zoonoz črevesni bakteriji iz rodu *Salmonella* in *Campylobacter*. Podatke posameznih držav zbira in objavlja v obliki skupnih poročil Evropska agencija za varno hrano (EFSA).

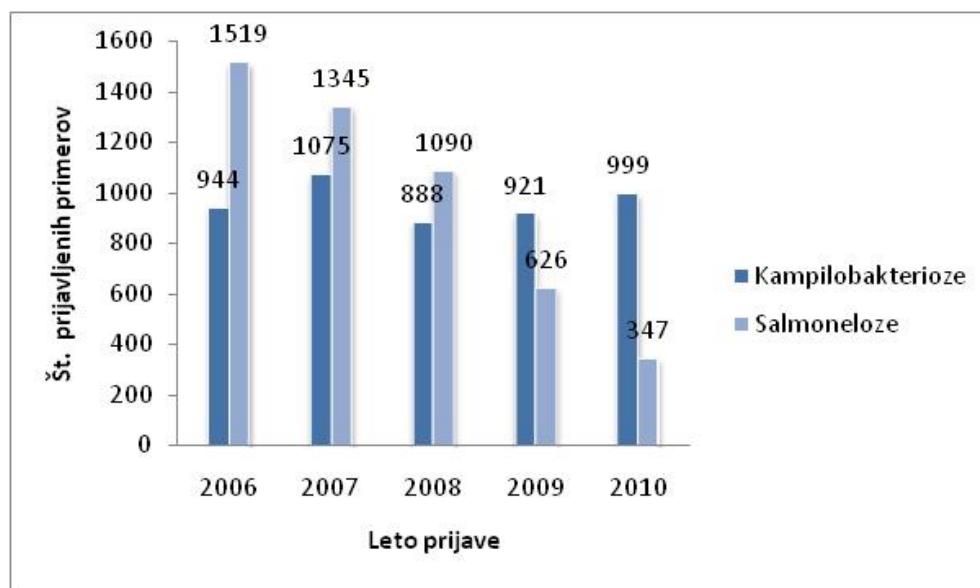
Po poročanju nekaterih literarnih virov se število kampilobakterioz počasi povečuje, število salmoneloz pa v zadnjih letih močno zmanjšuje, kar je razvidno iz preglednice 1, ki prikazuje podatke iz poročil Inštituta za varovanje zdravja v Sloveniji in organizacije EFSA za EU. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) ocenjuje, da je vsako leto okuženih približno 1 % prebivalstva Zahodne Evrope (Humphrey in sod., 2007). Podatki o prijavljenih primerih kampilobakterioz niso povsem natančni, saj naj bi po nekaterih virih na vsak prijavljen primer kampilobakterioze prišlo 9 primerov, ki ostanejo neprijavljeni (Humphrey in sod., 2007).

Preglednica 1: Število prijavljenih primerov kampilobakterioze in salmoneloze in število prijavljenih primerov na 100.000 prebivalcev v Sloveniji in EU, 2006-2010 (EFSA, 2007, 2009, 2010a, 2011a, 2012a; IVZ, 2009, 2010)

| Leto | Kampilobakterioze | | | | Salmoneloze | | | |
|------|-------------------|---|----------------|---|----------------|---|----------------|---|
| | Slovenija | | EU | | Slovenija | | EU | |
| | Število prijav | Incidenca (št. primerov/ 100.000 prebivalcev) | Število prijav | Incidenca (št. primerov/ 100.000 prebivalcev) | Število prijav | Incidenca (št. primerov/ 100.000 prebivalcev) | Število prijav | Incidenca (št. primerov/ 100.000 prebivalcev) |
| 2006 | 944 | 47,1 | 175561 | 46,1 | 1519 | 75,7 | 164011 | 34,6 |
| 2007 | 1075 | 53,7 | 200507 | 45,2 | 1345 | 67,1 | 151998 | 31,2 |
| 2008 | 888 | 43,9 | 190566 | 43,9 | 1090 | 54,3 | 131468 | 26,4 |
| 2009 | 921 | 45 | 198252 | 45,6 | 626 | 30,7 | 108614 | 23,7 |
| 2010 | 999 | 48,9 | 212064 | 48,6 | 347 | 16,9 | 99020 | 17,4 |

V letu 2006 je bilo v EU zabeleženih 175.561 primerov kampilobakterioz, kar pomeni 46,1 primerov na 100.000 prebivalcev. Število primerov prijav je v letu 2007 naraslo v primerjavi z letom 2006 na 200.507. Povprečna incidenca se je zmanjšala, najverjetneje zaradi vstopa novih članic v EU v letu 2007 s slabšim nadzorom oz. sistemom epidemiološkega nadzora okužb v svojih državah. Večina članic EU, med njimi tudi Slovenija, je poročala o porastu kampilobakterioz v letu 2007. V letu 2008 se je incidenca kampilobaktetrioz zmanjšala na 40,7 primerov na 100.000 prebivalcev, skupaj je bilo zabeleženih 190.566 primerov. V letu 2009 je bilo število prijav 198.252, povprečna incidenca se je povečala iz 43,9 na 45,6 primerov na 100.000 prebivalcev (EFSA, 2007, 2009, 2010a, 2011a). V letu 2009 je bilo največje število prijav v Romuniji, medtem ko se je v Avstriji močno zmanjšalo (iz 51,4 se je zmanjšalo na 18,1 na 100.000 prebivalcev) (EFSA, 2011a). V primerjavi z letom 2009, se je v letu 2010 število prijavljenih okužb povečalo iz 198.252 na 212.064 in povprečna incidenca se je povečala iz 45,6 na 48,6 primerov na 100.000 prebivalcev. Največ prijavljenih primerov je bilo na Češkem in najmanj v Litvi (EFSA, 2012a). V letu 2010 je opazen porast števila prijavljenih kampilobakterioz in očiten padec salmoneloz v evropskih državah.

V primerjavi podatkov med Slovenijo in EU je razvidno zelo podobno nihanje primerov prijav kampilobakterioz, saj je bilo v letu 2006 primerov prijav manj kot v letu 2007, iz 944 prijavljenih primerov se je dvignilo na 1075, kar pomeni da je bila incidenca v Sloveniji v letu 2007 53,7 na 100.000 prebivalcev. V letu 2008 je število prijavljenih primerov padlo na 888, v letu 2009 pa se je ponovno povisala in je bilo 921 prijav, incidenca je bila 45 primerov na 100.000 prebivalcev. Tudi v letu 2010 se je incidenca povisala na 48,9 na 100.000 prebivalcev, saj je bilo prijav 999 (EFSA, 2007, 2009, 2010a, 2011a, 2012a; IVZ, 2010).



Slika 4: Primerjava prijavljenih primerov črevesnih okužb pri ljudeh, povzročenih s salmonelami in kampilobaktri v Sloveniji v letih 2006-2010 (IVZ, 2011).

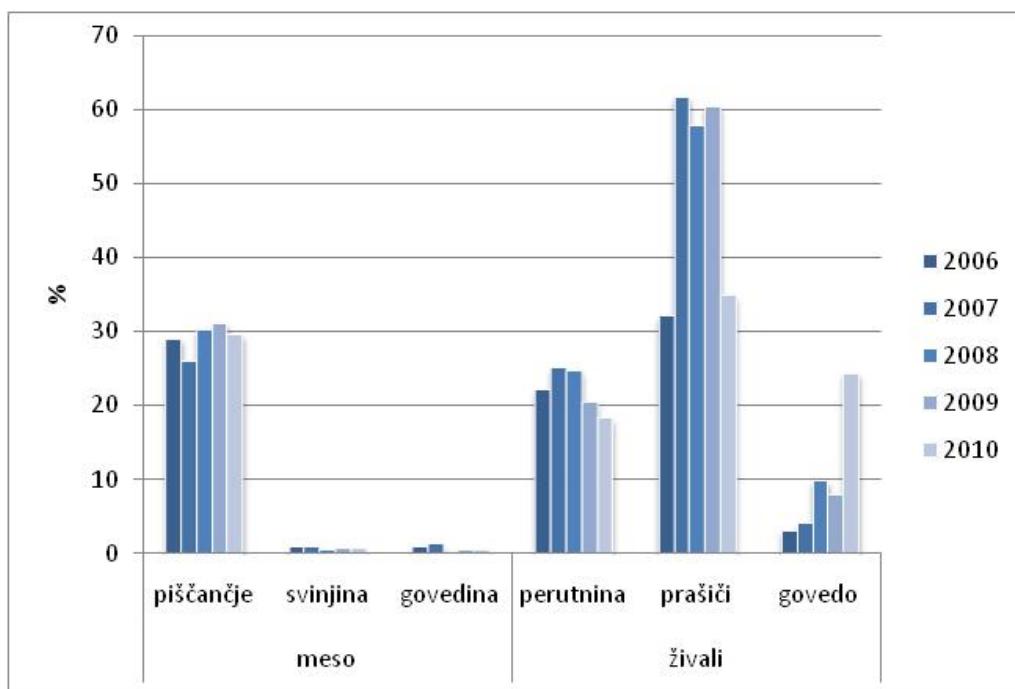
V primerjavi s salmonelozo je porast kampilobakterioz v zadnjih letih višji v večini držav Evropske unije, tudi v Sloveniji. Ta trend se kaže predvsem od leta 2009. V teh letih se je največji porast pokazal na Cipru, v Estoniji, Franciji, Luksemburgu, na Malti, Nizozemskem in Poljskem. Medtem pa je bil zabeležen največji padec števila prijavljenih kampilobakterioz v Belgiji in Romuniji (EFSA, 2011a, 2012a; IVZ, 2010, 2011). V Združenih državah Amerike se število okužb s kampilobaktri med ljudmi giblje skozi leto med 2,1 in 2,5 milijonov prebivalcev, in se z leti povečuje (CDC, 2010). Zato je postal *Campylobacter* spp. najpogosteji povzročitelj gastrointestinalnih okužb v večini držav Evropske unije in ZDA.

Najpogosteji povzročitelj okužbe pri ljudeh je vrsta *C. jejuni* (EFSA, 2011a, 2012a).

2.3.2 Prenos bakterij *Campylobacter* spp. z živili

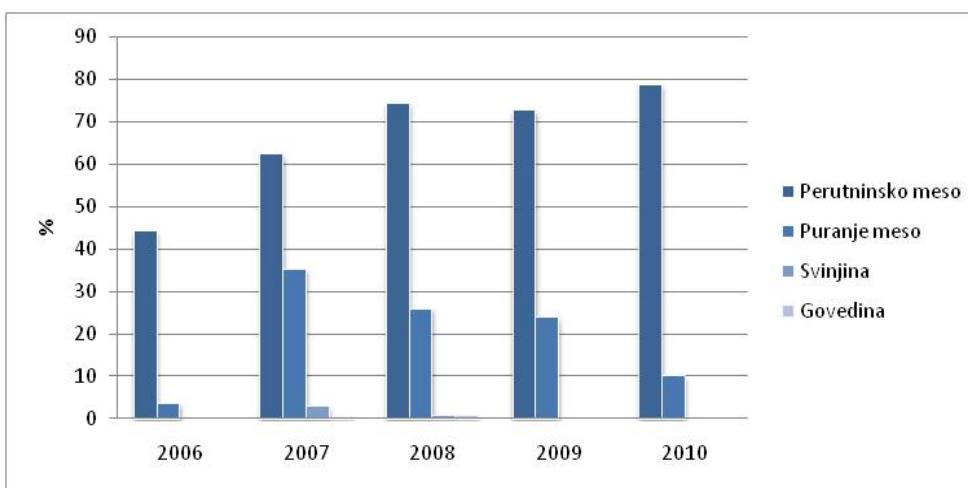
Najpogosteji vzrok okužb pri ljudeh z bakterijami *Campylobacter* je uživanje kontaminirane hrane živalskega izvora (Moore in sod., 2005), predvsem je izpostavljen perutninsko meso, ki ima najvišjo stopnjo kontaminacije s temi bakterijami.

Najpogosteje je okuženo meso brojlerjev, puranov in rac, v manjših odstotkih se pojavlja pri mesu prašičev in goveda. Analizirani vzorci mesa so bili odvzeti v klavnicih, živilski predelavi in v prodaji. V letu 2009 je bilo največ okuženih vzorcev perutninskega mesa odvzetega v klavnicah in predelavi v Španiji (95,8 %; 70,7 %), najmanj pa v Estoniji (klavnice 6,5 %) in Belgiji (predelava 9,0 %). V letu 2010 pa je bilo največ okuženih vzorcev perutninskega mesa odvzetega v klavnicah na Irskem (63,4 %) in v predelavi v Avstriji (90 %) ter najmanj v Estoniji (8,5 %) in Belgiji (8,9 %). Odstotek pozitivnih vzorcev iz prodaje v Evropi variira od 3,1 % v Avstriji do 58,8 % v Luksemburgu. Pri brojlerjih in perutnini pa se pojavnost kampilobaktrov povečuje, tako v jatah, kot tudi posledično v trupih in mesu perutnine (EFSA, 2012a).



Slika 5: Pogostost bakterij *Campylobacter* pri živalih na farmi in na mesu (v klavniči, proizvodnji in prodaji) (EFSA, 2007, 2009, 2010a, 2011a, 2012a; Smole Možina in sod., 2011).

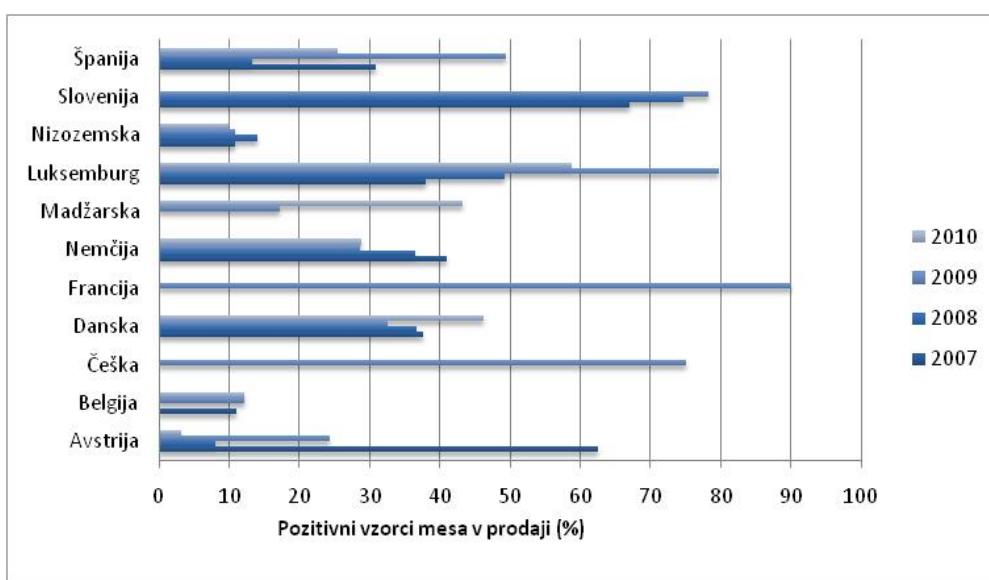
V evropskih državah poročajo, da so najpogosteje vzroki okužbe s kampilobaktri perutninsko meso, svinjina in govedina. Do okužbe lahko pride tudi z uživanjem kontaminiranega surovega mleka in mlečnih izdelkov. Tako se je v letu 2010 odstotek pozitivnih vzorcev mleka in mlečnih izdelkov gibal med 0 in 4,7 %. Analizirani so bili tudi vzorci sadja in zelenjave, vendar nobeden ni bil kontaminiran z bakterijami *Campylobacter*.



Slika 6: Pogostost bakterij *Campylobacter* v mesu v Sloveniji od leta 2006 do 2010 (VURS, 2010).

V Sloveniji je glede na število analiziranih vzorcev mesa največ okuženega mesa perutnine (piščančje in puranje meso). Odstotek kontaminiranega piščančjega mesa se je po poročilu Veterinarske uprave RS povečal v letih 2006 do 2010 iz 44 % na 79 %. Ob tem ni jasno, koliko je k temu velikemu povečanju izboljšana diagnostika, koliko pa je dejansko povečanje deleža kontaminiranih vzorcev. Odstotek kontaminiranega puranjega mesa se je iz leta 2006 v leto 2007 povišal (iz 3,8 na 35,4), po letu 2007 pa padal vse do leta 2010 in dosegel vrednost 10,2 %. V letih 2007 in 2008 je bilo analizirano tudi meso prašičev in goveda, ki pa se je v letih 2009 in 2010 ukinilo zaradi nizkega števila prisotnosti kampilobaktrov.

Odstotek pojavljanja okuženega mesa je v državah Evropske unije različen. Višji odstotki so v državah Južne Evrope, predvsem zaradi klimatskih razmer, ki omogočajo hitrejši prenos okužbe kot v skandinavskih državah. Pri predelavi živil živalskega izvora je zelo pomembno, da se prepreči stik med črevesno vsebino živali in mesom, da se prepreči navzkrižna kontaminacija in s tem prenos okužbe na ljudi.



Slika 7: Pogostost kontaminiranih vzorcev mesa z bakterijami *Campylobacter* spp. v EU v letih 2007, 2008, 2009, 2010 (EFSA, 2012a).

Glede na odstotek kontaminiranega mesa z bakterijami *Campylobacter* v prodaji spada Slovenija, skupaj z Luksemburgom, Francijo in Češko, v sam vrh evropskih držav (EFSA, 2011a, 2012a).

2.3.3 Preprečevanje prenosa bolezni

Kampilobakterioza je infekcijska okužba s termotolerantnimi bakterijami *Campylobacter*. Glede na izvor bolezni spada med zoonoze, kar pomeni, da se prenaša na ljudi preko živali, prenos je lahko direkten s kontaktom (prenos iz živali na človeka, prenos s človeka na človeka) ali z uživanjem kontaminirane hrane živalskega izvora (Moore in sod., 2005). Za preprečitev okužb s kampilobaktri je potrebna dobra kmetijska praksa in dobra higienička praksa skozi ves postopek predelave živila. To vključuje npr. uporabo neoporečne vode za napajanje živali, vzdrževanje ustrezne higiene, preprečitev navzkrižne kontaminacije med rejo in klanjem ter med končno pripravo hrane (Humphrey in sod., 2007).

Veliko primerov kampilobakterioz je sporadičnih ali v obliki manjših izbruhov znotraj družin. Zato je pomembno ločevanje hrane, ki je vektor prenosa kampilobaktrov in jo bomo toplotno obdelali ločeno od hrane, ki jo bomo zaužili surovo. Paziti moramo tudi na higieno delovnih površin in kuhinjskih pripomočkov, s katerimi obdelujemo potencialno okuženo hrano. Le tako se lahko izognemo navzkrižni kontaminaciji (Humphrey in sod., 2007).

2.4 ODPORNOSTI BAKTERIJ RODU *Campylobacter* PROTI ANTIBIOTIKOM

2.4.1 Antibiotiki na splošno

Antibiotiki so naravne snovi, ki ovirajo razmnoževanje mikroorganizmov in so proizvod živilih celic, predvsem gliv in bakterij. Sodobni antibiotiki so večinoma kemoterapevtiki in

so izdelani s sintezo ali kemijsko modifikacijo naravnega antibiotika. Z antibiotiki oz. kemoterapevtiki preprečujemo razmnoževanje in rast bakterij (Kotnik, 2002).

Antibiotike razdelimo v skupine glede na njihovo delovanje in kemično zgradbo. V bakteriji imajo različna ciljna mesta, kjer delujejo.

Glede na mehanizem delovanja razlikujemo 4 vrste antibiotikov in sicer takšne, ki:

- Preprečujejo sintezo celične stene (npr. penicilini, cefalosporini, glikopeptidi, bacitracin);
- Delujejo na sintezo znotrajceličnih beljakovin (npr. ribosomi podenota 30S (aminoglikozidi, tetraciklini) in ribosomi podenota 50S (makrolidi, kloramfenikol, linkozamidi, fucidinska kislina));
- Vplivajo na sintezo jedrnih kislin (npr. kinoloni, sulfonamidi, trimetroprim, rifampicin, metronidazol);
- Ovirajo dejavnosti, povezane s citoplazemske membrano (npr. polimiksini, amfotericin, nistatin, imidazol) (Kotnik, 2002).

V primerih okužbe ljudi s kampilobaktri, ko je potrebno antibiotsko zdravljenje ali kemoprofilaksa potovalne driske, sta zdravili izbora makrolid eritromicin in fluorokinolon ciprofloxacin (Berce in sod., 2004), makrolidi kot antibiotiki izbora prve terapije in fluorokinoloni kot izbor druge terapije (Gallay in sod., 2007).

Pomembne skupine antibiotikov, ki se uporabljajo v humani in veterinarski medicini, so naslednje:

- a.) Makrolidi so skupina antibiotikov, kateri delujejo kot zaviralci sinteze proteinov, saj se vežejo na 50S podenoto in s tem zavrejo podaljševanje polipeptidne verige. Tvorba beljakovin se prehitro zaključi in posledica je bakteriostatično delovanje. Najbolj poznan predstavnik te skupine je eritromicin. Po sestavi so to spojine z velikim laktonskim obročem z več ketonskimi in hidroksilnimi skupinami. Pri zdravljenju okužb s kampilobaktri se najbolj pogosto uporablja eritromicin, ki se veže na 50S ribosomske podenote ter tako inhibira translokacijo v proteinski sintezi (povzroči disociacijo peptidil-tRNA iz ribosoma) (Vester in Douthwaite, 2001).
- b.) Tetraciklini so antibiotiki, ki zavirajo sintezo beljakovin s tem, da se vežejo na 30S ribosomske podenote. Med najbolj poznanimi je tetraciklin, ki ga v naravi sintetizirajo bakterije iz rodu *Streptomyces*. Na osnovi te molekule so razvili kemično druge tetraciklinske antibiotike. Imajo širok spekter delovanja, saj učinkujejo tako na po Gramu negativne in pozitivne bakterije kot tudi na rikecije, mikoplazme, klamidije, spirohete, leptospire in amebe (Varagič in Miloševič, 1999).
- c.) Aminoglikozidi so spojine, ki imajo za sestavni skupini sladkorne in aminske skupine. Imajo antibiotične lastnosti in delujejo na številne bakterije. Mednje spadajo amikacin, gentamicin, neomicin, tobramicin, streptomycin. Med najbolj poznanimi sta antibiotika streptomycin in gentamicin. Njihovo delovanje temelji na

zaviranju sinteze proteinov z vezavo na 50S mesto ribosoma, hkrati pa delujejo še na bakterijsko membrano. Delujejo predvsem na G- bakterije in jih uporabljamo za zdravljenje okužb (Varagič in Miloševič, 1999).

- d.) Kinoloni so antibiotiki popolnoma sintetičnega izvora in delujejo kot zaviralci sinteze bakterijskih jedrnih kislin. Imenujemo jih tudi zaviralci giraze. Giraza je encim, ki sodeluje pri podvajjanju DNK. Med te spadajo nalidiksinska kislina, ciprofloksacin, lomefloksacin, ofloksacin. Kinoloni so znani kot zelo učinkoviti antibiotiki proti po Gramu negativnim bakterijam, ki so rezistentne na penicilin, cefalosporine in aminoglikozide. Imajo torej širok spekter delovanja, dobro absorbциjo in hitro razporeditev v tkivih (Kotnik, 2002).
- e.) Kloramfenikol je antibiotik, ki deluje kot zaviralec sinteze proteinov, ker se veže na tarčno mesto 50S ribosomske podenote. Je antibiotik širokega spektra delovanja, saj deluje proti številnim različnim mikroorganizmom (G+ in G- bakterije, anaerobne in aerobne, klamidije). Glede na samo količino antibiotika lahko deluje bakteriostatično ali baktericidno (Kotnik, 2002).

Antibiotiki delujejo kot močan seleksijski pritisk na populacije bakterij, ki so zaradi kratkega generacijskega časa sposobne hitro razviti mehanizme za odpornost. Ti mehanizmi vključujejo encime za razgradnjo učinkovin ali spremembe v steni oz. membrani, ki preprečujejo, da bi učinkovina uspešno prehajala v celico in se v njej akumulirala v inhibitorni oz. baktericidni koncentraciji.

2.4.2 Razvoj bakterijske odpornosti

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

Odpornost bakterij proti antibiotikom lahko opredelimo kot njihovo sposobnost, ki je lahko trajna ali začasna, da zmanjšajo ali izničijo učinke antibiotika. Kljub prisotnosti antibiotika s tako sposobnostjo preživijo in se še naprej razmnožujejo. Delovanje posameznih antibiotikov vrednotimo z minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK), ki nam pove, katera najmanjša koncentracija antibiotika inhibira vidno rast testnega mikroorganizma (Avrain in sod., 2003). Določanje vrednosti MIK je uporabno za vrednotenje relativne stopnje občutljivosti bakterij proti različnim protimikrobnim snovem in za primerjanje relativnih aktivnosti agensov proti različnim vrstam mikroorganizmov (Burt, 2004). Tako lahko glede na vrednost MIK določimo učinkovitost protimikrobnega sredstva. Če se pojavlja spremembra v občutljivosti mikroorganizma do določenega protimikrobnega sredstva, to pomeni, da je organizem razvil odpornost, saj ga začne zavračati in se nanj več ne odziva. Raziskave so pokazale, da so vrednosti MIK za različne mikroorganizme v bujonu nekoliko nižje kot na agarju (Burt, 2004).

Bakterijska odpornost je lahko naravna ali pridobljena. O naravni (intrinzični) odpornosti bakterij proti antibiotikom govorimo, kadar je vsa bakterijska vrsta odporna proti neki skupini antibiotikov. Pridobljeno odpornost proti antibiotikom imajo samo posamezni sevi neke bakterijske vrste ali rodu. Lahko je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne bakterijske celice ali pridobitve nove genetske informacije z genskim prenosom iz druge baterijske celice, predvsem s konjugacijo ali transformacijo (Seme, 2002).

Poznamo 5 osnovnih mehanizmov bakterijske odpornosti proti antibiotikom (Seme, 2002):

- sprememba tarčnega mesta oz. prijemališča antibiotika;
- encimska razgradnja antibiotika;
- neprepustnost oz. zmanjšana prepustnost celične membrane na antibiotik;
- sprememba presnovne poti, na katero deluje antibiotik;
- aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice z aktivnim prenosom.

Vzrokov povečane pridobljene odpornosti je veliko. Mednje spadajo tudi nepravilna uporaba antibiotikov, neurejena prodaja antibiotikov (prodaja »pod pultom«), slabo profesionalno poznavanje antibiotikov, pomanjkljivo spremljanje gibanja odpornosti bakterij, pomanjkljiva bolnišnična higiena, naraščanje števila imunokompromitiranih bolnikov in starostnikov, naraščanje pogostosti potovanj po celem svetu, neupoštevanje principov HACCP-sistema pri proizvodnji hrane živalskega izvora, velika uporaba antibiotikov in kemoterapevtikov pri živalih v profilaktične namene in uporaba antibiotikov kot biostimulatorjev za pospeševanje rasti (Berce in sod., 2004).

2.4.2.1 Mehanizmi odpornosti bakterij *Campylobacter*

Glede na vrsto antibiotika so kampilobaktri razvili določen mehanizem odpornosti. Antibiotiki prehajajo v bakterijsko celico po različnih poteh, ki so odvisne od njihove strukture. Prva ovira za antibiotike je selektivna prepustnost membrane. Tako majhni hidrofilni antibiotiki prehajajo skozi membranske pore, medtem ko hidrofobni skozi lipidne membrane (Jeon in sod., 2010).

Luangtongkum in sod. (2009) poročajo, da je rezistenca proti fluorokinolonom večinoma posledica točkovne mutacije v regiji (QRDR – quinolone resistance-determining region), ki določa odpornost proti kinolonom v dednem zapisu giraze A (Gyr A). Na girazi B ni poznane nobene mutacije, ki bi bila povezana s pojavom rezistence na kinolone pri kampilobaktrih. Pri Gram negativnih bakterijah so v odpornosti na kinolone vključeni tudi geni, ki kodirajo topoizomerazo IV, toda bakterije *Campylobacter* teh genov nimajo. Pri kampilobaktrih so vse znane determinante za odpornost proti fluorokinolonom kodirane na kromosому. Najpogostejsa mutacija je sprememba C2567T v genu GyrA, ki vodi do zamenjave T86I v girazi in povzroča visoko odpornost proti fluorokinolom. Dodatno odpornost, poleg mutacije v GyrA, povzroča tudi aktivnost izlivne črpalk CmeABC, ki deluje sinergistično z mutacijo v GyrA, saj aktivno izloča antibiotik iz celice (Luangtongkum in sod., 2009). Pomembno vlogo pri pojavljanju odpornosti proti tem antibiotikom imajo tudi geni CmeA, CmeB in cmeG, ki kodirajo proteine membranskih izlivnih črpalk CmeABC, CmeDEF in CmeGH. Vsi lahko povečajo odpornost

kampilobaktrov proti ciprofloxacinu, gentamicinu, tetraciklinu, etidijevem bromidu, žolčni kislini in vodikovem peroksidi (Jeon in sod., 2010).

Odpornost proti makrolidom pri kampilobaktri je povezana s tarčno modifikacijo in aktivnim izlivom. Do modifikacije ribosomske tarče pride s točkovno mutacijo v 23S rRNA in/ali proteinih L4 in 22 ali z encimsko posredovano metilacijo. Pri sevih *Campylobacter jejuni* in *C. coli* je najpogostejsi mehanizem odpornosti proti makrolidom točkovna mutacija v 23S rRNA (Luangtongkum in sod., 2009). K dodatni odpornosti pripomorejo tudi izlivne črpalke CmeABC, saj če pride do inaktivacije črpalke se odpornost ponovno poveča. Oba procesa skupaj, tarčna modifikacija in aktiven izliv, omogočata odpornost hkrati proti makrolidom (eritromicin, azitromicin) in ketolidom (Jeon in sod., 2010; Luangtongkum in sod., 2009).

Odpornost proti tetraciklinom pri bakterijah *Campylobacter* je posredovana z zapisom tet(O), ki je edini gen tet, ki ga najdemo pri kampilobaktri. Je zelo razširjen med izolati iz živali. Tet(O) kodira ribosomski zaščitni protein, ki prepozna vezavno mesto A na ribosому in se veže z njim, da pride do konformacijske spremembe ribosoma, kar povzroči sprostitev vezane molekule tretraciklina. Ta zapis tet(O) se ponavadi nahaja na plazmidu, nekateri sevi *Campylobacter* pa ga imajo na kromosому. Izlivne črpalke CmeABC pripomorejo k povečani odpornosti tudi pri tetraciklinu (Luangtongkum in sod., 2009).

Večina avtorjev poroča o odpornosti na antibiotike, ki spadajo v skupine fluorokinolonov, makrolidov in tetraciklinov, medtem ko o pojavu odpornosti na druge antibiotike ni toliko znanega (Luangtongkum in sod., 2009; Jeon in sod., 2010; Moore in sod., 2005). To je razumljivo, saj se za tretiranje kampilobakterioz uporablja predvsem antibiotiki iz teh treh skupin.

2.4.3 Prevalenca odpornosti bakterij *Campylobacter* proti antibiotikom

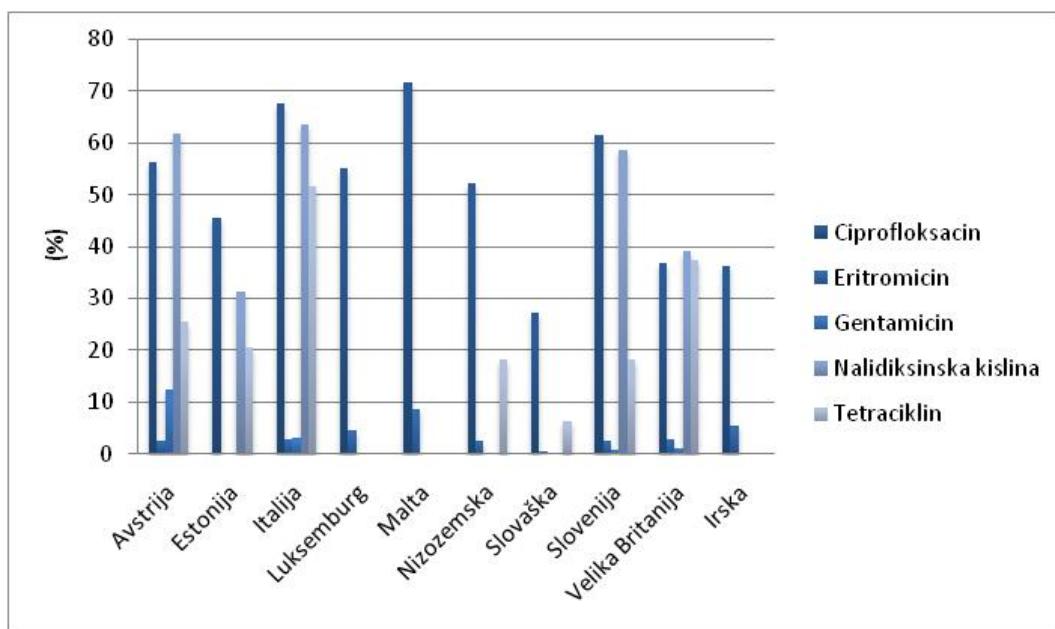
Odpornost proti antibiotikom je poseben problem pri patogenih bakterijah v prehranski verigi. Več kot 50 let so bile protimikrobne snovi temeljna komponenta pri zdravljenju infekcijskih bolezni, tako v humani kot veterinarski medicini. Pretirana uporaba je povzročila povečano pogostost mikroorganizmov, odpornih proti protimikrobnim zdravilom. Posledice odpornosti v javnem zdravstvu lahko vključujejo povečano pogostost napak v zdravljenju in resnosti infekcij, predolgo trajajoče bolezni, ter s tem napredovanje bolezni, podaljšanje hospitalizacije in možnost smrti (Newell in sod., 2010).

O hitrem porastu odstotka proti antibiotikom odpornih sevov bakterij *Campylobacter* spp. poročajo iz mnogih držav Evrope in sveta (Luangtongkum in sod., 2009). Pred uvedbo kinolonov v veterinarsko praks je bila odpornost *Campylobacter* spp. proti kinolonom nepoznana. Čeprav so se že pred tem uporabljali v humane namene makrolidi, pojava rezistentnih sevov niso opazili. Po uvedbi in uporabi fluorokinolonov pri živalih pa je po celem svetu prišlo do porasta odpornih izoliranih *Campylobacter* spp. (Aerstrup in Wegener, 1999; Engberg in sod., 2001; White in sod., 2002).

Konec 80.-ih let so bili registrirani fluorokinoloni za veterinarsko uporabo v Kanadi in ZDA, v 90.-ih letih pa so jim sledile še številne druge države (Engberg in sod., 2001). Pred

tem ni bilo opaziti odpornih sevov kampilobaktrov proti fluorokinolonom (predvsem ciprofloksacinu). V zadnjih letih pa je glede na poročila odpornost humanih kliničnih sevov v ZDA okoli 47 % vseh izoliranih sevov. Prav tako je odporen velik odstotek izolatov iz živali in ljudi v evropskih državah, saj se giblje med 17 in 99 %, kjer izstopa Španija z najvišjo odpornostjo. Podoben trend naraščanja odpornosti, po 90.-ih letih, je opazen tudi v Afriki in Aziji (predvsem Tajska in Honkong z 80 % odpornih sevov), medtem ko je odstotek odpornih izolatov v Avstraliji in Novi Zelandiji v primerjavi veliko nižji (Luangtongkum in sod., 2009).

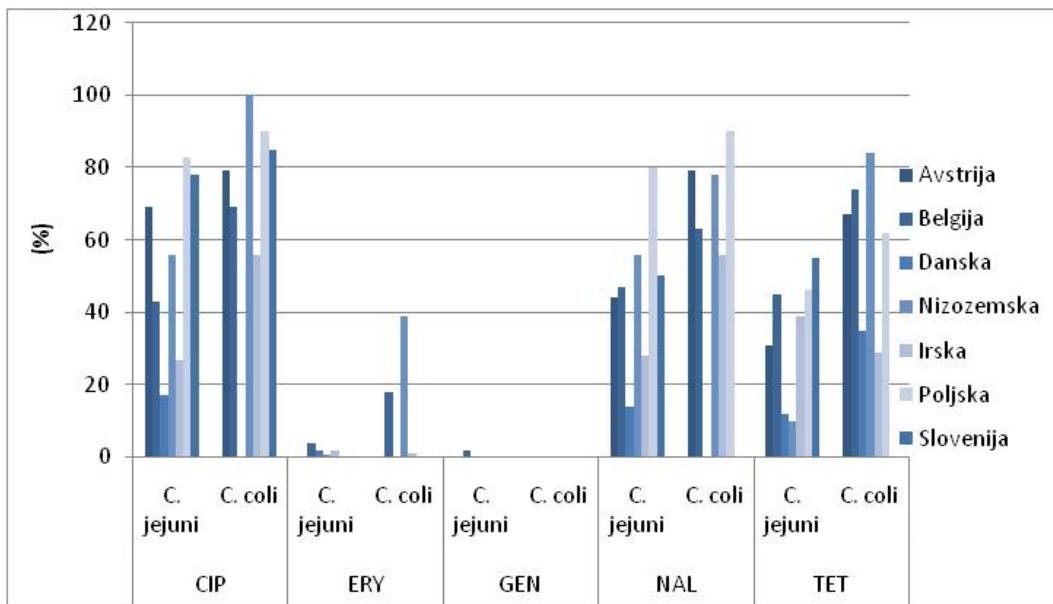
V nekaterih državah EU in ZDA opažajo tudi povečano odpornost proti makrolidom, predvsem eritromicinu. Na splošno je odstotek odpornosti proti eritromicinu bakterij *Campylobacter*, vključena oba najpogostejsa seva *C. jejuni* in *C. coli*, izoliranih iz ljudi in živali, v Kanadi in ZDA nizka (10 % ali manj). Podobno velja tudi za *Campylobacter*, izoliran iz ljudi in *C. jejuni*, izoliran iz živali v evropskih državah, kjer je stopnja odpornosti nizka in stabilna. Problematična in povisana je odpornost proti eritromicinu vrste *C. coli*, izoliranih iz živali. Opažanja pri sevih so podobna tudi na drugih kontinentih (Azija, Avstralija) (Luangtongkum in sod., 2009).



Slika 8: Odstotek odpornosti proti posameznim antibiotikom bakterij *Campylobacter* spp., izoliranih iz ljudi v EU v letu 2010 (EFSA, 2012b).

V državah Evropske unije se je v letu 2010 največkrat in najštevilčnejše pojavljala odpornost bakterij *Campylobacter* proti ciprofloksacinu. Najvišji odstotki odpornih izolatov se pojavljajo v državah Južne in Srednje Evrope (Malta, Slovenija, Italija, Avstrija), kjer je tudi kontaminacija mesa s kampilobaktri visoka. Odpornost proti eritromicinu je zastopana v najnižjih odstotkih ali pa je v nekaterih državah ni (EFSA, 2012b).

Sevi *Campylobacter* izolirani iz ljudi so imeli visoko stopnjo odpornosti proti ciprofloxacinu, nalidiksinski kislini in tetraciklinu, medtem ko je bila najnižja odpornost proti eritromicinu.

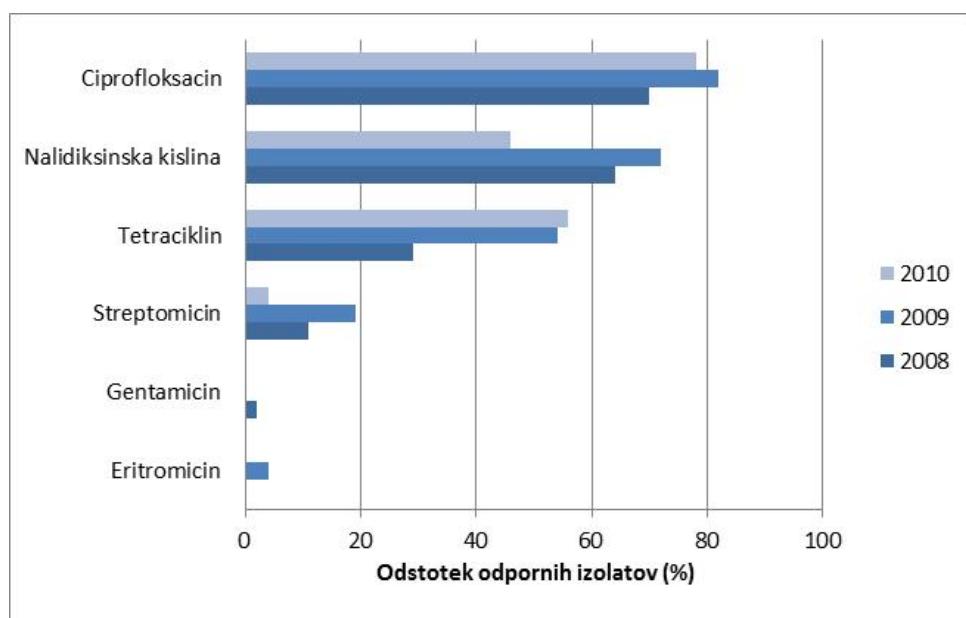


Slika 9: Odstotek odpornosti proti posameznim antibiotikom bakterij *Campylobacter* spp., izoliranih iz perutninskega mesa v EU v letu 2010 (EFSA, 2012b).

Pojav odpornosti izolatov *Campylobacter* iz hrane (perutninsko meso) in živali (piščanci, prašiči in govedo) je najvišja proti fluorokinolonom (ciprofloxacinu, nalidiksinski kislini, tetraciklinu), ki se giblje med 14 % in 90 %. Veliko nižja je bila odpornost teh izolatov proti eritromicinu in gentamicinu. Izolati *C. coli* so v večini evropskih držav bolj odporni na eritromicin, medtem ko je odpornost pri ostalih antibiotikih med *C. jejuni* in *C. coli* po odstotkih primerljiva.

V Sloveniji je poročanje o povečani pojavnosti rezistence kampilobaktrov na kinolone že od leta 1998 za humane izolate, medtem ko za izolate izolirane iz hrane do leta 2004 ni podatkov (Berce in sod., 2004). V poročilu iz leta 2005, se je pojavljala odpornost proti nalidiksinski kislini pri izolatih iz perutninskega mesa v letih 2001 in 2003 v 49,1 %, v letu 2006 se je povišala na 78,1 % in podobno v letu 2009, ko je narasla na 86,0 % (Smole Možina in sod., 2011).

Predvsem so odporni proti fluorokinolom sevi *C. jejuni*, izolirani iz perutninskega mesa in ljudi, medtem ko so proti eritromicinu bolj odporni sevi *C. coli*, izolirani iz svinjine.



Slika 10: Odstotek odpornih izolatov *Campylobacter* proti posameznim antibiotikom (izoliranih iz mesa in mesnih pripravkov brojlerjev in puranov – razsekovalnice in prodaja na drobno, feces in koža brojlerjev in puranov – razsekovalnice) Slovenija, 2008-2010 (VURS, 2010).

Iz slike je razvidno, da je razmerje med protimikrobnimi zdravili, pri katerih se najpogosteje pojavlja odpornost posameznih izolatov iz mesa v letu 2009, nekoliko višja kot v letu 2008. V letu 2008 in 2009 se pri izolatih najpogosteje pojavlja odpornost proti ciprofloksacinu, nalidiksinski kislini in tetraciklinu, medtem ko je odpornost proti eritromicinu minimalna. V letu 2010 se je v primerjavi z letom 2009 odpornost proti ciprofloksacinu in nalidiksinski kislini znižala (iz 82 na 78 %; iz 72 na 46 %), vendar je še vedno visoka. Odpornost proti tetraciklinu se je povišala iz 54 na 56 %.

Po deležu rezistentnih sevov *C. jejuni* proti eritromicinu sodimo med dežele z nizko prevalenco, medtem ko nas z leti povečana odpornost na ciprofloksacin uvršča med dežele z največjim deležem odpornih bakterij proti fluorokinolom.

Zelo problematičen in nezaželen je pojav večkratno odpornih kampilobaktrov, predvsem odpornih hkrati na makrolide in kinolone, ki veljajo za sredstvi prvega in drugega izbora pri terapiji. Pogosto je okoli polovica izoliranih sevov iz piščančjega mesa v centralni Evropi rezistentnih na vsaj 2 antibiotika, ki se uporablja v humani in veterinarski medicini, in ena tretjina na posamičen antibiotik.

2.5 METODE DELA S KAMPILOBAKTRI V LABORATORIJU

2.5.1 Izolacija in identifikacija

Ugotavljanje prisotnosti patogenih bakterij v vzorcih živil, vode in kliničnih humanih vzorcih je velikokrat težavno, ker je število tarčnih bakterij predvsem v vzorcih živil in

vode relativno nizko v primerjavi s številom drugih mikroorganizmov. Bakterijske celice so v živilih lahko tudi poškodovane, zaradi različnih tehnoloških postopkov obdelave.

Mikrobiološke metode, ki služijo preiskavi živil in vode, lahko razdelimo v naslednje skupine (Jeršek, 2004):

- klasične mikrobiološke metode,
- izboljšane in avtomatizirane mikrobiološke metode in
- alternativne metode (impedanca, imunološke metode, molekularne metode).

2.5.1.1 Klasičen postopek

Klasična metoda odkrivanja kampilobaktrov v vzorcih živil, vode in kliničnih vzorcih temelji na selektivnih obogatitvenih kultivacijah oziroma na izbiri ustreznih gojišč in izbiri ustreznih razmer inkubacije – rasti (Jeršek, 2004). Pri klasični identifikaciji je potrebno izolirati čisto kulturo na primernem izolacijskem gojišču, nato pa izvesti serijo biokemijskih in serološki testov. Kljub temu, da so klasične metode nezahtevne in imajo dobro občutljivost, so dolgotrajne zaradi prilagoditve na rast in razmnoževanje mikroorganizmov.

a.) Klasičen postopek odkrivanja bakterij rodu *Campylobacter* v vodi

Postopek odkrivanja kampilobaktrov v površinskih vodah se začne z mikrofiltracijo vzorca vode, kjer se določena koncentracija mikroorganizmov zadrži na mikrofiltru, nato pa ta mikrofilter položimo v obogatitveni bujon in inkubiramo. Po navodilih mednarodnega standarda ISO 17995: 2005 prefiltriramo skozi filter s porami $0,45 \mu\text{m}$ 100 ml vzorca vode. Nato ta filter položimo v obogatitveno gojišče Bolton ali Preston, ki smo ga pripravili v sterilni vrečki in vse skupaj inkubiramo v mikroaerofilni atmosferi na $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ za 44 ± 4 ure. Po inkubaciji odpipetiramo 100 μl vzorca iz obogatitvenega gojišča na petrijevo ploščo z mCCDA in razmažemo s stekleno palčko. Plošče nato zapremo v posode, katerim smo dodali vrečke za vzpostavitev mikroaerofilnih pogojev in vse skupaj inkubiramo na $41,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ za 44 ± 4 ure. Nato precepimo kolonije kampilobaktrov na 2 petrijevi plošči z gojiščem mCCDA. Eno ploščo inkubiramo pod mikroaerofilnimi pogoji, drugo pa pod aerobnimi pri $41,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ za 44 ± 4 ure. Če je rast samo pri mikroaerofilnih pogojih, izvedemo še biokemične teste, ki nam potrdijo in identificirajo posamezne vrste.

b.) Klasičen postopek odkrivanja bakterij rodu *Campylobacter* v perutninskem mesu

Povečana koncentracija kampilobaktrov je na površini perutninskega mesa, zato je za določitev le te potreben izpirrek vzorca perutnine. Posamezne vzorce smo dali v sterilno vrečko, jih premisili z 180 ml fiziološke raztopine, vse skupaj pregnetli in za kasnejšo analizo uporabili samo 25 ml izpirka. Po mednarodnem standardu ISO 10272-1 se doda 25 ml izpirka v 225 ml obogatitvenega bujona Bolton, nato sledi inkubacija v mikroaerofilnih pogojih najprej za 4 do 6 ur na $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ in nato na $41,5^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ za 44 ± 4 ure. Po inkubaciji odpipetiramo 100 μl vzorca iz obogatitvenega gojišča na petrijevo ploščo z mCCDA in razmažemo s stekleno palčko. Vsi nadaljnji postopki do identifikacije posameznih vrst so enaki kot pri postopku odkrivanja kampilobaktrov v vodi.

2.5.1.2 Molekularna metoda

Molekularne metode so s svojo hitro in jasno detekcijo in identifikacijo patogenih bakterij v hrani postale alternativna metoda klasičnim mikrobiološkim metodam. Pomemben napredok v kvantifikaciji patogenih bakterij direktno iz hrane je v uporabi teh metod, ki temeljijo predvsem na razširitvi ciljnega zaporedja sekvenc DNA (ali RNA) z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), brez predhodne obogatitve in kultivacije (Rantsiou in sod., 2010).

V primerjavi s klasično gojitveno metodo je PCR veliko hitrejša in občutljivejša. Vendar je problem, da za svoje delovanje potrebuje relativno drago opremo. Poleg tega postopek detekcije ne omogoča izolacije čiste kulture za nadaljnje testiranje.

2.5.2 Ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom

Določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) v diagnostičnih laboratorijih za potrjevanje proti antibiotikom odpornih mikroorganizmov je pomembno, da so metode enostavne, hitre in dajo zanesljive rezultate. Na voljo je več komercialnih metod, kot so npr. komercialno pripravljena gojišča Sensititre®. Najpogosteje priporočena metoda za ugotavljanje občutljivosti je dilucijska metoda v agarju, ki se pod mikroaerofilnimi pogoji izvaja na krvnem trdnem gojišču, vendar se zaradi dolgotrajnosti le redko uporablja v laboratorijih za rutinske preiskave. Nedavno je bila za ugotavljanje odpornosti bakterij *C. jejuni* in *C. coli* standardizirana metoda mikrodilucije v bujonu, ki je zaradi večje enostavnosti bolj sprejemljiva in primerna za rutinske preiskave. Omogoča spremeljanje odpornosti večjega števila izolatov (Luber in sod., 2003).

2.5.2.1 Difuzijske metode

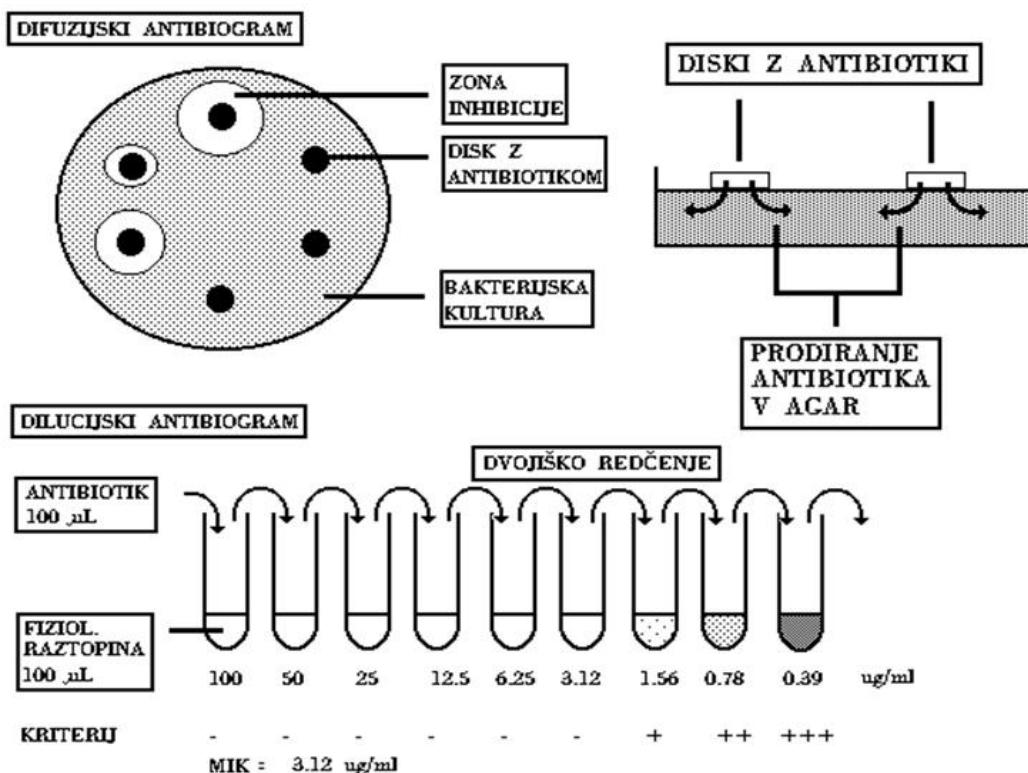
Difuzijske metode v agarju z diskami

Pri tej metodi določanja odpornosti bakterijskih izolatov proti protimikrobnim snovem uporabljamo diske prepojene z znano koncentracijo antibiotikov. Pri izvedbi te metode na inokuliran agar postavimo papirnat disk, z nanešeno koncentracijo antibiotika. Le-ta nato difundira skozi agar. Ko razdalja od diska narašča, koncentracija antibiotika logaritemsko pada. Nastanejo inhibicijske cone rasti bakterij. Čim širši je premer cone (označujemo ga: ++++ = zelo občutljiv; +++ = občutljiv; ++ = srednje občutljiv; + = slabo občutljiv; 0 = neobčutljiv), tem bolj je dana bakterija občutljiva na antibiotik (Kotnik, 2002).

2.5.2.2 Dilucijske metode

Dilucijske metode se uporabljajo za določanje minimalne koncentracije antibiotika, ki je potreben, da ubije ali inhibira mikroorganizem. Za določanje protimikrobske inhibitorne aktivnosti se uporabljajo metode v tekočih ali na trdnih gojiščih. Če protimikrobsko sredstvo razredčimo v trdnem gojišču, govorimo o dilucijski metodi v agarju. Če pa ga razredčimo v tekočem gojišču, govorimo o makro- ali mikrodilucijski metodi v bujonu. Običajno so protimikrobska sredstva testirana pri 2-kratnih serijskih razredčitvah v gojišču. Najnižja koncentracija, ki inhibira vidno rast testiranega organizma, je označena kot vrednost MIK (Woods in Washington, 1999; Luangtongkum in sod., 2007).

Med dilucijske metode spadajo: metoda v agarju, makrodilucija v bujonu in mikrodilucija v bujonu.



Slika 11: Primer prikaza difuzijske in dilucijske metode določanja protimikrobnene odpornosti (Filipič, 1996).

Dilucijska metoda v agarju

Dilucijska metoda v agarju je standardizirana in zanesljiva tehnika testiranja, ki jo lahko uporabimo kot referenčno metodo za ovrednotenje drugih metod.

Za testiranje občutljivosti bakterij *Campylobacter* se izvaja v mikroaerofilnih pogojih, na trdem krvnem gojišču (najpogosteje se uporablja gojišče Mueller-Hinton s 5 % konjske ali ovčje krvi), vendar se zaradi dolgotrajnosti le redko uporablja v laboratorijih za rutinske preiskave (Woods in Washington, 1999; Luangtongkum in sod., 2007).

Dilucijska metoda v agarju je prva metoda, ki je bila standardizirana za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za *Campylobacter* (Luber in sod., 2003).

Mikrodilucija v bujonu

Mikrodilucijska metoda v bujonu je bila nedavno standardizirana za ugotavljanje odpornosti bakterij *C. jejuni* in *C. coli* za nekatere antibiotike (McDermott in sod., 2005). Rast spremljamo v gojišču na mikrotitrskih ploščah. Običajno so protimikrobnne snovi

testirane pri 2-kratnih serijskih razredčitvah v gojišču. Najnižja koncentracija antibiotika, ki inhibira vidno rast testiranega organizma, je označena kot MIK. Minimalno inhibitorno koncentracijo določamo na osnovi merjenja motnosti (optične gostote), fluorescence ali bioluminiscence gojišča. Vse troje je lahko znak rasti mikrobnih celic (Luber in sod., 2003).

2.5.2.3 Primerjava metod določanja odpornosti

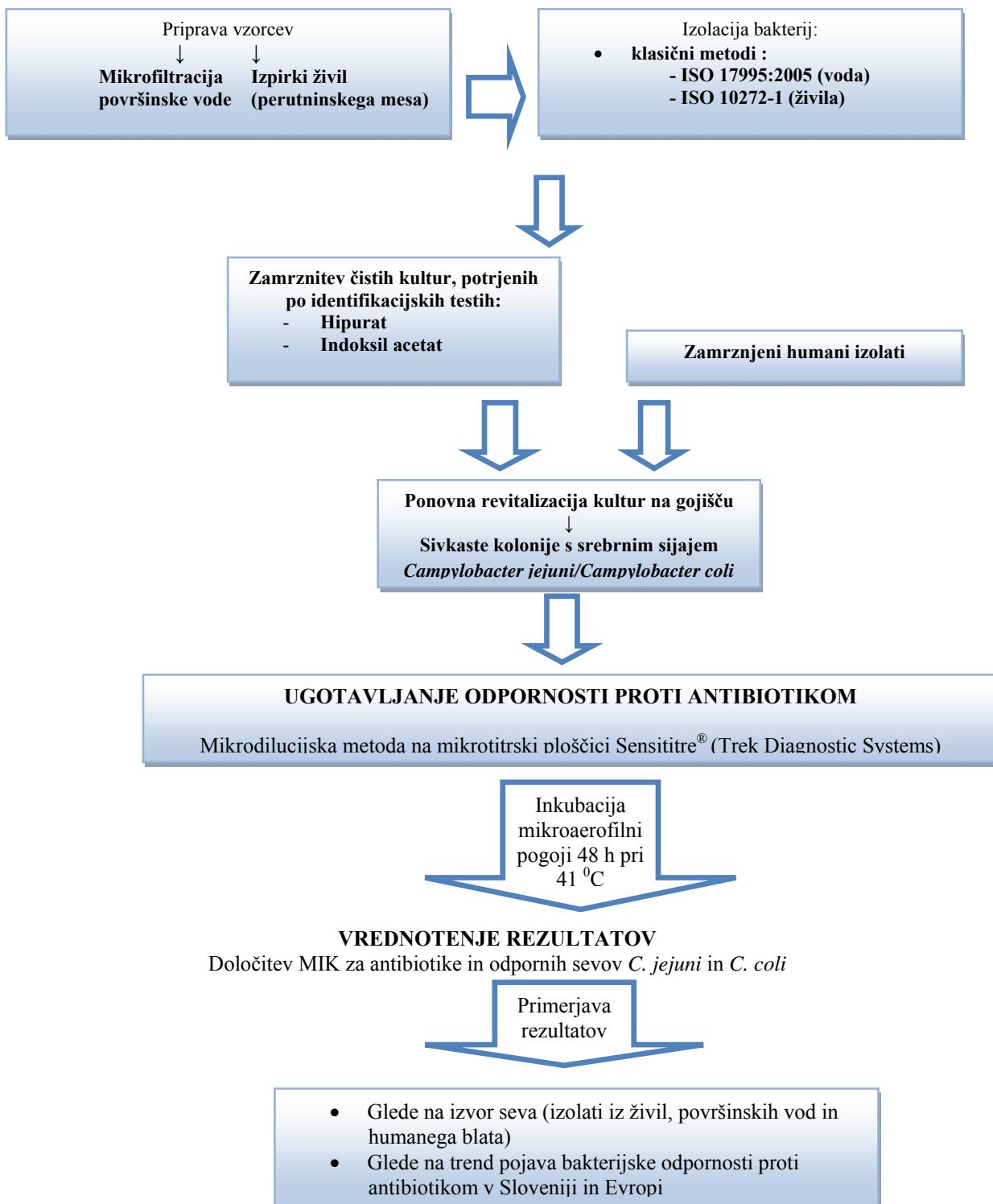
Difuzijske metode se veliko uporabljajo za rutinske preiskave, omogočajo hitre rezultate, a imajo omejitve (Luber in sod., 2003). Metoda je tehnično preprosto izvedljiva in ponovljiva, reagenti so ekološko sprejemljivi, ter ne zahteva posebne opreme. Problem se pojavi pri izbiri mikroorganizmov, saj metoda ni standardizirana za vse mikroorganizme. Prav tako pa je slabost podajanje rezultatov MIK, kjer se lahko pojavijo večje napake, npr. zaradi slabe difuzije protimikrobnega sredstva skozi diske. Rezultati so med različnimi študijami težko primerljivi (Woods in Washington, 1999). Engberg in sod. (1999) so ugotovili, da difuzijske metode dajejo nižje rezultate za vrednosti MIK kot druge metode.

Dilucijske metode so v primerjavi z difuzijskimi veliko bolj uporabne za določanje odpornosti proti določenim antibiotikom, saj so enostavnnejše in hitrejše. Predvsem se je uveljavila mikrodilucijska metoda, ki je zaradi enostavnosti bolj sprejemljiva in primerna za rutinske preiskave v laboratorijih ter omogoča spremeljanje odpornosti večjega števila izolatov. Primerena je tudi za testiranje več protimikrobnih snovi proti enemu izolatu. Je hitra in ekonomsko ugodna metoda za ugotavljanje MIK (Woods in Washington, 1999).

Določanje bakterijske odpornosti proti antibiotikom v našem eksperimentalnem delu je potekalo z mikrodilucijsko metodo na komercialno pripravljenih mikrotitrskih ploščicah Sensititre® (Trek Diagnostic System).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 12: Postopek celotnega eksperimentalnega dela.

Celotno eksperimentalno delo diplomske naloge je vključevalo 3 dele. Najprej smo iskali prisotnost bakterij rodu *Campylobacter* v posameznih vzorcih površinskih vod in živil (perutninsko meso). Če je bila prisotnost katerekoli vrste potrjena, smo izolate zamrznili, kasneje pa ponovno uporabili za pripravo antibiograma.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Mikroorganizmi in analizirani vzorci

Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 2 referenčna seva:

- *C. coli* ATCC 43477
- *C. jejuni* ATCC 33291

Vzorci

Raziskava je vključevala 3 vrste vzorcev, med katerimi so glavni mediji prenosa kampilobaktrov in sicer površinske vode in živila (perutninsko meso). Za primerjavo smo v analizo vključili humane seve, izolirane iz blata bolnikov s črevesnimi ukužbami.

Eksperimentalni del je vključeval analizo 90 vzorcev površinskih vod in 28 vzorcev živil (perutninskega mesa). Detekcija kampilobaktrov v takšnih vzorcih je težavna, ker je prisotno majhno število celic v primerjavi s kompetitivno mikrobioto, saj nam je uspelo izolirati za preučevanje bakterijske odpornosti samo 7 pozitivnih vzorcev bakterij *Campylobacter* iz površinski vod in 16 iz perutninskega mesa.

Za pripravo antibiograma in preučevanje odpornosti proti antibiotikom smo uporabili izolate bakterij *Campylobacter* iz 19 vzorcev površinski vod, 21 vzorcev živil in 20 humanih kliničnih vzorcev. Vse izolate smo dobili na Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor (v nad. ZZV MB). Nekateri izolati iz vzorcev površinskih vod, perutninskega mesa in vsi humani izolati, ki smo jih preučevali, so bili izolirani v letu 2011 (izjemoma v letu 2010).

3.2.2 Gojišča

Kot obogatitveno gojišče bakterij rodu *Campylobacter* smo uporabljali dve različni tekoči selektivni gojišči in sicer Bolton ter Preston. Za pripravo antibiograma smo uporabljali komercialno pripravljeno gojišče Sensitire® (Treck Diagnostic Systems).

3.2.2.1 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Bolton

Vsebuje naslednje sestavine:

- osnovni medij Bolton basal broth (Oxoid CM0983)
- dodatek za selektivnost Bolton broth selective supplement (Oxoid SR0183)
- defibrirana konjska kri (Oxoid SR0048)

Preglednica 2: Sestava osnovnega medija za gojišče Bolton (OxoidCM0983)

| Sestavine | Količina (g/l) |
|-----------------------|----------------|
| mesni pepton | 10,0 |
| laktalbuminhidrolizat | 5,0 |
| kvasni ekstrakt | 5,0 |
| natrijev klorid | 5,0 |
| natrijev piruvat | 0,5 |
| natrijev metabisulfit | 0,5 |
| natrijev karbonat | 0,6 |
| alfa-ketoglutarat | 1,0 |
| hemin | 0,01 |
| pH 7,4 ± 0,2 | |

Preglednica 3: Sestava dodatka za selektivnost Bolton Broth selective supplement (Oxoid CM0983)

| Sestavine | Količina (mg/l) |
|---------------|-----------------|
| Cefoperazon | 20,0 |
| Vankomicin | 20,0 |
| Trimetroprim | 20,0 |
| Cikloheksamid | 50,0 |

Priprava tekočega gojišča Bolton

13,8 g osnovnega medija smo raztopili v 500 ml dH₂O in sterilizirali z avtoklaviranjem pri 121 °C 15 minut. Ko se je ohladilo na 50 °C smo aseptično dodali 25 ml defibrinirane konjske krvi in eno stekleničko dodatka za selektivnost.

3.2.2.2 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Preston

Vsebuje naslednje sestavine:

- 25 g osnovnega medija Preston (Oxoid CM0067)
- dodatek za selektivnost Preston (ISO 17995:2005(E))
- dodatek za rast Preston campylobacter growth supplement (ISO 17995:2005(E))
- 50 ml defibrirane konjske krvi (Oxoid SR0048)

Preglednica 4: Sestavine dodatka za selektivnost v gojišču Preston (ISO 17995:2005(E))

| Sestavine | Količina |
|---------------|----------|
| Polimiksin B | 5000 IU |
| Rifampicin | 10,0 mg |
| Trimetoprim | 10,0 mg |
| Amfotericin B | 10,0 mg |

Preglednica 5: Sestavine dodatka za rast v gojišču Preston(ISO 17995:2005(E))

| Sestavine | Količina (g/l) |
|--|----------------|
| natrijev piruvat | 0,25 |
| natrijev metabisulfit | 0,25 |
| železovsulfat FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0,25 |

Priprava tekočega gojišča Preston

12,5 g osnovnega medija smo raztopili v 500 ml dH₂O in sterilizirali z avtoklaviranjem pri 121 °C 15 minut. Ko se je ohladilo na 50 °C, smo aseptično dodali 25 ml defibrinirane konjske krvi ter po eno stekleničko dodatka za rast in dodatka za selektivnost.

3.2.2.3 Trdno selektivno gojišče mCCDA (modificirani ogljeni cefoperazon deoksiholatni agar)

Vsebuje naslednje sestavine (po ISO 17995:2005(E)) :

- osnovni medij CCDA (Oxoid CM0739)
- dodatek za selektivnost mCCDA selective supplement (Oxoid SR0155)
- destilirana voda

Preglednica 6: Sestava osnovnega medija CCDA (Oxoid CM0739)

| Sestavine | Količine (g/l) |
|----------------------|----------------|
| Nutrient Broth No.2 | 25,0 |
| aktivno oglje | 4,0 |
| kazein hidrolizat | 3,0 |
| natrijevdezoksikolat | 1,0 |
| železov sulfat | 0,25 |
| natrijev piruvat | 0,25 |
| agar | 12,0 |
| pH 7,4 ±0,2 | |

Preglednica 7: Sestava dodatka za selektivnost CCDA (Oxoid SR0155)

| Sestavine | Količina (mg/l) |
|---------------|-----------------|
| Cefoperazon | 32 |
| Amfotericin B | 10 |

Priprava trdnega gojišča mCCDA

22,75 g osnovnega medija smo raztopili v 500 ml dH₂O in avtoklavirali pri 121 °C 15 minut. Ko se je ohladilo na 50 °C, smo aseptično dodali dodatek za selektivnost. Dobro smo premešali in prelili v sterilne petrijevke.

3.2.2.4 Komercialno pripravljeno gojišče Sensititre® (Treck Diagnostic Systems)

Za pripravo antibiograma smo uporabili:

- Sensititre®(Treck Diagnostic Systems) mikrotitrsko ploščice za določanje odpornosti proti antibiotikom 7 antibiotikom – gentamicinu, streptomycinu, ciprofloksacinu, tetraciklinu, eritromycinu, nalidiksinski kislini in kloramfenikolu
- Gojišče Sensititre®CAMHB: tekoče gojišče Mueller-Hinton z dodatkom pufra TES (Treck Diagnostic Systems)

Preglednica 8: Sestavine osnovnega medija Mueller-Hinton (Oxoid CM0337)

| Sestavine | Količina (mg/l) |
|-------------------|-----------------|
| goveji pepton | 300 |
| kazein hidrolizat | 17,5 |
| škrob | 1,5 |
| agar | 17 |
| pH 7,3 ± 0,1 | |

3.2.3 Priprava reagentov in raztopin

3.2.3.1 Reagenti in raztopine za izvedbo hidrolize indoksil acetata (ISO 10272-1:2006(E))

- raztopina indoksil acetata (SIGMA, USA)
- aceton
- sterilna voda

Pripravljene diske indoksil acetata smo s cepilno zanko inokulirali s kolonijo in prelili s kapljico sterilne destilirane vode. Kot pozitiven rezultat smo ovrednotili diske, ki so se v roku 5-10 minut obarvali temnomodro.

3.2.3.2 Reagenti in raztopine za izvedbo hidrolize hipurata (ISO 10272-1:2006(E))

- natrijev hipurat
- natrijev klorid
- dinatrijev hidrogen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- natrijev dihidrogen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- voda
- ninhidrin

Kolonijo smo inokulirali v 0,4 ml raztopine natrijevega hipurata. Dobro smo premešali in inkubirali 2 uri v vodni kopeli pri 37 °C. Nato smo na vrh raztopin še dodali 0,2 ml ninhidrina in inkubirali 10 minut v vodni kopeli pri 37 °C. Pozitiven rezultat smo odčitali v primeru temno vijolične obarvanosti.

3.2.3.3 Priprava raztopin antibiotikov

Odpornost izolatov bakterij *Campylobacter* smo preizkušali proti 7 različnim antibiotikom in sicer gentamicinu, streptomycinu, ciprofloxacinu, tetraciklinu, eritromicinu, nalidiksinski kislini ter kloramfenikolu. Za ugotavljanje odpornosti proti tem antibiotikom smo uporabili mikrotitrsko ploščice Sensititre®, katere že imajo dodane primerne koncentracije antibiotikov za analizo. Pred dodajanjem inokuluma smo v vsako jamico z avtomatsko pipeto dodali 5 µl sterilne destilirane vode, da se je tvorila raztopina in s tem preprečili nastanek oborine med inkubacijo.

3.2.4 Laboratorijski pribor in oprema

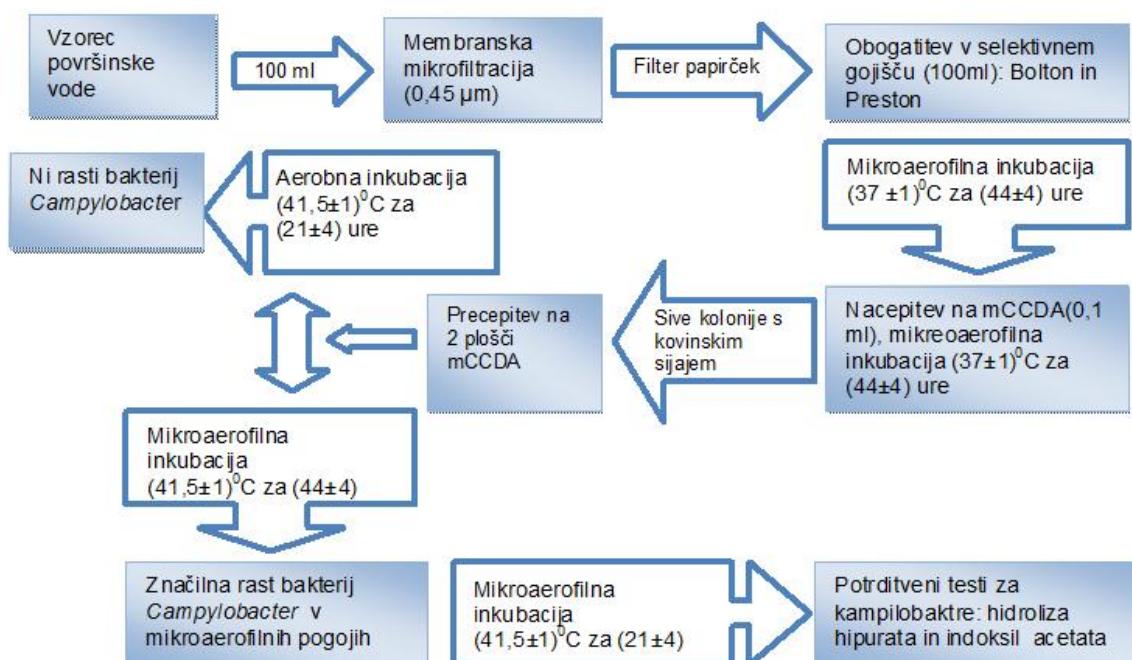
Pri delu smo uporabljali naslednji pribor in opremo:

- halja
- rokavice
- cepilne zanke
- hokej palčka
- petrijeve plošče
- skalpeli
- pincete
- mikrocentrifugirke (1,5 ml in 2 ml)
- celulozni filter papir (premer 47-50 mm, premer por 0,45µm)
- merilni valji (50 ml in 100 ml)
- steklene epruvete
- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- steklene Pateurjeve pipete (10 ml)
- plinski gorilnik
- vrtinčni mešalnik (Assistant Reamix 2789, Nemčija)
- anaerobni lonec
- mikraaerofilne vrečke (Biomerieux, Francija)
- inkubator (WTB binder, Nemčija)
- mikrobiološka komora – laminarij (Iskra PIO, Slovenija)
- hladilnik (LTH, Slovenija)
- zamrzovalnik (Kirsch, Nemčija)
- kalibrirana tehtnica (AES Laboratories, Nemčija)
- centrifuga (Eppendorf, Nemčija)
- nefelometer Densimat (Biomerieux, Francija)
- set za zamrzovanje vzorcev (MicrobankTM Blue, Canada)
- mikrotitske ploščice (Sensitire[®] Trek Diagnostic Systems, United Kingdom)

3.3 METODE DELA

3.3.1 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* v površinskih vodah s klasično metodo (ISO 17995:2005)

Celoten postopek odkrivanja kampilobaktrov v vzorcih površinskih vod je potekal po postopkih, ki jih navaja standard ISO 17995:2005. Celoten postopek detekcije bakterij *Campylobacter* vključuje predhodno obogatitev v gojišču, kjer so se sposobne razmnoževat in v času inkubacije tvoriti tipične kolonije pri ustrezni temperaturi na ustrezem gojišču. Nato je sledila izolacija čiste kulture, ter določitev vrste posameznih sevov s potrditvenimi testi.



Slika 13: Prikaz odkrivanja bakterij *Campylobacter* v vodi po klasični metodi (ISO 17995:2005).

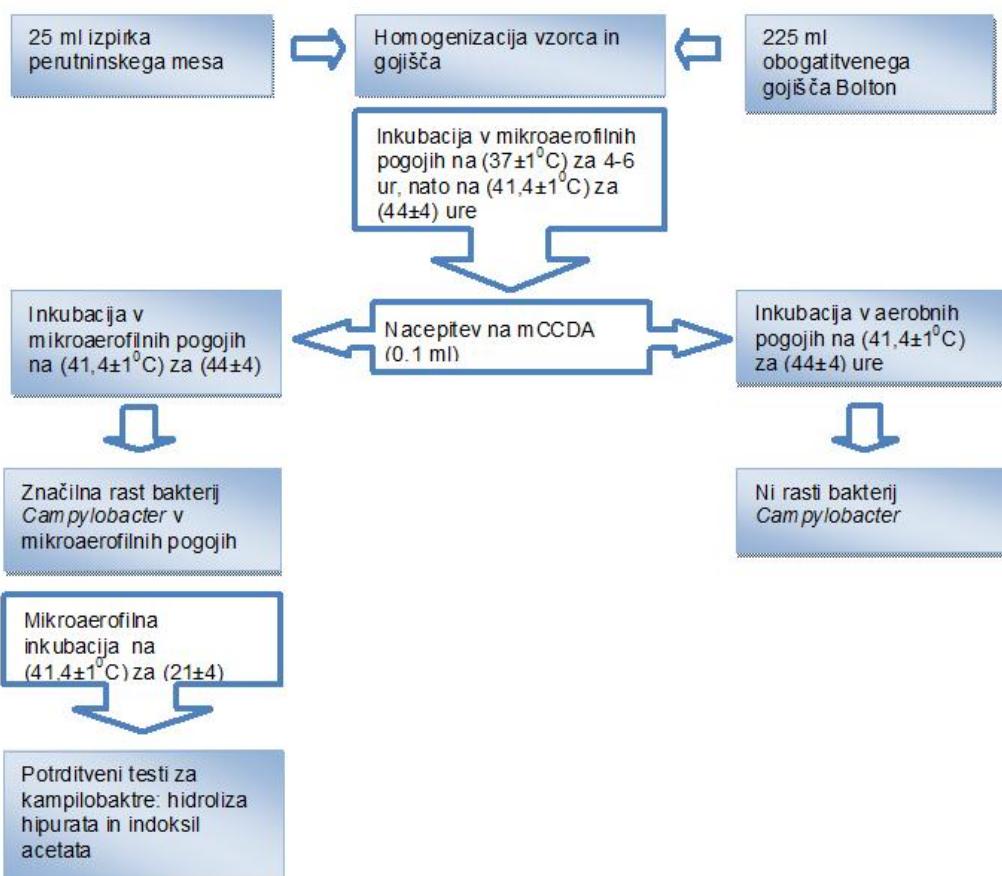
Membranska mikrofiltracija

Pred začetkom filtracije smo ožgali filter z ognjem, nanj položili filter papir in nastavek, ter prefiltrirali 100 ml vzorca. Nato smo odvzeli nastavek in s sterilno pinceto prenesli filter papir v 100 ml obogativenega gojišča Bolton in Preston. Sledila je inkubacija v mikroaerofilnih pogojih, kot je prikazano na sliki 13.

3.3.1.1 Priprava suspenzije celic s specifično težo 0,5 po McFarlandu za pozitivno kontrolo
Za pripravo suspenzije celic s specifično težo 0,5 po McFarlandu smo prenesli pozitivno kontrolo (referenčna seva *C. coli* ali *C. jejuni*) iz gojišča mCCDA s pomočjo vatirane palčke v epruveto s fiziološko raztopino. Tako smo z nefalometrom pripravili suspenzijo celic s specifično težo 0,5 po McFarlandu, kar pomeni koncentracija 10^8 CFU/ml.

3.3.2 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* v perutninskem mesu s klasično metodo (ISO 10272-1)

Za odkrivanje in identifikacijo kampilobaktrov iz živil se v rutinskih diagnostičnih laboratorijih uporablja mednarodni standard ISO 10272-1. V vzorcih živil je število kampilobaktrov pogosto majhno, v primerjavi s kompetitivno mikrobioto, zato je potrebna primerna obogatitev, ki nam omogoči izolacijo sevov, ter nato identifikacijo in tipizacijo izolatov.



Slika 14: Prikaz odkrivanja bakterij *Campylobacter* v perutninskem mesu po klasični metodi (ISO 10272-1).

3.3.3 Ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom z bujonsko mikrodilucijsko metodo na ploščicah Sensititre® (Trek Diagnostic Systems)

3.3.3.1 Priprava kulture

Po 24 urni inkubaciji pri 42 °C v mikroaerofilnih pogojih so se na izbranem gojišču mCCDA tvorile tipične sive kolonije s kovinskim sijajem. Iz gojišča smo z vatirano palčko prenesli v epruveto s fiziološko raztopino toliko kolonij, da smo pripravili ustreznou razredčino celic po McFarlandu. Postopek je enak kot pri pripravi suspenzije celic s specifično težo 0,5 po McFarlandu za pozitivno kontrolo, le da smo tukaj vzeli seve

analiziranih vzorcev. Vse skupaj smo dobro premešali z vrtinčnim mešalnikom, da smo dobili homogeno zmes. Nato smo 50 µl suspenzije dodali v tekoče gojišče Mueller-Hinton s pufrom TES (komercialno pripravljeno gojišče Sensititre® CAMHBT) in dosegli koncentracijo celic 10^5 CFU/ml (kar pomeni enako kot 1×10^5 - 5×10^5 celic na mililiter suspenzije). Tako pripravljen inokulum smo dobro premešali.

3.3.3.2 Potek dela

Pred dodajanjem inokuluma smo pripravili mikrotitrsko ploščico Sensititre® z že dodanimi antibiotiki (gentamicin, streptomycin, ciprofloksacin, tetraciklin, eritromicin, nalidiksninska kislina in kloramfenikol), tako da smo v vsako jamico z avtomatsko pipeto dodali 5 µl sterilne destilirane vode in s tem preprečili nastanek oborine med inkubacijo.

V vsako jamico polovice mikrotitrsko ploščico Sensititre® smo s pipeto odpipetirali po 100 µl pripravljenega inokuluma. Napolnjene ploščice smo prekrili s pokrovčkom in jih inkubirali 48 ur pri 41 °C v mikroaerofilnih pogojih.

Kot potrditev za rast naših izolatov smo imeli pozitivno kontrolo (PK), kateri smo dodali 100 µl inokuluma (brez dodatka antibiotika) ter negativno kontrolo (NK), kateri smo dodali samo 100 µl gojišča. Pozitivno kontrolo smo pripravili po McFarlandu.

Mikrotitrsko ploščico je sestavljena iz 96 jamic, kjer so vrste označene s črkami od A do H in kolone s številkami od 1 do 12. Namen analize je bil preizkusiti 7 različnih antibiotikov, z različnimi koncentracijami, zato smo ploščico razdelili na 2 dela in hkrati analizirali 2 seva. Na vsaki polovici ploščice smo dodali v desni kot še pozitivno (PK) in negativno kontrolo (NK) za potrditev našega analiziranega izolata.

Mikrodilucijska metoda temelji na 2-kratnem zniževanju koncentracije, zato je bil koncentracijski razmik pri vseh antibiotikih enak.

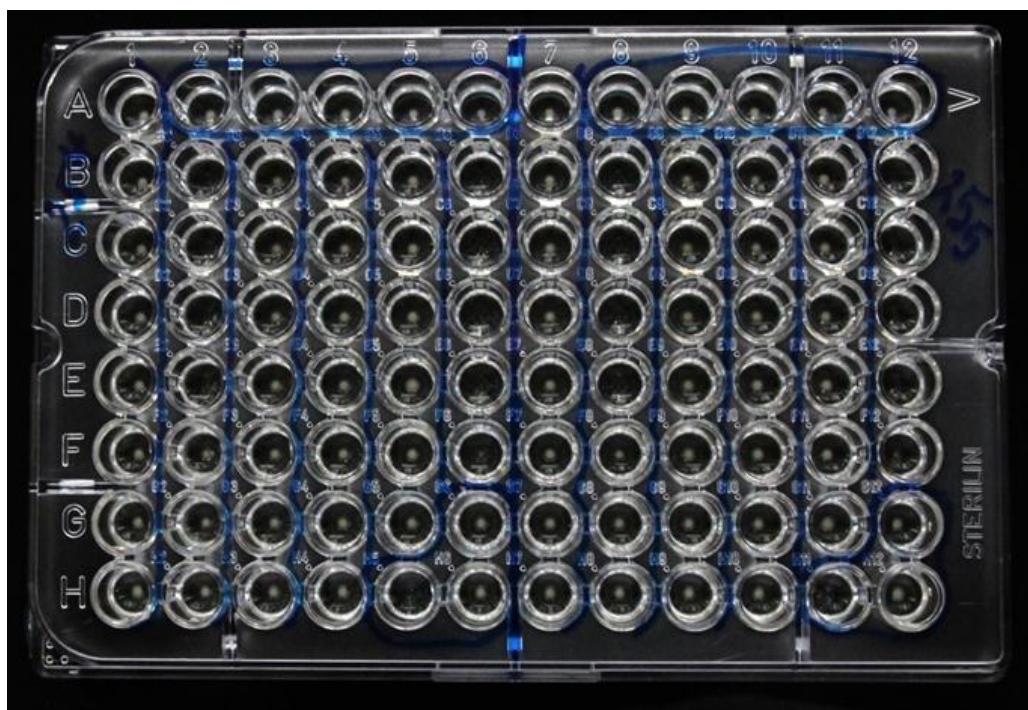
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------------|-------------|-------------|------------|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|------------|-----------|-----------|
| A | GEN 16 | STR 1 | STR 2 | STR 4 | STR 8 | STR 16 | GEN 16 | STR 1 | STR 2 | STR 4 | STR 8 | STR 16 |
| B | GEN 8 | CIP 4 | TET 16 | ERY 32 | NAL 64 | CHL 32 | GEN 8 | CIP 4 | TET 16 | ERY 32 | NAL 64 | CHL 32 |
| C | GEN 4 | CIP 2 | TET 8 | ERY 16 | NAL 32 | CHL 16 | GEN 4 | CIP 2 | TET 8 | ERY 16 | NAL 32 | CHL 16 |
| D | GEN 2 | CIP 1 | TET 4 | ERY 8 | NAL 16 | CHL 8 | GEN 2 | CIP 1 | TET 4 | ERY 8 | NAL 16 | CHL 8 |
| E | GEN 1 | CIP 0,5 | TET 2 | ERY 4 | NAL 8 | CHL 4 | GEN 1 | CIP 0,5 | TET 2 | ERY 4 | NAL 8 | CHL 4 |
| F | GEN 0,5 | CIP 0,25 | TET 1 | ERY 2 | NAL 4 | CHL 2 | GEN 0,5 | CIP 0,25 | TET 1 | ERY 2 | NAL 4 | CHL 2 |
| G | GEN 0,25 | CIP 0,12 | TET 0,5 | ERY 1 | NAL 2 | PK | GEN 0,25 | CIP 0,12 | TET 0,5 | ERY 1 | NAL 2 | PK |
| H | GEN 0,12 | CIP 0,06 | TET 0,25 | ERY 0,5 | NK | PK | GEN 0,12 | CIP 0,06 | TET 0,25 | ERY 0,5 | NK | PK |

Slika 15: Shema mikrotitrsko ploščico Sensititre® za določanje odpornosti proti antibiotikom.

Po končani inkubaciji smo odčitali rezultate. Celotna metoda temelji na preprečevanju rasti bakterij zaradi prisotnosti antibiotika. Kot rezultat se navede minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), kar pomeni najnižja koncentracija antibiotika, ki še prepreči rast mikroorganizma.

Pred odčitavanjem MIK-a za analizirane izolate smo vedno preverili rast pozitivne kontrole, s katero smo potrdili primerne rezultate. MIK smo pri vseh izolatih določali vizualno tako, da smo pogledali rast izolatov iz vzorcev v primerjavi s pozitivno kontrolo – lahko se pojavi rast posameznih bakterij brez motnost do goste rasti z motnostjo. MIK, najnižja koncentracija, ki inhibira rast bakterij, nastopi v tisti jamici, pri kateri ni več vidne rasti, in s tem smo določili najnižjo koncentracijo antibiotika za analiziran izolat.

V primerih, da pozitivna kontrola ni rasla ali je prišlo do kontaminacije med jamicami (gosta rast v sosednjih jamicah), smo analizo ponovili.



Slika 16: Mikrotitrská ploščica Sensititre® za določanje odpornosti proti 7 antibiotikom (foto: Kapel T.).

4 REZULTATI

Eksperimentalno delo je potekalo od marca do avgusta 2011 v Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor, kjer se ugotavlja prisotnosti bakterij *Campylobacter* v vzorcih živil.

V eksperimentalni del naloge smo vključili 90 vzorcev površinskih vod in 28 vzorcev perutninskega mesa. Pri površinskih vodah smo analizirali toliko vzorcev zaradi majhnega števila prisotnih pozitivnih sevov kampilobaktrov.

Antibotsko odpornost izolatov bakterij *Campylobacter* smo določali s komercialno pripravljenimi mikrotitrskimi ploščicami Sensititre®. Minimalno inhibitorno koncentracijo sedmih različnih antibiotikov smo določali 60 izolatom *Campylobacter*. Od tega jih je bilo 19 izoliranih iz površinskih vod, 21 iz živil (perutninsko meso) in 20 iz humanega blata. Izolati so bili identificirani kot *C. coli* in *C. jejuni*. Za ugotavljanje bakterijske občutljivosti proti 7 različnim antibiotikom, gentamicinu, streptomicinu, ciprofloksacinu, tetraciklinu, eritromicinu, nalidiksinski kislini in kloramfenikolu, smo uporabili bujonsko mikrodilucijsko metodo.

Kot merilo za občutljivost bakterij proti antibiotikom se uporablja minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), ki še zavre rast bakterij. Za primerjavo rezultatov smo uporabili smernice Evropske Unije (Smernice primerjave rezistence *Campylobacter jejuni* in *C. coli* na antibiotike) (EUCAST, 2011).

Preglednica 9: Primerjava odpornosti *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* proti antibiotikom po smernicah Evropske Unije (EUCAST, 2011)

| Antibiotki | MIK ($\mu\text{g/ml}$) → (R>) | |
|-----------------------|---------------------------------|----------------|
| | <i>C. jejuni</i> | <i>C. coli</i> |
| Kloramfenikol | 16 | 16 |
| Ciprofloksacin | 1 | 1 |
| Eritromicin | 4 | 16 |
| Gentamicin | 1 | 2 |
| Nalidiksinska kislina | 16 | 32 |
| Streptomicin | 2 | 4 |
| Tetraciklin | 2 | 2 |

MIK smo pri vseh izolatih določali vizualno. MIK smo določili v jamici, pri kateri ni bilo več rasti in tako določili najnižjo inhibitorno koncentracijo antibiotika za analiziran izolat.

4.1 REZULTATI PREISKAV VZORCEV NA PRISOTNOST BAKTERIJ *Campylobacter*

4.1.1 Površinske vode

Analiza 90 vzorcev površinskih vod je vključevala membransko filtracijo, obogatitev v gojišču Bolton in Preston, nacepitev na selektivno gojišče mCCDA in 48 urno inkubacijo v mikroaerofilnih pogojih. Zaradi prisotnosti in goste poraščenosti drugih bakterij smo težko identificirali kampilobakte. Tako smo na koncu s potrditvenimi testi identificirali le 7 sevov od 90 analiziranih vzorcev. Istočasno smo tudi vse vzorce analizirali z molekularno metodo PCR v realnem času. Znano je, da so te metode bolj natančne in učinkovite kot klasične, kar se je pokazalo tudi v našem primeru, saj so analize s PCR dale več pozitivnih sevov (priloga A). Za pripravo antibiograma smo tako uporabili še 12 dodatnih sevov, ki so bili izolirani po ISO 17995:2005 standardu na ZZV MB pretekla leta.

Vsem 19 identificiranim sevom smo določili MIK za izbrane antibiotike.

4.1.2 Živila

Celoten postopek priprave izpirkov perutninskega mesa, obogatitve, inkubacije in identifikacije kampilobaktrov je zajemal 28 vzorcev. Končni identifikacijski testi so potrdili 16 pozitivnih sevov kampilobaktrov. Tako smo v pripravo antibiograma vključili še dodatnih 5 sevov, kateri so bili že identificirani s strani ZZV MB. Tekom klasične analize smo opravili tudi molekularno analizo PCR in s to metode potrdili identifikacijo vseh analiziranih sevov (rezultati vidni iz Priloge B).

Vsem 21 identificiranim izolatom smo z mikrodilucijsko metodo določili MIK proti izbranim antibiotikom.

4.2 REZULTATI MIKRODILUCIJSKE METODE DOLOČANJA MIK

4.2.1 Površinske vode

Analiziranih je bilo 19 bakterijskih izolatov, od tega jih je bilo 10 identificiranih kot *C. jejuni* in 9 kot *C. coli*. Vzorci površinskih vod vključujejo vode iz potokov, ribnikov, rek in jezer.

V preglednici 10 so z rdečo barvo označeni izolati, pri katerih smo potrdili odpornost proti posameznim antibiotikom, glede na smernice Evropske Unije, saj so bile vrednosti nad mejo, ki jo določa EU.

Preglednica 10: Prikaz vrednosti MIK za antibiotike gentamicin, streptomicin, ciprofloksacin, tetraciklin, eritromicin, nalidiksinska kislina in kloramfenikol za izolate *Campylobacter* iz površinskih vod.

| Št. vzorca | Identifikacija Bakterije | MIK ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|--------------------------|--------------------------|------|-----|----------|-------|----------|-------|------|------|------|-----|----------|-----|------|
| | | GEN | R/S* | STR | R/S* | CIP | R/S* | TET | R/S* | ERY | R/S* | NAL | R/S* | CHL | R/S* |
| 26 | <i>C. jejuni</i> | 1 | S | 2 | S | 0,25 | S | 0,5 | S | 4 | S | 16 | S | <2 | S |
| 29 | <i>C. jejuni</i> | <0,12 | S | 2 | S | <0,06 | S | <0,25 | S | <0,5 | S | 4 | S | <2 | S |
| 34 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | 2 | S | <0,06 | S | <0,25 | S | <0,5 | S | 4 | S | <2 | S |
| 41 | <i>C. jejuni</i> | <0,12 | S | <1 | S | 1 | S | <0,25 | S | <0,5 | S | >64 | R | <2 | S |
| 76 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | <1 | S | <0,06 | S | <0,25 | S | 4 | S | 8 | S | <2 | S |
| 8779 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | >16 | R | 2 | R | <0,25 | S | 1 | S | >64 | R | <2 | S |
| 155 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | 16 | R | <0,06 | S | <0,25 | S | <0,5 | S | 8 | S | <2 | S |
| 178 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | 16 | R | <0,06 | S | <0,25 | S | <0,5 | S | 8 | S | <2 | S |
| 4805 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | 2 | S | >4 | R | <0,25 | S | <0,5 | S | >64 | R | 4 | S |
| 301 | <i>C. coli</i> | 1 | S | 4 | S | <0,06 | S | <0,25 | S | 4 | S | 8 | S | <2 | S |
| 302 | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | <1 | S | >4 | R | <0,25 | S | 2 | S | >64 | R | <2 | S |
| 310 | <i>C. coli</i> | 1 | S | 4 | S | <0,06 | S | <0,25 | S | 1 | S | 4 | S | <2 | S |
| 311 | <i>C. jejuni</i> | 1 | S | 2 | S | 0,12 | S | <0,25 | S | 4 | S | 4 | S | <2 | S |
| 318 | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | <1 | S | 0,12 | S | <0,25 | S | 1 | S | 4 | S | <2 | S |
| 319 | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | <1 | S | 0,12 | S | <0,25 | S | 4 | S | 8 | S | <2 | S |
| 2053 (334) | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | 2 | S | <0,06 | S | <0,25 | S | 1 | S | 4 | S | <2 | S |
| 2481 (350) | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | 2 | S | <0,06 | S | <0,25 | S | <0,5 | S | <2 | S | <2 | S |
| 2456 (352) | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | 2 | S | <0,06 | S | 2 | S | 1 | S | 4 | S | <2 | S |
| 2578 (353) | <i>C. jejuni</i> | 0,25 | S | <1 | S | 1 | S | 1 | S | 1 | S | 16 | S | <2 | S |

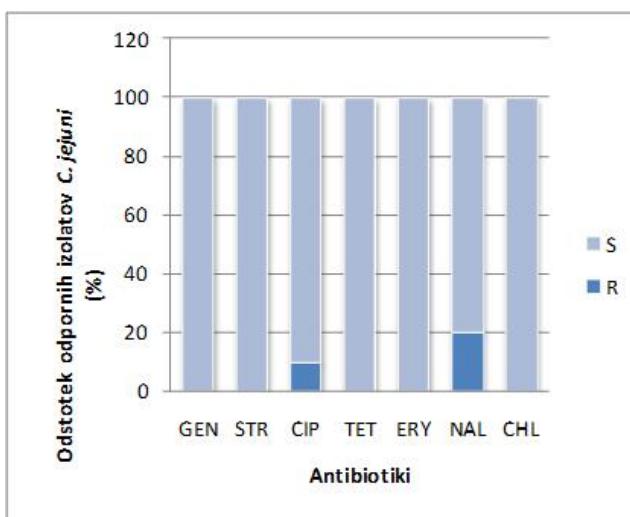
*R = odporen na delovanje antibiotika: vrednost MIK je višja kot v Primerjavi rezistence *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* proti antibiotikom po smernicah Evropske Unije

*S = občutljiv na delovanje antibiotika: vrednost MIK je nižja ali enaka kot v Smernicah Evropske Unije (Preglednica 9).

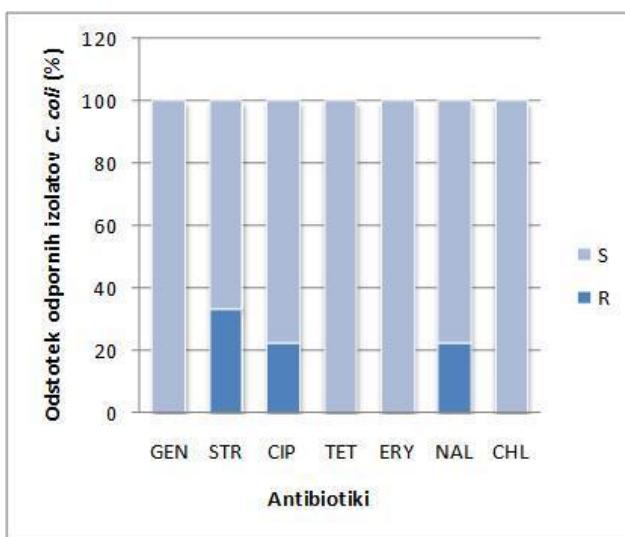
Iz preglednice 10 je razvidna odpornost sevov le na 3 antibiotike (streptomicin, ciprofloksacin in nalidiksinsko kislino) in to le pri nekaterih sevih, izoliranih iz površinskih vod. Odpornost na streptomicin smo potrdili pri 3 sevih *C. coli*, na ciprofloksacin se je pojavila pri obeh vrstah in sicer pri 2 sevih *C. coli* in pri 1 sevu *C. jejuni*. Odpornost na nalidiksinsko kislino se je pojavila pri 2 sevih *C. coli* in 2 sevih *C. jejuni*. Bolj odporni so bili sevi *C. coli*.

Preglednica 11: Prevalenca odpornosti (%) pri kampilobaktrih iz površinskih vod.

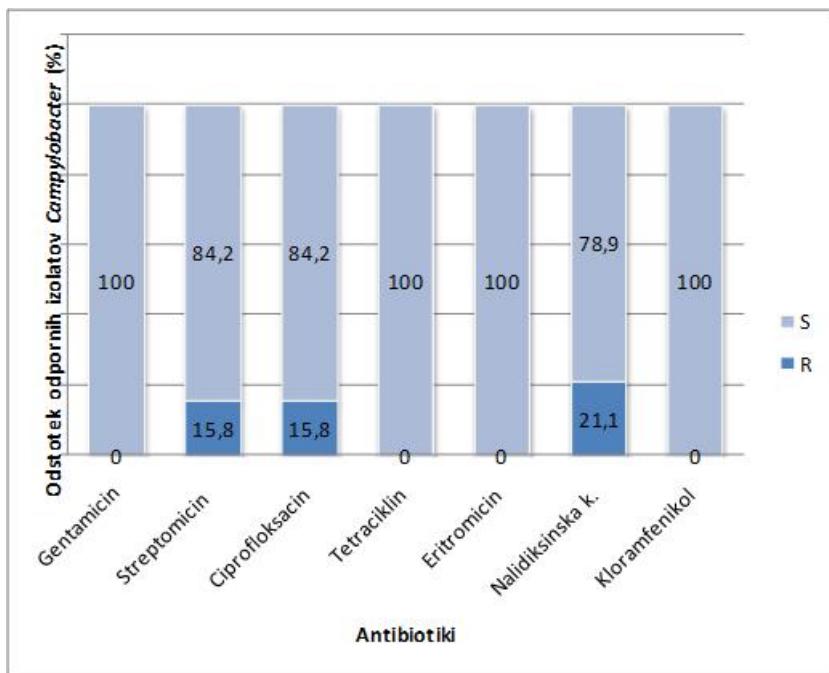
| Antibiotiki | <i>C. jejuni</i> (N=10) | | <i>C. coli</i> (N=9) | | Skupaj (N=19) | |
|-----------------------|-------------------------|-----|----------------------|------|---------------|------|
| | R | S | R | S | R | S |
| Gentamicin | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| Streptomicin | 0 | 100 | 33,3 | 66,7 | 15,8 | 84,2 |
| Ciprofloksacin | 10 | 90 | 22,2 | 77,8 | 15,8 | 84,2 |
| Tetraciklin | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| Eritromicin | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| Nalidiksinska kislina | 20 | 80 | 22,2 | 77,8 | 21,1 | 78,9 |
| Kloramfenikol | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |



Slika 17: Prevalenca odpornosti proti antibiotikom sevov *C. jejuni* iz površinskih vod.



Slika 18: Prevalenca odpornosti proti antibiotikom sevov *C. coli* iz površinskih vod.



Slika 19: Prevalenca odpornosti proti antibiotikom sevov *Campylobacter* spp. iz površinskih vod.

Končna slika prevalence proti antibiotikom med vsemi analiziranimi izolati iz 19 vzorcev površinskih vod je pokazala možnost pojava rezistence na 3 antibiotike od 7 analiziranih. Rezistenca se je pojavila pri ciprofloksacinu in streptomicinu v enakih odstotkih 15,8 % in pri nalidiksinski kislini, kjer je odstotek nekoliko višji in sicer 21,1 %. Pri vseh ostalih antibiotikih (gentamicinu, tetraciklinu, eritromicinu in kloramfenikolu) so sevi izkazali 100 % občutljivost.

4.2.2 Živila

Z mikrodilucijsko metodo na mikrotitrskih ploščicah Sensititre® je bilo analiziranih 21 sevov, kateri so bili izolirani iz živil (perutninskega mesa), od tega jih je bilo 8 identificiranih kot *C. jejuni* in 13 kot *C. coli*.

V preglednici 12 so z rdečo barvo označeni izolati, pri katerih se je pojavila rezistenca proti posameznim antibiotikom, glede na smernice Evropske Unije, saj so bile vrednosti nad mejo, ji jo določa EU.

Preglednica 12: Prikaz vrednosti MIK za antibiotike gentamicin, streptomicin, ciprofloksacin, tetraciklin, eritromicin, nalidiksinska kislina in kloramfenikol za izolate *Campylobacter* iz živil.

| Št. vzor. | Identif. bakterije | MIK ($\mu\text{g/ml}$) | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|--------------------|--------------------------|------|----------|----------|-------|----------|----------|----------|------|----------|-----|----------|-----|------|
| | | GEN | R/S* | STR | R/S* | CIP | R/S* | TET | R/S* | ERY | R/S* | NAL | R/S* | CHL | R/S* |
| 161 | <i>C. coli</i> | 1 | S | 8 | R | >4 | R | 0,5 | S | >32 | R | >64 | R | 8 | S |
| 162 | <i>C. coli</i> | 1 | S | 8 | R | >4 | R | 0,5 | S | >32 | R | >64 | R | 8 | S |
| 163 | <i>C. coli</i> | 1 | S | 8 | R | >4 | R | 0,5 | S | >32 | R | >64 | R | 8 | S |
| 164 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | 8 | R | >4 | R | <0,25 | S | >32 | R | >64 | R | 8 | S |
| 165 | <i>C. coli</i> | 1 | S | 8 | R | >4 | R | 0,5 | S | >32 | R | >64 | R | 8 | S |
| 247 | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | 2 | S | >4 | R | 8 | R | <0,5 | S | <2 | S | <2 | S |
| 248 | <i>C. jejuni</i> | 0,25 | S | <1 | S | <0,06 | S | <0,25 | S | <0,5 | S | 4 | S | <2 | S |
| 249 | <i>C. coli</i> | 1 | S | 4 | S | >4 | R | >16 | R | 1 | S | >64 | R | <2 | S |
| 252 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | 8 | R | >4 | R | 0,5 | S | 8 | S | >64 | R | <2 | S |
| 273 | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | 2 | S | >4 | R | >16 | R | 2 | S | 4 | S | <2 | S |
| 277 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | 4 | S | >4 | R | >16 | R | 16 | S | >64 | R | <2 | S |
| 278 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | 4 | S | >4 | R | >16 | R | 16 | S | >64 | R | 4 | S |
| 279 | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | 2 | S | >4 | R | 16 | R | 2 | S | <2 | S | <2 | S |
| 281 | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | 4 | R | 4 | R | 16 | R | 2 | S | <2 | S | <2 | S |
| 282 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | 4 | S | >4 | R | <0,25 | S | 16 | S | >64 | R | 4 | S |
| 283 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | >16 | R | >4 | R | >16 | R | >32 | R | >64 | R | 4 | S |
| 515 | <i>C. coli</i> | 0,5 | S | 2 | S | >4 | R | <0,25 | S | 1 | S | >64 | R | <2 | S |
| 516 | <i>C. coli</i> | 0,25 | S | <1 | S | >4 | R | >16 | R | >32 | R | >64 | R | <2 | S |
| 527 | <i>C. jejuni</i> | 0,25 | S | <1 | S | <0,06 | S | <0,25 | S | 1 | S | 4 | S | <2 | S |
| 532 | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | <1 | S | >4 | R | <0,25 | S | 2 | S | >64 | R | <2 | S |
| 534 | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | <1 | S | >4 | R | <0,25 | S | 1 | S | >64 | R | <2 | S |

*R = odporen na delovanje antibiotika: vrednost MIK je višja kot v Primerjavi rezistence *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* proti antibiotikom po smernicah Evropske Unije

*S = občutljiv na delovanje antibiotika: vrednost MIK je nižja ali enaka kot v Smernicah Evropske Unije (Preglednica 9).

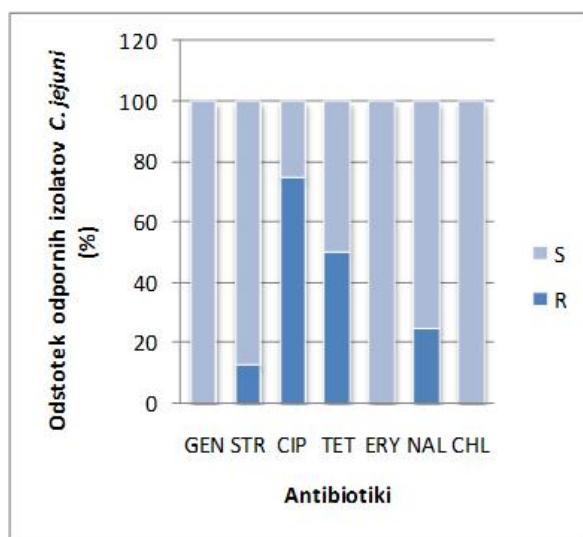
Iz preglednice 12 je razvidno, da se pojavlja pri vzorcih živil odpornost pri 5 od 7 antibiotikov in sicer pri streptomycinu, ciprofloksacinu, tetraciklinu, eritromycinu in nalidiksinski kislini. Na splošno se pojavlja večkratna odpornost pri sevu *C. coli*. Pri streptomycinu se pojavi odpornost pri enem sevu *C. jejuni* in 7 sevih *C. coli*. Pri tetraciklinu se pojavlja odpornost pri 4 vzorcih *C. jejuni* in 5 vzorcih *C. coli*.

Večkratna odpornost se pojavlja pri ciprofloksacinu in nalidiksinski kislini, pri obeh se pojavlja odpornost pri 13 vzorcih *C. coli*, razlika je pri *C. jejuni* kjer se pri antibiotiku ciprofloksacinu pojavlja odpornost pri 6 od 8 vzorcev, pri nalidiksinski kislini pa 2 od 8 analiziranih sevov. Takšna povezanost pri *C. coli* je lahko posledica enakega izvora teh dveh antibiotikov, saj oba spadata v skupino kinolonov (nalidiksinska kislina antibiotik prve generacije, ciprofloksacin druge generacije).

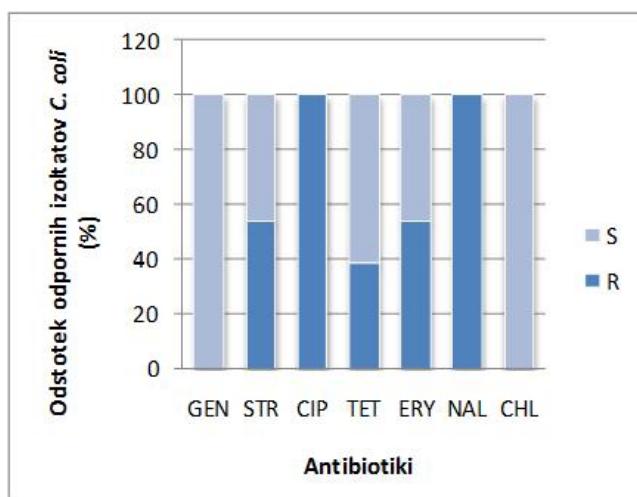
Pri veliki večini sevov *C. coli* se je pokazala odpornost na več antibiotikov hkrati. Najbolj izstopa izolat št. 283, pri katerem smo potrdili odpornost na vseh 5 antibiotikov.

Preglednica 13: Prevalenca odpornosti kampilobaktrrov iz živil (%).

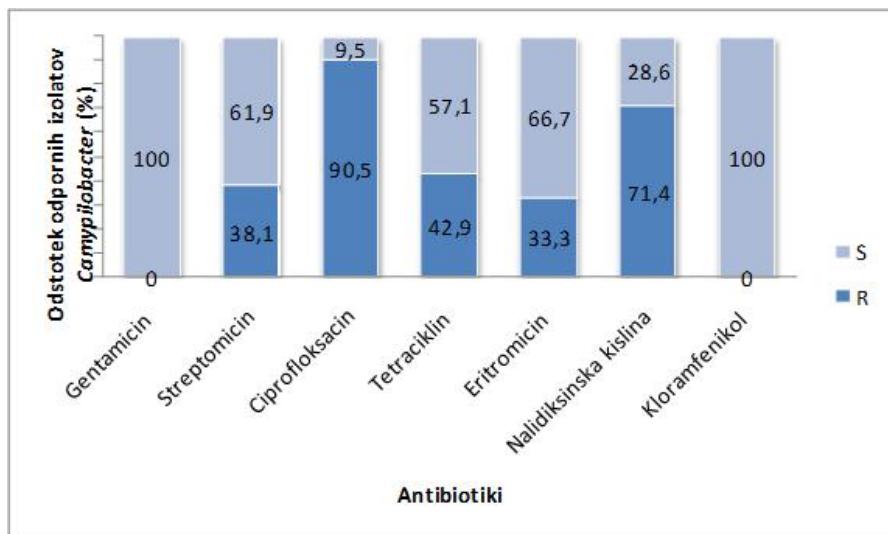
| Antibiotiki | <i>C. jejuni</i> (N=8) | | <i>C. coli</i> (N=13) | | Skupaj (N=21) | |
|-----------------------|------------------------|------|-----------------------|------|---------------|------|
| | R | S | R | S | R | S |
| Gentamicin | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| Streptomicin | 12,5 | 87,5 | 53,8 | 46,2 | 38,1 | 61,9 |
| Ciprofloksacin | 75 | 25 | 100 | 0 | 90,5 | 9,5 |
| Tetraciklin | 50 | 50 | 38,5 | 62,5 | 42,9 | 57,1 |
| Eritromicin | 0 | 100 | 53,8 | 46,2 | 33,3 | 66,7 |
| Nalidiksinska kislina | 25 | 75 | 100 | 0 | 71,4 | 28,6 |
| Kloramfenikol | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |



Slika 20: Prevalenca odpornosti proti antibiotikom sevov *C. jejuni* iz živil.

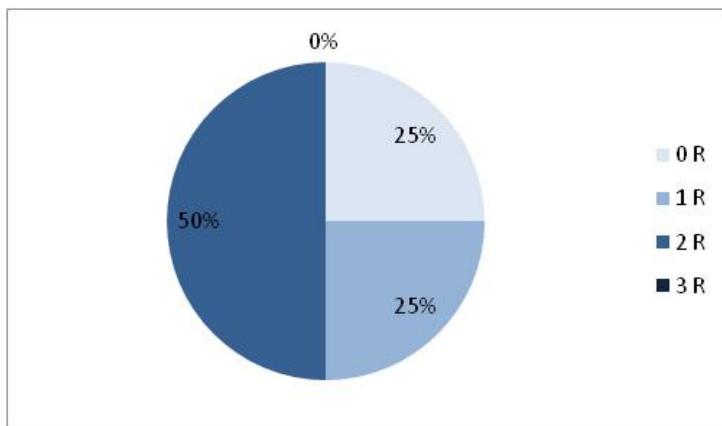


Slika 21: Prevalenca odpornosti proti antibiotikom sevov *C. coli* iz živil.

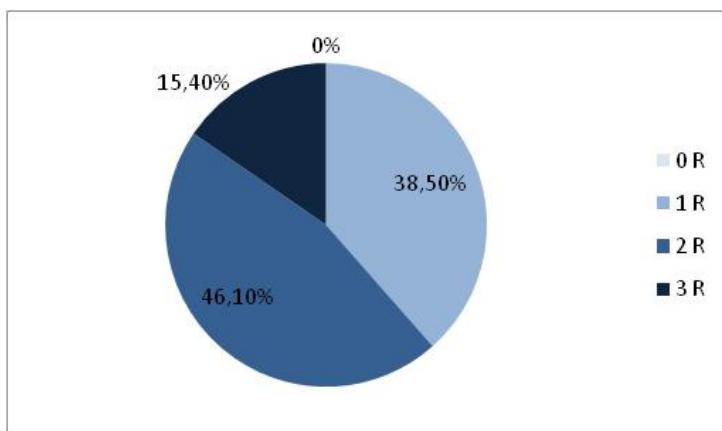


Slika 22: Prevalenca odpornosti proti antibiotikom sevov *Campylobacter* spp. iz živil.

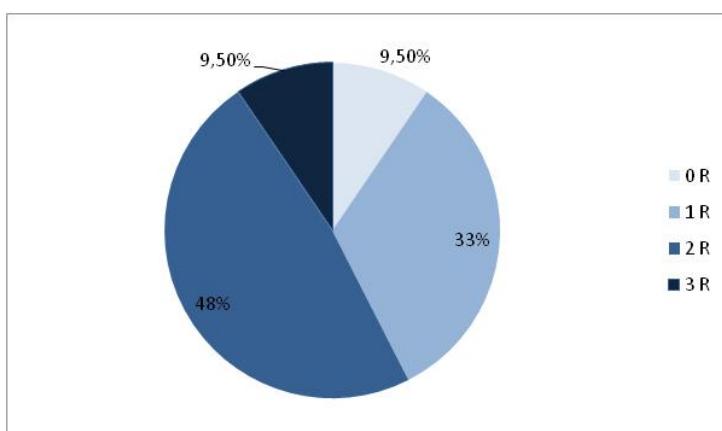
Izolati iz mesa so bili odporni na 5 antibiotikov (streptomycin, ciprofloxacin, tetracycline, eritromycin in nalidixic acid) od 7 analiziranih. Pri nekaterih se pojavlja odpornost na več antibiotikov hkrati.



Slika 23: Mnogokratna odpornost proti antibiotikom sevov *Campylobacter jejuni* iz živil (upoštevani antibiotiki gentamicin, ciprofloksacin, tetraciklin in eritromicin).



Slika 24: Mnogokratna odpornost proti antibiotikom sevov *Campylobacter coli* iz živil (upoštevani antibiotiki gentamicin, ciprofloksacin, tetraciklin in eritromicin).



Slika 25: Mnogokratna odpornost proti antibiotikom sevov *Campylobacter* spp. iz živil (upoštevani antibiotiki gentamicin, ciprofloksacin, tetraciklin in eritromicin).

4.2.3 Humani sevi

Število analiziranih izolatov iz humanih kliničnih vzorcev je bilo 20, vsi so bili identificirani kot *C. jejuni*. Te seve smo zamrznjene pridobili na ZZV MB. Z mikrodilucijsko metodo smo določili vrednosti MIK za izbrane antibiotike.

V preglednici 14 so z rdečo barvo so označeni izolati, pri katerih se je pojavila rezistenza proti posameznim antibiotikom, glede na smernice Evropske Unije, saj so bile vrednosti nad mejo, ki jo določa EU.

Preglednica 14: Prikaz vrednosti MIK za antibiotike gentamicin, streptomicin, ciprofloksacin, tetraciklin, eritromicin, nalidiksinska kislina in kloramfenikol za izolate *Campylobacter* iz humanih kliničnih vzorcev.

| Št.vzorca | Identifikacija bakterije | MIK (µg/ml) | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|--------------------------|-------------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
| | | G E N | R/S* | S T R | R/S* | C I P | R/S* | T E T | R/S* | E R Y | R/S* | N A L | R/S* | C H L | R/S* |
| 1 (5325) | <i>C. jejuni</i> | 0,25 | S | < 1 | S | >4 | R | <0,25 | S | <0,5 | S | >64 | R | <2 | S |
| 2 (5345) | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | 2 | S | >4 | R | >16 | R | <0,5 | S | >64 | R | <2 | S |
| 3 (5384) | <i>C. jejuni</i> | 1 | S | 2 | S | >4 | R | >16 | R | <0,5 | S | <2 | S | <2 | S |
| 4 (5407) | <i>C. jejuni</i> | 0,25 | S | 2 | S | >4 | R | <0,25 | S | <0,5 | S | >64 | R | <2 | S |
| 5 (5480) | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | 2 | S | >4 | R | >16 | R | <0,5 | S | >64 | R | <2 | S |
| 6 (5521) | <i>C. jejuni</i> | 0,25 | S | <1 | S | >4 | R | <0,25 | S | <0,5 | S | >64 | R | <2 | S |
| 7 (5607) | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | 2 | S | >4 | R | <0,25 | S | <0,5 | S | >64 | R | <2 | S |
| 8 (5759) | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | 2 | S | >4 | R | <0,25 | S | <0,5 | S | >64 | R | <2 | S |
| 9 (5933) | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | 2 | S | 0,12 | S | <0,25 | S | <0,5 | S | 4 | S | <2 | S |
| 10 (5942) | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | <1 | S | >4 | R | <0,25 | S | <0,5 | S | >64 | R | <2 | S |
| 11 (7550) | <i>C. jejuni</i> | 0,25 | S | <1 | S | >4 | R | 0,5 | S | <0,5 | S | >64 | R | 4 | S |
| 12 (7566) | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | <1 | S | <0,06 | S | <0,25 | S | <0,5 | S | 4 | S | <2 | S |
| 13 (7568) | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | <1 | S | >4 | R | <0,25 | S | <0,5 | S | >64 | R | <2 | S |
| 14 (7626) | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | <1 | S | 0,12 | S | <0,25 | S | <0,5 | S | 4 | S | <2 | S |
| 15 (7883) | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | <1 | S | >4 | R | <0,25 | S | <0,5 | S | >64 | R | <2 | S |
| 16 (7929) | <i>C. jejuni</i> | 1 | S | <1 | S | >4 | R | 16 | R | <0,5 | S | 8 | S | <2 | S |
| 17 (8180) | <i>C. jejuni</i> | 0,25 | S | <1 | S | >4 | R | <0,25 | S | <0,5 | S | >64 | R | <2 | S |
| 18 (9152) | <i>C. jejuni</i> | 0,5 | S | 2 | S | >4 | R | >16 | R | <0,5 | S | 4 | S | <2 | S |
| 19 (9190) | <i>C. jejuni</i> | 0,25 | S | <1 | S | >4 | R | <0,25 | S | 1 | S | >64 | R | <2 | S |
| 20 (9204) | <i>C. jejuni</i> | 0,25 | S | 2 | S | >4 | R | <0,25 | S | 2 | S | <64 | R | <2 | S |

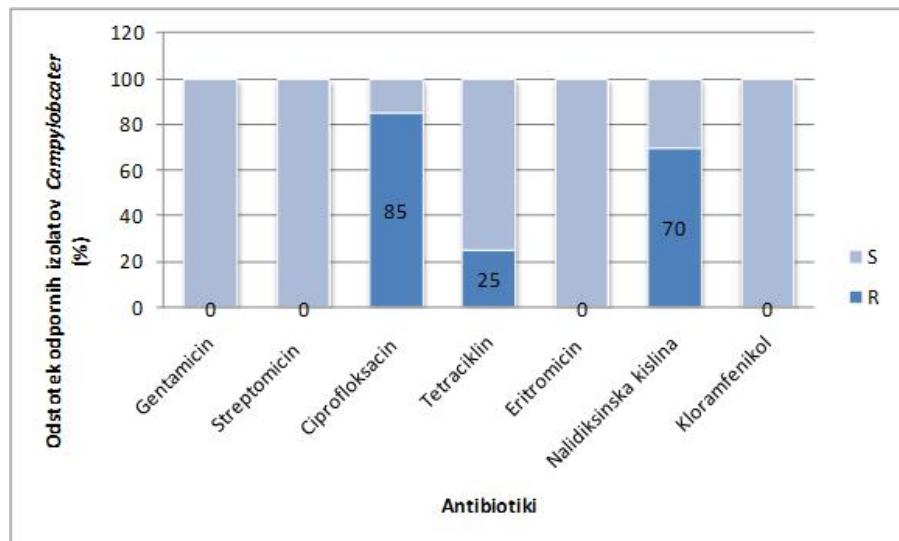
*R = odporen na delovanje antibiotika: vrednost MIK je višja kot v Primerjavi rezistence *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* proti antibiotikom po smernicah Evropske Unije

*S = občutljiv na delovanje antibiotika : vrednost MIK je nižja ali enaka kot v Smernicah Evropske Unije (Preglednica 9).

Vsi analizirani izolati iz humanih kliničnih vzorcev so bili povsem občutljivi na antibiotike gentamicin, streptomycin, eritromicin in kloramfenikol. Odpornost smo potrdili za ciprofloksacin, na katerega je bilo odpornih 17 od 20 analiziranih antibiotikov in za tetraciklin, na katerega je bilo 5 sevov odpornih in 15 občutljivih.

Preglednica 15: Prevalenca odpornosti kampilobaktrov iz humanih kliničnih vzorcev v številu (N) in odstotkih.

| Antibiotiki | R (N) | S (N) | R (%) | S (%) |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| Gentamicin | 0 | 20 | 0 | 100 |
| Streptomycin | 0 | 20 | 0 | 100 |
| Ciprofloksacin | 17 | 3 | 85 | 15 |
| Tetraciklin | 5 | 15 | 25 | 75 |
| Eritromicin | 0 | 20 | 0 | 100 |
| Nalidiksinska kislina | 14 | 6 | 70 | 30 |
| Kloramfenikol | 0 | 20 | 0 | 100 |



Slika 26: Prevalenca odpornosti kampilobaktrov iz humanih kliničnih vzorcev.

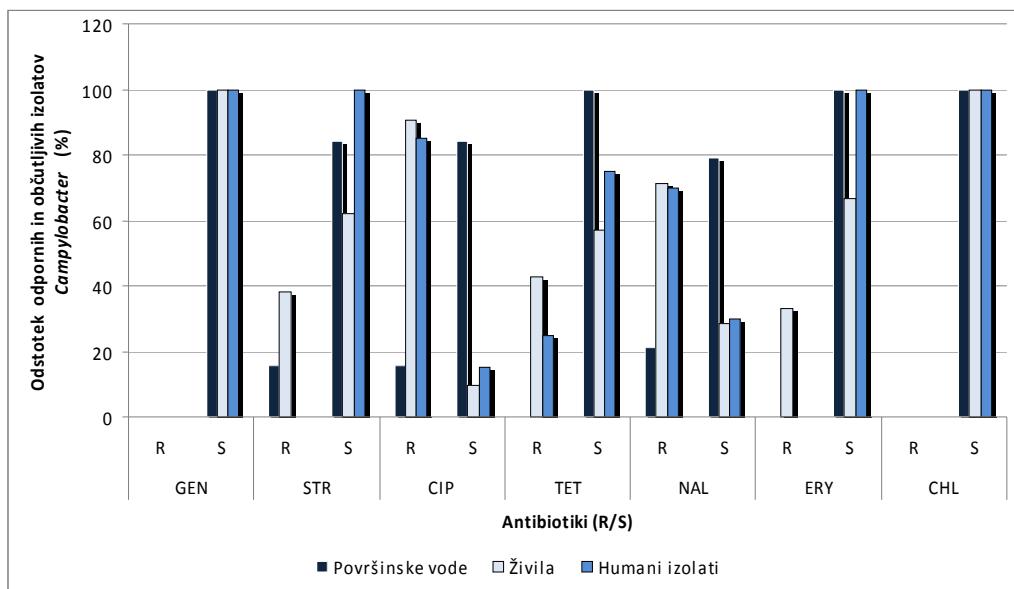
4.2.4 Primerjava rezultatov vseh vzorcev

Preglednica 16: Prevalenca odpornosti izolatov *C. jejuni* in *C. coli* iz površinskih vod in živil (%).

| Antibiotki | <i>C. jejuni (%)</i> | | | | <i>C. coli (%)</i> | | | |
|------------------------------|----------------------|-----|------------------|------|--------------------|------|------------------|------|
| | Površinske vode | | Perutninsko meso | | Površinske vode | | Perutninsko meso | |
| | R | S | R | S | R | S | R | S |
| Gentamicin | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |
| Streptomicin | 0 | 100 | 12,5 | 87,5 | 33,3 | 66,7 | 53,8 | 46,2 |
| Ciprofloksacin | 10 | 90 | 75 | 25 | 22,2 | 77,8 | 100 | 0 |
| Tetraciklin | 0 | 100 | 50 | 50 | 0 | 100 | 38,5 | 61,5 |
| Eritromicin | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 54,5 | 45,5 |
| Nalidiksinska kislina | 20 | 80 | 25 | 75 | 22,2 | 77,8 | 100 | 0 |
| Kloramfenikol | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 | 0 | 100 |

Preglednica 17: Primerjava prevalence odpornosti/občutljivosti izolatov analiziranih vzorcev.

| Antibiotki | SKUPAJ (%) | | | | | |
|----------------------------------|--------------------------------|---|---|--------------------------------|---|---|
| | Sevi, izolirani iz živil | Sevi, izolirani iz površinskih vod | Sevi, izolirani iz humanih kliničnih vzorcev | Sevi, izolirani iz živil | Sevi, izolirani iz površinskih vod | Sevi, izolirani iz humanih kliničnih vzorcev |
| | ODPORNI | | | OBČUTLJIVI | | |
| Gentamicin | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| Streptomicin | 38,1 | 15,8 | 0 | 61,9 | 84,2 | 100 |
| Ciprofloksacin | 90,5 | 15,8 | 85 | 9,5 | 84,2 | 15 |
| Tetraciklin | 42,9 | 0 | 25 | 57,1 | 100 | 75 |
| Eritromicin | 33,3 | 0 | 0 | 66,7 | 100 | 100 |
| Nalidiksinska kislina | 71,4 | 21,1 | 70 | 28,6 | 78,9 | 30 |
| Kloramfenikol | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 |



Slika 27: Primerjava rezultatov odpornosti proti antibiotikom za izolate *Campylobacter* iz površinskih vod, živil in humanih kliničnih vzorcev.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Okužbe z bakterijami *Campylobacter* predstavljajo vedno večji problem po svetu, saj se število ne zmanjšuje in izolirani sevi so odpornejši. Uporaba antibiotikov v veterini kot tudi v humani medicini ter nepravilna uporaba pospeševalcev rasti v intenzivni reji živali za prehrano ljudi je privedla do povečane bakterijske odpornosti proti različnim antibiotikom (Quinn in sod., 2007).

Infekcije povzročajo predvsem termofilne vrste, kot sta *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* (Peyrat in sod., 2008). Tudi v naši raziskavi smo iz analiziranih vzorcev površinskih voda in živil izolirali seve vrst *C. jejuni* in *C. coli*, medtem ko so bili vsi humani sevi identificirani kot *C. jejuni*.

V eksperimentalnem delu priprave antibiograma z metodo mikrodilucije na komercialno pripravljenih mikrotitrskih ploščicah Sensititre® je bilo vključenih 60 izolatov. Od tega smo jih 21 izolirali iz živil (perutninskega mesa) in 19 iz površinskih vod. Za primerjalno analizo smo vključili še 20 sevov, izoliranih iz humanih kliničnih vzorcev. Odpornost smo preverjali proti 7 različnim antibiotikom in sicer gentamicinu, streptomycinu, ciprofloksacinu, eritromycinu, tetraciklinu, nalidiksinski kislini in ciprofloksacinu.

5.1.1 Analiza rezultatov ugotavljanja prisotnosti in odpornosti proti antibiotikom bakterij *Campylobacter* površinskih vod in piščančjega mesa

5.1.1.1 Površinske vode

Za pridobitev čim večjega števila sevov bakterij *Campylobacter* je celoten postopek ugotavljanja prisotnosti le-teh vključeval 90 vzorcev površinskih vod. Na koncu smo s potrditvenimi testi kot pozitivne na kampilobakte re dokazali le v 7 od 90 analiziranih vzorcev. O majhnem številu pozitivnih vzorcev iz površinskih in pitnih vod poročajo tudi Kurinčič in sod. (2009) v bilateralnem projektu, ki je vključeval 928 površinskih in pitnih vod iz Slovenije in Bosne, kjer je bilo od 679 analiziranih vzorcev površinskih vod samo 55 (8,1 %) pozitivnih in od 249 vzorcev pitne vode trije (2,1 %) pozitivni na prisotnost kampilobaktrov.

V raziskavi z mikrodilucijsko metodo je bilo vključenih 19 izolatov, ki so bili v 10 primerih identificirani kot *C. jejuni* in v 9 primerih kot *C. coli*. Analizirali smo prevalenco odpornosti proti sedmim antibiotikom.

Izolati *Campylobacter jejuni* so bili v analiziranih vzorcih površinskih vod odporni v majhnih odstotkih proti antibiotikoma ciprofloksacin in nalidiksinska kislina (10 % in 20 %). Na ostale antibiotike se je pokazala 100-odstotna občutljivost (Slika 17).

Izolati *Campylobacter coli* so v analiziranih vzorcih površinskih vod pokazali odpornost proti 3 antibiotikom in sicer streptomycinu (33,3 %), ciprofloksacinu in nalidiksinski kislini

v enakih odstotkih (22,2 %). Na ostale antibiotike se je pokazala 100-odstotna občutljivost (Slika 18). V primerjavi med sevoma se je večja rezistenca pokazala pri sevu *C. coli*.

Končni rezultat pojava rezistence na antibiotike med vsemi analiziranimi izolati kaže, da se je pojavila rezistenca proti 3 antibiotikom od 7 analiziranih. Odpornost smo potrdili na ciprofloxacin in streptomycin v enakih odstotkih (15,8 %) in pri nalidiksinski kislini, kjer je bil odstotek nekoliko višji in sicer 21,1 %. Pri vseh ostalih antibiotikih (gentamicin, tetraciklin, eritromycin in kloramfenikol) smo potrdili 100 % občutljivost (Slika 19).

Voda je lahko eden izmed vzrokov infekcij s kampilobaktri, predvsem uživanje kontaminirane neobdelane vode iz okolja. EFSA ne poroča o pogostosti kontaminacije površinskih vod, vendar o pojavi poročajo nekateri literurni viri. Kemp in sod. (2005) poročajo o raziskavi iz Anglije, kjer so v analizo vključili 100-km² vodno omrežje v okolici večjih kmetij. Skupno je bilo odvzetih je bilo 270 vzorcev površinskih (tekočih in stoječih vod) in vodnih zajetij za napajanje živali. Bakterije *Campylobacter* so bile izolirane iz 119 vzorcev (40,5 %), od tega jih je bilo 14,3 % identificiranih kot *C. jejuni*, 18,5 % kot *C. coli* in 4,2 % kot *C. lari*. Izolati *C. jejuni* so bili izolirani predvsem v tekočih vodnih virih (reke, potoki) in *C. coli* v stoječih (jezera, zajetja). V raziskavi so kot končne možnosti za prisotnost bakterij *Campylobacter* spp. v površinskih vodah navedli naslednje: različen vodni izvor, vrsta zemlje, zunanjost (površinske ali podzemne vode) in količina živalskih fekalij v okolju (Kemp in sod., 2005). Izbruhi, povezani s kontaminacijo pitne vode s *C. jejuni*, so predvsem skupni nordijskim državam, in sicer Švedski, Norveški in Finski, kjer v redko poseljenih območjih za podzemne vode ne uporabljajo dezinfekcije (Moore in sod., 2005; Kuusi in sod., 2004). Na farmah lahko zmanjšujejo možnost okužb s kampilobaktri z vodo tako, da za napajanje in čiščenje uporabljajo neoporečno vodo. Zanimivi so podatki, da so bakterije *Campylobacter* prisotne predvsem v Severnih Evropskih državah v površinskih vodah, medtem ko so odstotki kontaminiranega mesa v teh državah, v primerjavi z državami Južne Evrope zelo nizki ali jih ni (EFSA, 2011a, 2012a).

5.1.1.2 Piščanče meso

Prisotnost bakterij *Campylobacter* smo ugotavljali v 28 vzorcih piščančjega mesa. Med analiziranimi vzorci je bilo pozitivnih na kampilobakte 16 vzorcev, ki smo jih kasneje uporabili za ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom. Glede na število analiziranih vzorcev se je pokazala pogosta kontaminacija piščančjega mesa, saj je bilo pozitivnih 16 od 28 analiziranih vzorcev, kar pa je še vedno manjši delež, kot ga navaja poročilo VURS v letu 2010 (Slika 6). Tudi v drugih Evropskih državah poročajo o visoki kontaminaciji piščančjega mesa (Slika 5). Zanimivi so podatki, da so v višjih odstotkih okuženi prašiči in goveda, medtem ko je prenos na meso teh živali zelo majhen. Medtem ko je pri perutnini in okuženem perutninskem mesu odstotek podoben. Eden izmed razlogov je večja možnost stika in s tem kontaminacije črevesne vsebine s trupi živali pri perutnini (EFSA, 2012a). Odstotek okuženega piščančjega mesa je odvisen od posamezne države, tako je na primer v klavnicih najvišji odstotek na Irskem, Poljskem in Madžarskem (63,4 %, 58,8 %, 54,1 %), v proizvodnji v Avstriji, Poljski in Sloveniji (90,0 %, 89,0 %, 79,0 %) in v prodaji v Luksemburgu, Danski in Madžarski (58,8 %, 46,2 % in 43,3 %). V višjem odstotku so bili izolirani sevi *C. jejuni* (34,2 %), kot *C. coli* (27,3 %) (EFSA, 2012a).

Primerjava podatkov okuženega mesa v Sloveniji (Slika 6) je razvidno, da se odstotki povečujejo vse od leta 2006, ko je bila vrednost 44 % in je v letu 2010 dosegla vrednost 79 % (VURS, 2010). V naši raziskavi je bilo 57 % pozitivnih vzorcev, ki so bili v večini odvzeti v letu 2011. Razvidno je, da je odstotek v mejah, ki jih nakazujejo analize predhodnih let.

Z mikrodilucijsko metodo je bilo na odpornost proti antibiotikom analiziranih 21 izolatov, ki so bili identificirani kot *C. jejuni* (8 izolatov) in kot *C. coli* (13 izolatov).

Vsi izolati *Campylobacter jejuni* iz vzorcev perutninskega mesa so bili 100-odstotno občutljivi proti gentamicinu, eritromicinu in kloramfenikolu. Velik odstotek izolatov je pokazal odpornost proti ciprofloksacinu (75 % vseh analiziranih izolatov), tetraciklinu (50 %), nalidiksinski kislini (25 %) in streptomicinu (12,5 %) (Slika 20).

Izolati *Campylobacter coli* so v analiziranih vzorcih perutninskega mesa pokazali 100-odstotno odpornost proti ciprofloksacinu in nalidiksinski kislini. Visok odstotek odpornosti se je pojavil tudi proti streptomicinu in eritromicinu (53,8 %), ter nekoliko nižji proti tetraciklinu (38,5 %). Izolati so bili popolnoma občutljivi proti gentamicinu in kloramfenikolu (Slika 21).

Večja prevalenca odpornosti se je pojavila pri sevih *C. coli*. *C. jejuni* je pokazal 100-odstotno občutljivost na eritromicin, medtem ko so bili izolati *C. coli* odporni v 53,8 %. Tudi v drugih evropskih državah in po svetu poročajo o višji odpornosti vrst *C. coli* proti eritromicinu.

Po poročanju Smole Možina iz leta 2004 je testiranje odpornosti proti eritromicinu in ciprofloksacinu vključevala 69 izolatov iz perutninskega mesa, od tega jih je bilo 32 % identificiranih kot *C. jejuni* in 48 % kot *C. coli*, ostali kot *Campylobacter spp.* Podobna ugotovitev je bil tudi v naši raziskavi, saj smo iz živil izolirali več sevov *C. coli*. To je zanimiv podatek, saj običajno *C. coli* naseljuje v črevesje prašičev in je znan kot kontaminant svinjine in ne perutnine. Poročila iz južnih predelov Evrope pa potrjujejo večjo prevalenco *C. coli* tudi pri perutnini oz. perutninskem mesu (Pezzoti in sod. 2002; Zorman in Smole Možina, 2002). O večjem številu *C. coli*, izoliranih iz piščančjega mesa, poročajo tudi Kurinčič in sod. (2009), kjer je bilo v analizi od 112 vzorcev kar 64 identificiranih kot *C. coli*.

V študiji, ki so jo pred leti v Sloveniji opravili Kurinčič in sod. (2005), poročajo o visoki odpornosti testiranih kampilobaktrov, izoliranih iz perutninskega mesa, proti fluorokinolonom. Vseh analiziranih izolatov je bilo 55, od tega jih je bilo proti ciprofloksacinu odpornih 32. Odpornost na ta antibiotik je bila najvišja, saj se je pokazala v najvišjem številu v primerjavi z drugimi analiziranimi antibiotiki (tetraciklin in makrolidi). O porastu odpornosti proti fluorokinolonom med izolati iz živil poročajo tudi drugi avtorji po Evropi (Pezzoti in sod., 2002; Moore in sod. 2005; Luangtongkum in sod., 2009; Uzunović-Kamberovič in sod., 2009, Smole Možina in sod., 2011).

Izmed 21 izolatov *Campylobacter*, ki smo jih izolirali iz vzorcev živil, jih je bilo 90,5 % odpornih proti ciprofloksacinu, 71,4 % proti nalidiksinski kislini, 42,9 % proti tetraciklinu,

38,1 % proti streptomycinu in 33,3 % proti eritromycinu. Proti antibiotikoma gentamicin in kloramfenikol izolati iz perutninskega mesa ostajajo 100 % občutljivi (Slika 22).

Rezultati našega testiranja izolatov *Campylobacter* iz živil na odpornost proti 7 različnim antibiotikom kažejo porast odpornosti v primerjavi s podatki iz preteklih let v Sloveniji (VURS, 2010). Najpogosteje so sevi *Campylobacter* izkazovali odpornost proti fluorokinolom in makrolidom. Najvišja odpornost se je pri nas pokazala proti fluorokinolonu ciprofloksacinu, ki je bila kar 90,5 % in kinolonu nalidiksinski kislini (71,4 %). Problem visokega odstotka odpornosti predstavlja eritromycin, ki se uporablja v primerih zdravljenja humanih kampilobakterioz. V primerjavi s trendi v Sloveniji iz preteklih let in drugimi evropskimi državami lahko potrdimo naraščanje odpornih sevov *Campylobacter* spp. iz živil, kar je razvidno iz slike 22. Predvsem narašča odpornost proti ciprofloksacinu in eritromycinu. Kurinčič in sod (2009) poročajo o visokih odstotkih odpornosti piščančjega mesa proti ciprofloksacinu (43,8 %) in eritromycinu (21,4 %). Prav tako poročajo o kar visokem odstotku odpornosti proti eritromycinu Tambur in sod. (2011), kjer je bila v raziskavi, s 16 vzorci piščančjega mesa (10 identificiranih kot *C. jejuni* in 6 kot *C. coli*), odpornost 12,5 %.

5.1.1.3 Odpornost humanih izolatov

Vsi izolati iz humanega blata so bili identificirani kot *C. jejuni*. Tudi drugi avtorji poročajo, da se iz humanih vzorcev najpogosteje izolira sev *C. jejuni*. Raziskava, ki je potekala v Franciji, je vključevala 5685 humanih vzorcev, od tega jih je bilo 76,2 % identificiranih kot *C. jejuni*, 17,2 % kot *C. coli* in 5,0 % kot *C. fetus* (Gallay in sod., 2007).

Vseh analiziranih izolatov iz humanega blata v naši raziskavi je bilo 20, od tega jih je bilo 17 odpornih proti ciprofloksacinu in 14 proti nalidiksinski kislini. Torej najvišji odstotek odpornih sevov je bil ugotovljen v primeru ciprofloksacina in sicer 85 %. Sledila je odpornost proti nalidiksinski kislini (70 %) in najnižja je odpornost proti tetraciklinu (25 %). Vsi analizirani sevi so bili občutljivi na antibiotike gentamicin, streptomycin, eritromycin in kloramfenikol, kar je razvidno iz slike 26.

Eritromycin in fluorokinolini so protimikrobnna zdravila, ki se uporabljajo pri zdravljenju v primeru zapletov in hujših oblik kampilobakterioz. Kot prvo zdravilo se pri zdravljenju uporablja eritromycin (Gallay in sod., 2007). Vedno pogosteje pa so vključeni tudi fluorokinoloni (predvsem ciprofloksacin), zaradi njihovega širokega spektra delovanja (Luangtongkum in sod., 2009). Tako se fluorokinoloni uporabljajo v humani kot veterinarski medicini. Tudi naši eksperimentalni rezultati so potrdili pogostost odpornosti proti kinolom pri humanih in živilskih izolatih.

Zaradi naraščanja odpornosti *Campylobacter* spp. v svetu in posledično tudi pri nas v Sloveniji že od leta 1998 poteka ugotavljanje občutljivosti teh bakterij proti kinolonom in makrolidom pri humanih izolatih. Tako je bila na ZZV Nova Gorica v letih 1998 in 2000 opravljena analiza, kjer je bilo analiziranih 3058 izolatov iz humanega blata. Končni rezultat je pokazal, da je delež odpornih izolatov proti ciprofloksacinu narastel iz 10,5 % na 38,5 %, prav tako je bilo povečanje odpornosti na eritromycin iz 0 na 2,6 %. 103 izolati

so bili identificirani kot *C. jejuni* in le 5 kot *C. coli*. Tako nas povečana odpornost na ciprofloxacin uvršča med dežele z velikim deležem odpornih *C. jejuni* proti kinolonom (Berce in sod., 2004). Tudi Gallay in sod. (2007) iz Francije poročajo, da se pri humanih izolatih pojavlja povečana odpornost pri ciprofloxacinu 25,3 % in tetraciklinu s 28,8 %, a 100-odstotna občutljivost na gentamicin in zelo nizka odpornost na eritromicin (1,4 %).

Pojav odpornosti proti fluorokinolom se je v svetu in Evropi razširil po 80.-ih letih ko je bila odobrena uporaba v veterini in prireji perutnine. Tako se je povečal odstotek odpornih sevov *Campylobacter*, izoliranih iz živali in ljudi. Po nekaj letih je ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA), ter kasneje še Evropska unija, umaknila dovoljenje za uporabo v obliki rastnih promotorjev (Gallay in sod., 2007), vendar se odpornost bakterij na ta antibiotik ni zmanjšala. V primerjavi z našimi rezultati in državami Evropske unije je opazen izrazit porast odpornosti proti ciprofloxacinu, saj v letu 2009 spadamo skupaj s Španijo, Avstrijo, Italijo in Litvo v vrh držav, ki imajo povišano odpornost proti fluorokinolonom (EFSA, 2011a).

V nekaterih državah EU in sveta opažajo tudi povečano odpornost proti makrolidom, predvsem eritomicinu. V primerjavi Slovenije z drugimi evropskimi državami spadamo med države z majhno odpornostjo proti eritromicinu. Predvsem je v Evropi in po svetu opaziti odpornost proti eritromicinu pri sevih *C. coli*, katerih se v Sloveniji iz humanih vzorcev izolira relativno majhno število.

Sevi, izolirani iz živil, so v naši analizi pokazali izrazit porast odpornosti proti eritromicinu, saj je odstotek pozitivnih sevov iz leta 2011 v naši raziskavi pokazal 33,3 %. V primerjavi z leti 2008, 2009 in 2010 je porast visok (3 % v letu 2008, 9,5 % v letu 2009 in enako v letu 2010 9,5 %). Eritromicin je veljal za antibiotik z relativno nizko odpornostjo, vendar o porastu poročajo tudi iz drugih držav. Odstotek zelo variira glede na posamezne države in izvor seva (Tambur in sod., 2011).

5.1.1.4 Pojav mnogokratne odpornosti pri vseh izolatih

Pojavnost protimikrobne rezistence, vključno z mnogokratno odpornostjo sevov, ki se prenaša tudi preko prehranske verige, je velik javno-zdravstveni problem. Uporaba antibiotikov v humani in veterinarski medicini pa tudi kot pospeševalcev rasti v reji živali, namenjenih za prehrano ljudi, je vplivala na povečanje bakterijske odpornosti proti različnim antibiotikom (Quinn in sod., 2007).

V izračun mnogokratne odpornosti smo vključili štiri nesorodne antibiotike (gentamicin, ciprofloxacin, tetraciklin in eritromicin), na katere smo testirali vse izolate.

V naši analizi se je mnogokratna odpornost pojavila pri nekaterih izolatih iz vseh treh virov, vendar je najbolj izstopala pri živilih. Pri izolatih iz vzorcev živil je bilo od 21 analiziranih 9,5 % občutljivih proti vsem štirim antibiotikom. 33 % testiranih izolatov je bilo odpornih proti enemu, 48 % proti dvema in 9,5 % proti trem izmed štirih antibiotikov (Slika 25).

25 % testiranih izolatov *C. jejuni* je bilo občutljivih proti vsem štirim analiziranim antibiotikom, prav tako je bilo 25 % odpornih proti enem antibiotiku, 50 % proti dvema in nobeden proti trem od štirih analiziranih (Slika 23). 15,4 % testiranih izolatov *C. coli* je bilo odpornih proti trem analiziranim antibiotikom, 46,1 % proti dvema in 38,5 % proti enem antibiotiku (Slika 24).

Izmed 20 analiziranih humanih izolatov je bilo samo 15 % občutljivih na vse štiri testirane antibiotike. 60 % testiranih izolatov je bilo odpornih proti enemu od štirih in 25 % proti dvema. Rezultati izračuna mnogokratne odpornosti med humanimi izolati iz leta 2011 in leta 2009 so dokaj primerljivi, saj noben humani izolat iz teh dveh let ni kazal odpornosti proti 3 ali več antibiotikom. Odstotek odpornih proti enem izmed 4 antibiotikov se je povišal iz 38 % na 60 % in znižal proti dvema iz 28 % na 25 %. V letu 2009 je bilo izmed 200 analiziranih izolatov občutljivih proti vsem štirih antibiotikom 41 %, medtem ko se je v naši analizi 20-ih humanih izolatov pokazala občutljivost proti vsem štirim le v 16 % (Kovač J., 2010).

V 19 izolatih iz površinskih vod, se je pokazala občutljivost na vse štiri testirane antibiotike v 84 % in v 16 % odpornost proti enemu samemu antibiotiku od štirih.

Rezultati mnogokratne odpornosti so najnižji pri površinskih vodah, saj se ta pojavlja samo proti enemu antibiotiku od štirih testiranih. Izolati iz piščančjega mesa so bili odporni v nekaj primerih na enega, dva in tudi tri od štirih analiziranih. Tudi iz drugih evropskih držav poročajo, da se mnogokratna odpornost pojavlja največkrat pri izolatih iz živil (EFSA, 2011b).

5.1.1.5 Primerjava med izolati

Vseh analiziranih vzorcev je bilo skupaj 60. Razporeditev po številu je bila približno enaka, saj smo analizirali 21 izolatov iz živil, 19 izolatov iz površinskih voda in 20 izolatov iz humanega blata. Pri vseh 60 se je ne glede na izvor izoliranega seva pojavila 100-odstotna občutljivost proti gentamicinu in kloramfenikolu. Občutljivost na druge antibiotike se je gibala med 9,5 % in vse do 100 % (Preglednica 17).

Primerjava humanih in živilskih izolatov kaže nižji odstotek odpornosti proti antibiotikom pri humanih izolatih (Slika 27). Odstotek odpornih izolatov iz živil je bil v primeru ciprofloksacina 90,5 %, kar je za 5,5 % višji kot pri izolatih iz humanega blata (85 %). Še večje razlike smo opazili v primeru tetraciklina, eritromicina in streptomicina, kjer so bili deleži odpornih živilskih izolatov 42,9, 33,3 in 38,1 %, medtem ko je bila odpornost pri humanih izolatih za tetraciklin 25 % in popolna občutljivost na eritromicin in streptomycin. Odpornost živilskih in humanih izolatov proti nalidiksinski kislini, gentamicinu in kloramfenikolu je bila skoraj enaka oz. je ni bilo (71,4 % in 70 % za nalidiksinsko kislino, 100-odstotna občutljivost na gentamicin in kloramfenikol).

Primerjava odpornosti izolatov iz živil in površinskih voda je razvidna iz slike 27 in nakazuje veliko višji odstotek odpornosti živilskih izolatov, v primeru antibiotikov streptomycin, ciprofloksacin in nalidiksinski kislini. Odstotek odpornih izolatov iz živil je v primeru ciprofloksacina za 74,7 % višji kot pri izolatih iz površinskih voda. Pravtako velja

za nalidiksinsko kislino in streptomicin, kjer so izolati iz živil (71,4 %; 38,1 %) višji za 50,5 % in 22,5 % kot izolati iz voda. Izolati iz živil so bili dodatno odporni proti eritromicinu in teraciklinu, medtem ko so bili izolati iz površinskih voda občutljivi na ta dva antibiotika. Odpornosti izolatov iz živil in površinskih vod proti gentamicinu in kloramfenikolu nismo opazili.

Primerjava izolatov iz površinskih vod in humanih izolatov kaže nižji odstotek odpornosti proti antibiotikom pri izolatih vod (Slika 27). Odstotek odpornih humanih izolatov je bil v primeru ciprofloxacinu 85 %, kar je za 69,2 % višji kot pri izolatih iz voda. Prav tako je bila velika razlika v primeru nalidiksinske kisline, kjer je odstotek odpornih humanih izolatov večji za 48,9 %. Pri izolatih iz površinskih voda smo opazili odpornost proti streptomicinu (15,8 %), medtem ko je pri humanih izolatih ni. Obratna ugotovitev velja pri tetraciklinu, kjer je odpornost prisotna pri humanih izolatih (25 %). Odpornosti humanih izolatov kot izolatov iz površinskih voda nismo opazili pri gentamicinu in kloramfenikolu.

Odpornost se pojavlja hkrati pri vseh izoliranih sevih le pri dveh antibiotikih: ciprofloxacinu in nalidiksinski kislini. Razlika se pojavlja v odstotkih in sicer največji delež odpornih sevov izoliranih iz živil (90,5 %), humanih sevov (85 %) in sevov iz površinskih vod (15,8 %). Prav tako je enako zaporedje sevov pri nalidiksinski kislini. Oba antibiotika spadata med fluorokinolone, ki se že od 90-let prejšnjega stoletja uporablja v veterinarski medicini, predvsem v prieji perutnine, kot tudi v zdravljenju hujših primerov kampilobakterioz pri ljudeh. Prenos v površinske vode je mogoč predvsem preko fecesa perutnine, čiščenja hlevov, klavnic ter izlivov okužene vode v naravo. Preko okužene vode in živali je prenos tudi na ljudi.

Izolati *C. jejuni*, ki so bili izoliranih iz vseh 20 humanih vzorcev in v 8 primerih iz živilskih izolatov so pokazali podobne rezultate pri testiranju odpornosti proti antibiotikom. V obeh virih so bili vsi izolati *C. jejuni* povsem občutljivi na gentamicin, kloramfenikol in eritromicin. Najbolj primerljivi so odstotki odpornosti proti ciprofloxacinu, kjer se pri humanih izolati pojavi v 85 % in pri živilskih v 75 %. Medtem ko so ostali odstotki antibiotikov razhajajoči, saj se odpornost na streptomicin, tetraciklin in nalidiksinsko kislino pojavlja pri humanih izolatih v odstotkih 85, 25 in 70 %, ter živilskih 12,5, 50 in 25 %.

Izolati *C. coli* iz piščančjega meso so bili v primerjavi s *C. jejuni* veliko bolj odporni na posamezne antibiotike. Vendar v naši analizi in humanih sevov nismo identificirali nobenega izolata *C. coli*, kar pa še ne pomeni da ti niso prisotni v humanih vzorcih. V nekaterih državah identificirajo tudi do 30 % *C. coli* pri ljudeh (Kurinčič in sod., 2009), zato smo mi iskali in testirali obe vrsti v vseh vzorcih, ne le *C. jejuni*.

Povezava med izvorom vzorca in odpornostjo proti antibiotikom je dokaj težavna. Dober primer povezanosti kaže le odpornost proti ciprofloxacinu in nalidiksinski kislini med humanimi izolati in izolati iz živil, kjer so odstotki primerljivi. Rezultat o odpornosti izolatov iz površinskih vod na ostale antibiotike ne moremo primerjati s humanimi in živilskimi izolati, oz. obstajajo zelo velike razlike.

V splošnem lahko rečemo, da imajo izolati iz površinskih vod bistveno nižje deleže odpornosti proti testiranim antibiotikom kot izolati iz živil in tudi kot humani izolati. To je primerljivo s trendom ostalih evropskih držav, kjer so izolati bakterij *Campylobacter* iz živali in živil bolj odporni kot humani. O podobni primerjavi med živilskimi, humanimi in izolati iz vode pišejo Lindmark in sod. (2004) iz Švedske, kjer so v analizo vključili 95 humanih vzorcev, 71 vzorcev piščančjega mesa in 11 vzorcev vode. Analiza odpornosti proti šestim antibiotikom je zajemala samo vzorce mesa in vod in je pokazala, da niti en vzorec vod ni bil odporen na antibiotike gentamicin, eritromicin in nalidiksinsko kislino, medtem ko so bili vzorci mesa odporni proti tem trem antibiotikom v zelo majhnem številu ali pa niso bili odporni. Glede na to, da je bila analiza opravljena v državi Severne Evrope, je pričakovati, da so odstotki nizki tako v mesu, kot tudi vodi.

Rezultati o odpornosti, ki smo ji dobili za našo analizo ne kažejo neposredne epidemiološke povezave med okužbo pri ljudeh in kontaminacijo vzorcev, ki smo ji analizirali, še posebej to velja za vzorce površinskih vod. Edina dobra povezava so izolati *C. jejuni* iz piščančjega mesa in ljudi, kjer so odstotki primerljivi. Ta epidemiološka zveza je tudi največkrat poročana po državah Evrope in sveta.

Vendar pa je bilo analizirano zelo majhno število vzorcev in lahko rečemo le to, da se iz rezultatov analiz nakazuje takšna razlaga, ki pa bi jo bilo potrebno še nadalje raziskati in spremljati v večletnih rednih monitoringih.

5.2 SKLEPI

- Z analizo 90 vzorcev površinskih vod ter dodatnih sevov iz mikrobiološke zbirke ter 28 vzorcev piščančjega mesa iz prodaje smo pridobili 19 vodnih in 21 živilskih sevov za nadaljnje testiranje odpornosti proti antibiotikom.
- Vrednosti MIK sedmih antibiotikov za 60 testiranih izolatov bakterij *Campylobacter* iz vod, mesa in humanih vzorcev so bile različne glede na izvor in vrsto sevov. Izstopali so na eni strani vodni sevi z občutljivostjo na večino testiranih antibiotikov, in živilski izolati z velikim deležem odpornih sevov, predvsem na kinolone, tetraciklin in eritromicin ter velikim deležem večkratno odpornih sevov na nesorodne antibiotike. Glede na vrsto smo potrdili večji delež odpornih sevov vrste *C. coli*.
- Rezultati raziskave nakazujejo, da se uvrščamo med države z najvišjim deležem odpornih in večkratno odpornih bakterij rodu *Campylobacter* v piščančjem mesu v prodaji. Delež vzorcev mesa, kontaminiranih z odpornimi sevi, glede na rezultate iz prejšnjih let še vedno narašča, predvsem glede odpornosti proti ciprofloksacinu in eritromicinu.

6 POVZETEK

Živali so pogosto rezervoar bakterij, ki povzročajo pri ljudeh črevesne okužbe. Takšne so tudi kampilobaktri, ki se lahko prenašajo na ljudi s stikom z živalmi ali s kontaminirano hrano in vodo. Najpogosteje jih najdemo v perutninskem mesu, surovem mleku in površinskih vodah. Kampilobaktri se v živilih ne razmnožujejo, saj imajo zahtevne pogoje rasti, a so celice infektivne za ljudi že v majhnem številu. Značilni znaki okužbe so bolečine v trebuhu, vročina, bruhanje in vodne diareje. Zdravljenje z antibiotiki v večini primerov ni potrebno, če bolezen mine sama po sebi v nekaj dneh. V težjih primerih se uporablajo antibiotiki, predvsem eritromicin in ciprofloksacin. Pretirana uporaba antibiotikov, tako v humani kot v veterinarski medicini, povzroča skrb, saj je privedla do povečane bakterijske odpornosti in omejila učinkovitost zdravljenja.

V raziskavo smo vključili 60 izolatov bakterij *Campylobacter*, od tega 19, izoliranih iz površinskih vod, 20 iz humanega blata in 21 iz živil. Cilj analize je bil z mikrodilucijsko metodo določiti minimalne inhibitorne koncentracije 7 različnih antibiotikov in primerjati odpornost izolatov iz različnih virov. Rezultati analize odpornosti proti antibiotikom, so primerljivi predvsem med izolati iz živil in humanega blata, še posebej če upoštevamo le vrsto *C. jejuni*, medtem ko so bili izolati površinskih vod bistveno bolj občutljivi in tako ne nakazujejo neposredne vpletenenosti pri prenosu okužbe na človeka ali živali.

Primerjalna analiza živilskih in humanih izolatov je pokazala velik delež odpornih izolatov v obeh skupinah, še posebej proti ciprofloksacinu, nalidiksinski kislini in tetraciklinu. Predvsem je bil visok delež odpornih izolatov iz živil in ljudi proti ciprofloksacinu (90,5 % in 85 %), ki se uporablja pri zdravljenju humanih kampilobakteriz, sorodni fluorokinoloni pa se uporablajo tudi v prireji piščancev. Glede na rezultate, pridobljene v prejšnjih letih, smo ugotovili povečan delež živilskih izolatov, odpornih proti eritromicinu in streptomicinu, medtem ko so bili humani izolati v naši raziskavi povsem občutljivi na ta dva antibiotika. Odpornosti proti kloramfenikolu in gentamicinu nismo opazili.

Glede na izvor izolatov in pojavnost odpornosti je iz rezultatov naše analize težko sklepati, da se bakterije *Campylobacter*, kot kontaminanti vode in živil, in njihova odpornost proti antibiotikom na splošno prenaša na ljudi preko prehranske verige. Med viri ni bilo očitne neposredne povezave, razen pri rezultatih o deležu odpornih bakterij vrste *C. jejuni* proti ciprofloksacinu in nalidiksinski kislini pri humanih in živilskih izolatih. S kampilobaktri kontaminirano perutninsko meso je poznano kot eden glavnih povzročiteljev kampilobakterioz pri ljudeh.

Število analiziranih izolatov, ki so bili vključeni v eksperimentalno delo diplomske naloge je bilo relativno malo, vendar smo prišli do podobnih odstotkov odpornosti proti določenim antibiotikom, kot jih navajajo drugi viri. Predvsem so podobni rezultati odpornosti proti fluorokinolonskim antibiotikom držav Južne in Srednje Evrope, kamor spada tudi Slovenija, kjer je viden trend naraščanja. Prav tako je znan trend naraščanja odpornosti proti eritromicinu, ki smo ga pri živilskih izolatih glede na bistveno nižje deleže odpornih sevov, potrjenih v prejšnjih letih, opazili tudi pri živilskih izolatih, vključenih v našo raziskavo.

7 VIRI

- Aarestrup F.M., Engberg J. 2001. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. Veterinary Research, 32: 311–321
- Aarestrup F.M., Wegener H.C. 1999. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. Microbes and Infection, 1: 639 – 644
- Adams M. R., Moss M. O. 2008. Food microbiology. 3rd ed. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 192 – 198
- Andlović A. 2002. Kampilobakterji. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 217 – 224
- Avrain L., Humbert F., L'Hospitalier R., Sanders P., Vernozy-Rozand C., Kempf I. 2003. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* from broilers: association with production type and antimicrobial use. Veterinary Microbiology, 96: 267 – 276
- Bardoň J., Kolář M., Karpíšková R., Hricová K. 2011. Prevalence of the thermotolerant *Campylobacter* spp. in the broilers at retail in the Czech Republic and their antibiotic resistance. Food Control, 22: 328 – 332
- Bester L.A., Essack S.Y. 2010. Antibiotic resistance via the food chain: Fact or fiction? South African Journal of Science, 106, 9: 1 – 5
- Berce I., Sarjanović L., Smole Možina S. 2004. Naraščajoča odpornost proti antibiotikom pri mikroorganizmih v prehranski verigi. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 111 – 129
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223 – 253
- CDC. 2008. *Campylobacter*: General information. Atlanta, CDC-Centers for Diseases Control and Prevention: 1 str.
<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/> (november, 2011)
- CDC. 2010. Morbidity and mortality weekly report. Atlanta, CDC - Centers for Diseases Control and Prevention: 418 – 421
<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm5914.pdf> (november, 2011)
- Cordemans D.. 2008. *Campylobacter* rates highest in the world. Auckland, The Epoch Times: 1 str.
<http://www.theepochtimes.com/news/8-3-3/66963.html> (marec 2011)
- Desmonts M.-H., Dufour-Gesbert F., Avrain L., Kempf I. 2004. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from French broilers before and after antimicrobial growth promoter bans. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54: 1025 – 1030
- EFSA. 2011. Antimicrobial resistance: Food-born antimicrobial resistance as a biological hazard. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 4 str.
<http://www.efsa.europa.eu/en/biohaztopics/topic/amr.htm> (marec, 2011)
- EFSA. 2007. Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union 2006. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 107 – 131
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/130r.pdf> (november, 2011)

- EFSA. 2009. Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union 2007. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 109 – 133
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/223r.pdf> (november, 2011)
- EFSA. 2010a. Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union 2008. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 111 – 136
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1496.pdf> (november, 2011)
- EFSA. 2010b. Community summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 67 – 93
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1658.pdf> (november, 2011)
- EFSA. 2010c. Summary: Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008 - Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 2 str.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/s1503.pdf> (november, 2011)
- EFSA. 2010d. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, Part B: *Campylobacter*. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 3 str.
<http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/1503.pdf> (november, 2011)
- EFSA. 2010e. Community summary report: antimicrobial resistance in zoonotic agents from animal and food in the European Union in 2004-2007. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 97 – 126
<http://www.fidin.nl/54687/EFSA-community-summary-report-antimicrobial-resistance-EU-2004-2007-20100427.pdf> (november, 2011)
- EFSA. 2010f. National zoonoses countries reports in the European Union in 2008: Slovenia. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 189 – 217
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/slovenia08.pdf> (november, 2011)
- EFSA. 2011a. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 109 – 135
www.efsa.europa.eu/efsajournal (november, 2011)
- EFSA. 2011b. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 69 – 101
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2154.pdf> (november, 2011)
- EFSA. 2012a. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 112 – 132
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf> (marec, 2012)
- EFSA. 2012b. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2010. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 91 – 123
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2598.pdf> (marec, 2012)

- Engberg J., Andersen S., Skov R., Aarestrup F.M., Gerner-Smidt P. 1999. Comparison of two agar dilution methods and three agar diffusion methods, includin E-test, for antibiotic susceptibility testing thermophilic *Campylobacter* species. Clinical Microbiology and Infection, 5: 580 – 584
- Engberg J., Aarestrup F.M., Taylor D.E., Gerner-Smidt P., Nachmakin I. 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in humans isolates. Emerging Infectious Diseases, 7, 1: 24 – 34
- Ekdahl K., Normann B., Andersson Y. 2005. Could flies explain the elusive epidemiology of campylobacteriosis. BMC Infectious Diseases, 5: 11, doi: 10.1186/1471-2334-5-11: 4 str.
- EUCAST. 2011. Cut-off values recommended by the EU Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance (EURL-AR). Växjö, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: 3 str.
<http://www.eucast.org> (marec, 2011)
- Fanning S., McDowell D., Kelly I., Walsh C., Kennedy J. 2010. The problem of antimicrobial resistance in the food chain. Eastgate, Safe food: 140 str.
<http://www.safefood.eu> (marec, 2011)
- Filipič B. 1996. Antibiotiki. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede: 25 str.
fk.uni-mb.si/fkweb-datoteke/Mikrobiologija/antibiotki.doc (marec 2011)
- Frangež T. 2010. Vpliv vrste vzorcev, obogativitve in metode odkrivanja na učinkovitost detekcije termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 82 str.
- Frederick A., Huda N. 2011. *Campylobacter* in poultry: Incidences and possible control measures. Research Journal of Microbiology, 6, 2: 182 – 192
- Gallay A., Prouzet-Mauléon V., Kempf I., Lehours P., Labadi L., Camou C., Denis M., de Valk H., Desenclos J.-C., Mégraud F. 2007. *Campylobacter* antimicrobial drug resistance among humans, broiler chickens, and pigs, France. Emerging Infectious Diseases, 13, 2: 259 – 266
- Gasparič A., Komel R. 1996. Metode izboljšanja delovnih mikroorganizmov. V: Biotehnologija osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA: 185 – 212
- Ge B., Bodies S., Walker R.D., McDermott P.F., White D.G., Zhao S., 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
- Hansson I. 2007. Bacteriological and epidemiological studies of *Campylobacter* spp. in Swedish broilers. Doctoral dissertation. Upssala, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health Uppsala: 11 – 56
- Hansson I., Pudas N., Harbom B., Olsson Engvall E. 2010. Within-flock variations of *Campylobacter* loads in caeca and on carcasses from broilers. International Journal of Food Microbiology, 141: 51 – 55
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. 2007. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. International Journal of Food Microbiology, 117: 237– 257
- ISO 10272-1. Microbiology of food and animal feeding end enumeration of *Campylobacter* spp.- Part 1: Detection method. 2006: 16 str.

- ISO 17995. Water quality. Detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* species: 2005: 14 str.
- IVZ. 2011. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2010. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 47 – 48
http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=4112.pdf&_5_MediaId=4112&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3 (november, 2011)
- IVZ. 2010. Epidemiološko spremljanje prijavljenih nalezljivih bolezni v Sloveniji 2009. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 47 – 48
http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=2491.pdf&_5_MediaId=2491&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3 (november, 2011)
- IVZ. 2009. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2008. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 37 – 38
http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=1509.pdf&_5_MediaId=1509&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3 (november, 2011)
- Jay J.M., Leossner M.J., Golden D.A. 2005. Modern food microbiology. 7th ed. New York, Springer Science + Business Media: 790 str.
- Jeon B., Muraoka W.T., Zhang Q. 2010. Advances in *Campylobacter* biology applications for biotechnological applications. Microbial Biotechnology, 3: 242 – 258
- Jeršek B. 2004. Metodologija odkrivanja mikrobiološke kontaminacije živil. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 99 – 109
- Kahlmeter G., F.J. Brown D., W. Goldstein F., MacGowan A.P., Mouton J.W., Österlund A., Rodloff A., Steinbakk M., Urbaskova P., Vatopoulos A. 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52: 145 – 148
- Kelana L.C., Griffiths M.W. 2003. Use of an autobioluminescent *Campylobacter jejuni* to monitor cell survival as a function of temperature, pH and sodium chloride. Journal of Food Protection, 66: 2032 – 2037
- Kemp. R., Leatherbarrow A. J. H., Williams N. J., Hart C. A., Clough H. E., Turner J., Wright E. J., French N. P. 2005. Prevalence and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in environmental water samples from a 100-square-kilometer predominantly dairy farming area. Applied and Environmental Microbiology, 71: 1876 – 1882
- Klančnik A. 2006. Odziv bakterij *Campylobacter jejuni* na temperaturni in oksidativni stres. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni poddiplomski študij biotehnologije: 136 str.
- Klančnik A., Botteldoorn N., Herman L., Smole Možina S. 2006. Survival and stress induced expression of *groEL* and *rpoDof* *Campylobacter jejuni* from different growth phases. International Journal of Food Microbiology, 112: 200 – 207
- Kos N.V., Gibreel A., Keelan M., Taylor D.E. 2005. Species identification of erythromycin- resistant *Campylobacter* isolates and optimisation of a duplex PCR for rapid detection. Research in Microbiology, 157: 503 – 507.
- Kotnik V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 427 – 438
- Kovač J. 2011. Molekularna identifikacija in tipizacija bakterij *Campylobacter jejuni* iz različnih virov ter njihova odpornost proti antibiotikom. Diplomsko delo. Ljubljana,

- Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 64 str.
- Kurinčič M., Berce I., Zorman T., Smole Možina S. 2005. The prevalence of multiple antibiotic resistance in *Campylobacter* spp. from retail poultry meat. *Food Technology and Biotechnology*, 43, 2: 157 – 163
- Kurinčič M., Lušicky M., Uzunović-Kamberović S., Smole Možina S. 2009. Epidemiologija in antibiotska odpornost bakterij *Campylobacter* iz vzorcev vod in piščančjega mesa. V: Pomen mikrobiologije in biotehnologije za prihodnost: Protimikrobne snovi. Raspor P., Petković H. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 74 – 83
- Kuusi M., Klemets P., Miettinen I., Laaksonen I., Sarkkinen H., Hänninen M. L., Rautelin H., Kela E., Nuorti J. P.N. 2004. An outbreak of gastroenteritis from a non-chlorinated community water supply. *Journal of Epidemiology Community Health*, 58: 273 – 277
- Lastovica A.J., Le Roux E. 2001. Efficient isolation of *Campylobacter upsaliensis* from stools. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 4222 – 4223
- Lehtopolku M., Nakari U.-M., Kotilainen P., Huovinen P., Siitonen A., J. Hakanen A. 2010. Antimicrobial susceptibilities of multidrug resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: *In vitro* activities of 20 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 3: 1232 – 1236
- Lindmark H., Harbom B., Thebo L., Andersson L., Hedin G., Osterman B., Lindberg T., Andersson Y., Westöö A., Olsson Engvall E. 2004. Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolates from meats, water and humans in Sweden. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 700 – 706
- Luber P., Bartelt E., Genschow E., Wagner J., Hahn H. 2003. Comparison of brothmicrodilution, E test and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 3: 1062 – 1068
- Luber P., Wagner J., Hahn H., Bartelt E. 2003. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2001-2002 from poultry and humans in Berlin, Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 12: 3825 – 3830
- Luangtongkum T., Morishita T.Y., El-Tayeb A.B., Ison A.J., Zhang Q. 2007. Comparison of antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter* spp. by the agar dilution and the agar disk diffusion methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2: 590 – 594
- Luangtongkum T., Jeon B., Han J., Plummer P., Logue C.M., Zhang Q. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission in persistence. *Future Microbiology*, 14, 2: 189 – 200
- Lübeck P.S., Wolfs P., On S.L. W., Ahrens P., Radström P., Hoofar J. 2003. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant campylobacters: Assay development and analytical validation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9: 3664 – 3669
- McDermott P.F., Bodeis-Jones S.M., Fritsche T.R., Jones R.N., Walker R.D. and the *Campylobacter* Susceptibility Testing Group. 2005. Broth microdilution susceptibility test for *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 6136 – 6138

- Medja B. 2007. Mehanizmi odpornosti bakterij *Campylobacter jejuni* in *C. coli* proti izbranim antibiotikom. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81 str.
- Milohnoja M. 2003. Alimentarne infekcije in intoksikacije. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 117 – 139
- Moore J.E., Matsuda M. 2002. The history of *Campylobacter*: Taxonomy and nomenclature. Irish Veterinary Journal, 10: 495 – 501
- Moore J.E., Corcoran D., Dooley J. S. G., Fanning S., Lucey B., Matsuda M., McDowell D. A., Mégraud F., Millar C.B., 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
- Moore J.E., Barton M.D., Blair I.S., Corcoran D., Dooley J.S.G., Fanning S., Kempf I., Lastovica A.J., Lowery C.J., Matsuda M., McDowell D.A., McMahon A., Millar C., Rao J.R., Rooney P.J., Seal B.S., Snelling W.J., Tolba O. 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. Microbes and Infection, 8, 7: 1955 – 1966
- Newell G. D., Koopmans M., Verhoel L., Duizer E., Aidara-Kane A., Sprong H., Opsteegh M., Langelaar M., Threfall J., Scheutz F., Van der Giessen J., Kruse H. 2010. Food-borne diseases – The challenges or 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. International Journal of Food Microbiology, 139, Suppl. 1: S3 - S15
- Peyrat M.B., Soumet C., Maris P., Sanders P. 2008. Recovery of *Campylobacter jejuni* from surfaces of poultry slaughterhouses after cleaning and disinfectin procedures: Analysis of a potential source of carcass contamination. International Journal of Food Microbiology, 124: 188 – 194
- Pezzoti G., Serafin A., Luzzi I., Mionir R., Milan M., Perin R. 2002. Occurence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. International Journal of Food Microbiology, 82, 3: 282 – 287
- Poly F., Guerry P. 2008. Pathogenesis of *Campylobacter*. Current Opinion in Gastroenterology, 24: 27 – 31
- Quinn T., Bolla J.-M., Pages J.-M., Fanning S. 2007. Antibiotic-resistant *Campylobacter*: Could efflux pump inhibitors control infection? Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59, 6: 1230 – 1236
- Rahimi E., Reza Kazemeini H., Safael S., Allahbakhshi K., Momeni M., Riahi M. 2010. Detection and identification of *Campylobacter spp.* from retail raw chicken, turkey, sheep and goat meat in Ahvaz, Iran. African Journal of Microbiology Research, 4, 15: 1620 – 1623
- Rantsiou K., Lambreti C., Cocolin L. 2010. Survey of *Campylobacter jejuni* in retail chicken meat products by application of a quantitative PCR protocol. International Journal of Food Microbiology, 141, Suppl. 1: S75 - S79
- Rollinson D. M., Colwell R. R. 1986. Viable but non culturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Applied and Environmental Microbiology, 52: 531 – 538
- 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

- Smole Možina S., Kurinčič M., Klančnik A., Mavri A. 2011. *Campylobacter* and multi-resistance in the food chain. Trends in Food Science & Tehnology, 22: 91 – 98
- Smole Možina S., Uzunović-Kamberović S. 2005. *Campylobacter* spp. as emerging food borne pathogen – incidence, detection and resistance. Medicinski glasnik, 2, 1: 2 – 15
- Suzuki H., Yamamoto S. 2008. *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in the world: a literature survey. Journal of Veterinary Medical Science, 71, 3: 255– 261
- Tambur Z., Miljkovic-Selimovic B., Kulisic Z., Mirkovic D., Doder R., Stanimirovic Z. 2011. Resistance to erythromycin of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from animals and humans. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5, 3: 342 – 246
- Uzunović-Kamberović S., Zorman T., Berce I., Herman L., Smole Možina S. 2009. Comparison of the frequency and the occurrence of antimicrobial resistance among *C. jejuni* and *C. coli* isolated from human infections, retail poultry meat and poultry in Zenica-Doboj canton, Bosnia and Herzegovina. Medicinski Glasnik, 6, 2: 173 – 180
- Van Deun K., Haesebrouck F., Heyndrickx M., Favoreel H., Dewulf J., Ceelen L., Dumez L., Messens W., Leleu S., Van Immerseel F., Ducatelle R., Pasmans F. 2007. Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. Journal of Medical Microbiology, 56: 1284 – 1289
- Varagić V.M., Milošević M.P. 1999. Farmakologija. Beograd, Elit-Medica: 575 – 606
- Verhoeff-Bakkenes L., Jansen H.A.P.M., Veld P.H. in 't, Beumer R.R., Zweitering M.H., van Leusden F.M. 2010. Consumption of raw vegetables and fruits: A risk factor for *Campylobacter* infections. International Journal of Food Microbiology, 144, 3: 406– 412
- Vester B., Douthwaiths S. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in rRNA. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 45, 1: 1 – 12
- VURS. 2011. Poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2010. Ljubljana, Veterinarska uprava Republike Slovenije: 21 – 26
<http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/zoonoze/LPzoonoze2010.pdf> (november, 2011)
- VURS. 2010. Letno poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2009. Ljubljana, Veterinarska uprava Republike Slovenije: 18 – 23
http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/zoonoze/Letno_poročilo_o_zoonozah_Slovenija_2009.pdf (november, 2011)
- White D.G., Zhao S., Simjee S., Wagner D.D., McDermott P. 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. Microbes and Infection 4, 4: 405 – 412
- Woods G. L., Washington J.A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. V: Manual of clinical microbiology. 7th ed. Murray P. R., Baron E. J., Pfader M. A., Tenover F. C., Yolken R. H. (eds.). Washington, ASM Press : 1327 – 1341
- Yang C., Jiang Y., Huang K., Zhu C., Yin Y. 2003. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. Immunology and Medical Microbiology, 38: 265 – 271
- Zorman T., Smole Možina S. 2004. Identifikacija patogenih bakterij iz hrane s klasično in metodologijo PCR – primer *Campylobacter*. V: Mikrobiologija in biotehnologija v

proizvodnji varnih živil. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 195 – 207

Zorman T., Smole Možina S. 2002. Classical and molecular identification of thermotolerant *Campylobacters* from poultry meat. Food Technology and Biotechnology, 40: 177 – 184

ZAHVALA

Iskrena zahvala mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za prijaznost in strokovno pomoč pri pisanju diplome ter čas, ki mi ga je namenila.

Hvala recenzentki prof. dr. Lei Gašperlin za recenzijo diplomske naloge.

Hvala vsem zaposlenim na Oddelku za Mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor za prijaznost in pomoč pri delu v njihovem Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo. Predvsem iskrena zahvala mag. Mariji Lušicky za mentorstvo in koristne napotke v času upravljanja eksperimentalnega dela, ter Mojci C. in Mojci Š. za vso pomoč in nasvete.

Posebna zahvala moji družini in Martinu, da so me spremljali in vzpodbjali v času študija, ter mi stali ob strani tudi v najtežjih trenutkih. Hvala zvezdicama, ki sijeta z neba in pazita name.

Zahvala tudi vsem prijateljicam, za podporo in nasmejane, nepozabne dni.

PRILOGE

Priloga A: Rezultati identifikacije bakterij *Campylobacter* s klasično (ISO 17995:2005) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih površinskih vod.

| Oznaka vzorca | Obogatitev | Klasična metoda – ISO 17995:2005 | Identifikacija seva | Molekularna metoda – PCR v realnem času | Identifikacija seva |
|---------------|------------|----------------------------------|---------------------|---|---------------------|
| 27 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 28 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 29 | Bolton | P | <i>C. jejuni</i> | 14,67 | <i>C. jejuni</i> |
| | Preston | P | <i>C. jejuni</i> | 15,81 | <i>C. jejuni</i> |
| 30 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 31 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 32 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 33 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 34 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 15,49 | <i>C. coli</i> |
| | Preston | P | <i>C. coli</i> | 20,84 | <i>C. coli</i> |
| 35 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 36 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 37 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 38 | Bolton | N | / | 32,95 | vsi sevi negativni |
| | Preston | N | / | N | / |
| 41 | Bolton | N | / | P | <i>C. jejuni</i> |
| | Preston | P | <i>C. jejuni</i> | P | <i>C. jejuni</i> |
| 42 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 43 | Bolton | N | / | 20,57 | vsi sevi negativni |
| | Preston | N | / | N | / |
| 44 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 47 | Bolton | N | / | 31,93 | vsi sevi negativni |
| | Preston | N | / | 29,8 | vsi sevi negativni |
| 48 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 49 | Bolton | N | / | 27,72 | vsi sevi negativni |
| | Preston | N | / | 26,49 | vsi sevi negativni |
| 50 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 51 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 55 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 56 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 57 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |

Se nadaljuje ...

Nadaljevanje...

Priloga A: Rezultati identifikacije bakterij *Campylobacter* s klasično (ISO 17995:2005) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih površinskih vod.

| Oznaka vzorca | Obogatitev | Klasična metoda – ISO 17995:2005 | Identifikacija seva | Molekularna metoda – PCR v realnem času | Identifikacija seva |
|---------------|------------|----------------------------------|---------------------|---|---------------------|
| 74 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 75 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 76 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 77 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 78 | Bolton | P | <i>C. species</i> | 13,6 | vsi sevi negativni |
| | Preston | P | <i>C. species</i> | 14,75 | vsi sevi negativni |
| 84 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 85 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 86 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 87 | Bolton | N | / | 32,61 | <i>C. coli</i> |
| | Preston | N | / | N | / |
| 88 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 89 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | 22,01 | <i>C. jejuni</i> |
| 90 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 91 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 92 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 93 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | 36,07 | <i>C. coli</i> |
| 105 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 143 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 144 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | 29,8 | <i>C. coli</i> |
| 145 | Bolton | P | <i>C. lari</i> | 14,18 | vsi sevi negativni |
| | Preston | P | <i>C. lari</i> | 16,08 | vsi sevi negativni |
| 146 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 147 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 148 | Bolton | N | / | 35,42 | vsi sevi negativni |
| | Preston | N | / | N | / |
| 154 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 155 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | P | <i>C. coli</i> |
| | Preston | P | <i>C. coli</i> | P | <i>C. coli</i> |
| 156 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |

Se nadaljuje ...

Nadaljevanje...

Priloga A: Rezultati identifikacije bakterij *Campylobacter* s klasično (ISO 17995:2005) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih površinskih vod.

| Oznaka vzorca | Obogatitev | Klasična metoda – ISO 17995:2005 | Identifikacija seva | Molekularna metoda – PCR v realnem času | Identifikacija seva |
|---------------|------------|----------------------------------|---------------------|---|---------------------|
| 157 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 158 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 159 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 160 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 8779 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | N | / |
| | Preston | P | <i>C. coli</i> | 21,52 | <i>C. coli</i> |
| 168 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 169 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 170 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 171 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 172 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 173 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 175 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 176 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 177 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 187 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 178 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 20,96 | <i>C. coli</i> |
| | Preston | P | <i>C. coli</i> | 21,93 | <i>C. coli</i> |
| 179 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 180 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 181 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 182 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 184 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 185 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 186 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 188 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |

Se nadaljuje ...

Nadaljevanje...

Priloga A: Rezultati identifikacije bakterij *Campylobacter* s klasično (ISO 17995:2005) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih površinskih vod.

| Oznaka vzorca | Obogatitev | Klasična metoda – ISO 17995:2005 | Identifikacija seva | Molekularna metoda – PCR v realnem času | Identifikacija seva |
|---------------|------------|----------------------------------|---------------------|---|------------------------|
| 189 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 190 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 191 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | P | / | 28,14 | <i>C. jejuni</i> |
| 192 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 4805 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 15,43 | <i>C. coli</i> |
| | Preston | N | / | N | / |
| 4808 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 4810 | Bolton | N | / | N | |
| | Preston | N | / | 33,9 | <i>C.coli/C.jejuni</i> |
| 193 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 194 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 195 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 196 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 197 | Bolton | P | <i>C. jejuni</i> | N | / |
| | Preston | P | / | N | / |
| 198 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 199 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 200 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 201 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 202 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 203 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 204 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |
| 205 | Bolton | N | / | N | / |
| | Preston | N | / | N | / |

Legenda:

- / : Oznaka vzorca, ki je označena z rdečo barvo ponazarja vzorce, ki so bili identificirani kot *Campylobacter jejuni* ali *coli* s klasično in PCR metodo. Ti izolati so bili prav tako uporabljeni v mikrodilucijski metodi za določitev odpornosti na antibiotike.
- ponazarja, da so bile v vzorcih površinskih vod najdene druge bakterije (predvsem bakterije belih kolonij) ali pa je bilo gojišče mCCDA po inkubaciji sterilno.

Priloga B: Rezultati identifikacije bakterij *Campylobacter* s klasično (ISO 10272-1) in molekularno metodo (PCR v realnem času) v vzorcih perutninskega mesa.

| Oznaka vzorca | Obogatitev | Klasična metoda- ISO 10272-1 | Identifikacija seva | Molekularna metoda – PCR v realnem času | Identifikacija seva |
|---------------|------------|------------------------------|---------------------|---|----------------------|
| 161 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 11,91 | <i>C. coli</i> |
| 162 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 13,13 | <i>C. coli</i> |
| 163 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 13,07 | <i>C. coli</i> |
| 164 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 17,58 | <i>C. coli</i> |
| 165 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 15,55 | <i>C. coli</i> |
| 166 | Bolton | N | / | 27,03 | <i>C. jejuni</i> |
| 167 | Bolton | N | / | 31,33 | <i>C. jejuni</i> |
| 247 | Bolton | P | <i>C. jejuni</i> | 15,09 | <i>C. jejuni</i> |
| 248 | Bolton | P | <i>C. jejuni</i> | 16,35 | <i>C. jejuni</i> |
| 249 | Bolton | P | <i>C. jejuni</i> | 16,16 | <i>C. coli</i> |
| 250 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 19,39 | <i>C.coli+jejuni</i> |
| 251 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 18,37 | <i>C.coli+jejuni</i> |
| 252 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 23,09 | <i>C. coli</i> |
| 253 | Bolton | P | <i>C. jejuni</i> | 20 | <i>C.coli+jejuni</i> |
| 254 | Bolton | P | <i>C. jejuni</i> | 21,59 | <i>C.coli+jejuni</i> |
| 255 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 17,88 | <i>C.coli+jejuni</i> |
| 256 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 22,29 | <i>C.coli+jejuni</i> |
| 273 | Bolton | P | <i>C. jejuni</i> | 28,1 | <i>C. jejuni</i> |
| 274 | Bolton | N | / | 31,08 | <i>C. jejuni</i> |
| 275 | Bolton | P | <i>C. jejuni</i> | 29,71 | <i>C. jejuni</i> |
| 276 | Bolton | N | / | 30,98 | <i>C.coli+jejuni</i> |
| 277 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 16,98 | <i>C. coli</i> |
| 278 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 19,14 | <i>C. coli</i> |
| 279 | Bolton | P | <i>C. jejuni</i> | 28,15 | <i>C. jejuni</i> |
| 280 | Bolton | N | / | 30,68 | <i>C. jejuni</i> |
| 281 | Bolton | P | <i>C. jejuni</i> | 33,86 | <i>C. jejuni</i> |
| 282 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 27,49 | <i>C. coli</i> |
| 283 | Bolton | P | <i>C. coli</i> | 19,86 | <i>C. coli</i> |

Legenda:

- Oznaka vzorca, ki je označena z rdečo barvo, ponazarja vzorce, ki so bili identificirani kot *Campylobacter jejuni* ali *C. coli* s klasično in PCR metodo. Ti izolati so bili prav tako uporabljeni v mikrodilucijski metodi za določitev odpornosti na antibiotike.
- / : ponazarja, da so bile v vzorcih površinskih vod najdene druge bakterije (predvsem bakterije belih kolonij) ali pa je bilo gojišče mCCDA po inkubaciji sterilno.