

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jasna KOVAC

**MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IN TIPIZACIJA
BAKTERIJ *Campylobacter jejuni* IZ RAZLIČNIH
VIROV TER NJIHOVA ODPORNOST PROTI
ANTIBIOTIKOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jasna KOVAČ

**MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IN TIPIZACIJA BAKTERIJ
Campylobacter jejuni IZ RAZLIČNIH VIROV TER NJIHOVA
ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**MOLECULAR IDENTIFICATION AND TYPING OF *Campylobacter*
jejuni FROM DIFFERENT SOURCES AND THEIR ANTIBIOTIC
RESISTANCE**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in v Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo na Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina, za recenzentko pa prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzentka: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter Raspot
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzentka: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jasna Kovač

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.24/.26: 615.33: 579.61.08 (043)=163.6
KG patogeni mikroorganizmi/*Campylobacter*/kampilobakterioze/kontaminacija mesa/odpornost proti antibiotikom/mnogokratni PCR/identifikacija/genotipizacija/patogeneza
AV KOVAC, Jasna
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/MARINŠEK LOGAR, Romana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2011
IN MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA IN TIPIZACIJA BAKTERIJ *Campylobacter jejuni* IZ RAZLIČNIH VIROV TER NJIHOVA ODPORNOST PROTI ANTIBIOTIKOM
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 65 str., 23 pregl., 32 sl., 76 vir.
IJ sl
JI sl /en
AI Kampilobaktri so v zadnjem desetletju postali najpogosteji povzročitelji bolezni, povezanih z živili. Prav tako se povečuje njihova odpornost proti protimikrobnim zdravilom, pri tem pa ni povsem jasna njihova epidemiologija oz. pomen izvora sevov. V eksperimentalni del naloge smo vključili 125 sevov rodu *Campylobacter*, izoliranih večinoma v letu 2009 iz mesa, vode, kože in fecesa živali ter humanih kliničnih vzorcev. Najprej smo njihovo konvencionalno identifikacijo vrste po ISO 10272:1995 potrdili z molekularno metodo. Nato smo z izbranimi 63 sevi, ki so bili z obema metodama identificirani kot *Campylobacter jejuni*, testirali 12 novih genetskih označevalcev, za katere smo predvidevali, da so sposobni razlikovanja sevov iz različnih virov. Končno smo 74 živilskim sevom in 11 humanim sevom z metodo mikrodilucije določili še antibiotsko odpornost proti sedmim protimikrobnim zdravilom (gentamicinu, streptomycinu, eritromycinu, tetraciklinu, nalidiksinski kislini, kloramfenikolu in ciprofloxacinu). Molekularna metoda identifikacije je v 100 % potrdila konvecionalno identificirano vrsto enega in v 76,2 % drugega laboratorija, v katerih so bili sevi predhodno identificirani s standardno metodo. To nakazuje, da klasična metoda identifikacije zaradi subjektivnega vrednotenja hipuratnega testa ni vedno zanesljiva. Analiza rezultatov preizkušanja uporabnosti predvidoma diskriminatornih oligonukleotidnih začetnikov ni pokazala jasnih razlik med izvori sevov, je pa nakazala razlikovanje vodnih izolatov od vseh ostalih. V primerjalno analizo odpornosti sevov proti antibiotikom smo poleg sevov, eksperimentalno obdelanih v tej nalogi, vključili še rezultate 200 humanih izolatov *Campylobacter* iz leta 2009, ki so jih testirali na Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor. Ti so bili pridobljeni z metodo difuzije z diskami, a so bili rezultati, dobljeni z dilucijsko metodo, v okviru te naloge popolnoma identični. Živilski sevi so bili zelo pogosto odporni proti ciprofloxacinu (85,1 %) in nalidiksinski kislini (86,5 %), pa tudi proti tetraciklinu (54,1 %) in eritromycinu (9,5 %). V primerjavi s humanimi sevi je bilo za 30 % več živilskih sevov odpornih proti ciprofloxacinu, ter za 31,6 % več proti tetraciklinu in za 9,5 % proti eritromycinu. Tudi mnogokratna odpornost je bila pogostejša med živilskimi sevi, saj je bilo na vsa testirana protimikrobnna zdravila občutljivih 41 % humanih in le 16 % živilskih sevov. V primerjavi z letom 2008 je stopnja odpornosti izolatov iz mesa proti večini antibiotikov narasla.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24/.26: 615.33: 579.61.08 (043)=163.6
CX pathogens/*Campylobacter*/campilobacteriosis/meat contamination/antibiotic resistance/duplex PCR/identification/genotyping/pathogenesis
AU KOVAČ, Jasna
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/MARINŠEK LOGAR, Romana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2011
TI MOLECULAR IDENTIFICATION AND TYPING OF *Campylobacter jejuni* FROM DIFFERENT SOURCES AND THEIR ANTIBIOTIC RESISTANCE
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 65 p., 23 tab., 32 fig., 73 ref.
LA sl
AL sl / en

AB In the last decade campylobacters have become the leading cause of foodborne deseases. In addition to that, their antibiotic resistance is growing although its epidemiology and importance of strain origin is not yet fully understood. In experimental part of our research we included 125 strains of the genus *Campylobacter*, isolated from meat, water, skin and feces of animals and human clinical samples in the year 2009. Firstly, we confirmed conventional species identification by ISO 10272:1995 with molecular method. Sixty-three isolates which have been reconfirmed to be *C. jejuni* have been used for validation of 12 new genetic markers which were supposed to be able to discriminate between isolates from different sources. Finally, we have tested 74 meat and 11 human *Campylobacter* isolates for antibiotic resistance against seven antibiotics (gentamicin, streptomycin, tetracycline, nalidixic acid, chloramphenicol, erythromycin, ciprofloxacin) with the method of microdilution. Molecular identification has reconfirmed the conventional identification of strains coming from two different labs in 100 % and 76,2 % of the cases, respectively. That implies the unreliability of conventional identification because of the subjective evaluation of hippurate test results. The analysis of the results of testing discriminative genetic markers have shown no significant differences between strains from different sources, although the genetic profile of water strains have differed from others. Besides experimentally obtained results of antibiotic resistance, we have included in our research also the results of 200 human *Campylobacter* isolates from 2009, tested at Public Health Institute Maribor. Those strains were tested with disc diffusion method but the results were identical to those obtained experimentally in this work with microdilution method. Food strains were highly resistant to ciprofloxacin (85,1 %), nalidixic acid (86,5 %), tetracycline (54,1 %) as well as to erythromycin (9,5 %). Compared to human strains, there were more strains resistant to ciprofloxacin, tetracycline and erythromycin, for 30 %, 31,6 % and 9,5 %, respectively. Also their multiple drug resistance was more frequent, as there was 41% of human and only 16% of food strains completely sensitive to all tested antibiotics. In comparison to the year 2008 the overall antibiotic resistance has increased.

KAZALO VSEBINE

Stran	
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE DIPLOMSKE NALOGE	2
1.1.1 Cilji diplomske naloge	2
1.1.2 Delovne hipoteze diplomske naloge.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Campylobacter</i>	3
2.1.1 Splošne značilnosti bakterij rodu <i>Campylobacter</i>	3
2.1.2 Fiziologija bakterij <i>Campylobacter</i>	3
2.1.3 Patogeneza bakterij rodu <i>Campylobacter</i> in simptomi obolenja	5
2.1.4 Incidenca humanih kampilobakterioz	6
2.1.5 Epidemiologija	8
2.1.6 Preprečevanje prenosa bolezni	9
2.1.7 Prevalenca mesa v prometu, kontaminiranega z bakterijami <i>Campylobacter</i> .	11
2.1.8 Odpornost bakterij rodu <i>Campylobacter</i> proti antibiotikom.....	12
2.1.8.1 Splošni trendi odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i>	12
2.1.8.2 Prevalenca odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i> proti antibiotikom	12
2.1.8.3 Mehanizmi odpornosti	14
2.1.8.4 Prenos determinant za odpornost proti antibiotikom	16
2.1.9 Metode identifikacije bakterij rodu <i>Campylobacter</i>	16
2.1.10 Genotipizacija bakterij <i>Campylobacter jejuni</i>	17
3 MATERIAL IN METODE.....	19
3.1 SHEMATSKI PRIKAZ OPRAVLJENEGA DELA	19
3.2 MATERIAL	20
3.2.1 Mikroorganizmi	20
3.2.2 Mikrobiološka gojišča	20

3.2.2.1 Ovčji krvni agar	20
3.2.2.2 Gojišče CCDA	21
3.2.2.3 Selektivni krvni agar Columbia	21
3.2.2.4 Agar Campylosel.....	22
3.2.2.5 Gojišče za zamrzovanje	22
3.2.3 Reagenti	23
3.2.3.1 Reagenti za PCR	23
3.2.3.2 Reagenti za gelsko elektroforezo	24
3.2.4 Laboratorijska oprema	26
3.2 METODE DELA.....	28
3.3.1 Revitalizacija kultur	28
3.3.2 Molekularna identifikacija bakterij <i>Campylobacter jejuni</i> in <i>Campylobacter coli</i> z metodo PCR.....	28
3.3.2.1 Priprava lizata kulture	28
3.3.2.2 Princip in izvedba metode.....	28
3.3.3 Genotipizacija bakterij <i>Campylobacter jejuni</i> z mnogokratnim PCR.....	29
3.3.3.1 Priprava lizata kulture	29
3.3.3.2 Princip in izvedba metode	29
3.3.4 Gelska elektroforeza	30
3.3.4.1 Priprava agarognega gela	30
3.3.4.2 Princip in izvedba metode.....	30
3.3.4.3 Odčitavanje rezultatov	31
3.3.5 Analiza rezultatov genotipizacije	31
3.3.6 Metoda ugotavljanja odpornosti proti antibiotikom z mikrodilucijo na ploščah Sensititre® (Trek Diagnostic Systems)	32
3.3.6.1 Priprava vcepkna.....	32
3.3.6.2 Princip in izvedba metode	32
4 REZULTATI.....	35
4.1 MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ <i>Campylobacter</i> Z METODO PCR	35
4.2 GENOTIPIZACIJA BAKTERIJ <i>Campylobacter jejuni</i> Z MNOGOKRATNIM PCR	39
4.3 ANTIBIOTSKA ODPORNOST BAKTERIJ <i>Campylobacter</i>	42
4.3.1 Antibiotksa odpornost izolatov <i>Campylobacter</i> iz hrane	42
4.3.1 Antibiotksa odpornost humanih izolatov <i>Campylobacter</i>	45
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	50
5.1 RAZPRAVA	50
5.1.1 Standardna in molekularna identifikacija bakterij <i>Campylobacter jejuni</i> in <i>Campylobacter coli</i>	50
5.1.2 Analiza rezultatov genotipizacije	50
5.1.3 Analiza rezultatov testiranja izolatov <i>Campylobacter</i> na odpornosti proti antibiotikom	51
5.1.3.1 Analiza rezultatov testiranja izolatov <i>Campylobacter</i> iz hrane na odpornost proti antibiotikom	51

5.1.3.2 Analiza rezultatov testiranja humanih izolatov <i>Campylobacter</i> na odpornosti proti antibiotikom.....	52
5.1.3.3 Primerjava rezultatov testiranja humanih izolatov in izolatov <i>Campylobacter</i> iz hrane na odpornosti proti antibiotikom.....	53
5.1.3.4 Vzroki za visoko prevalenco odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i> proti nekaterim antibiotikom	54
5.2 SKLEPI	55
6 POVZETEK	56
7 VIRI	57
ZAHVALA	64

KAZALO SLIK

	Stran
Slika 1: Bakterije rodu <i>Campylobacter</i> (CDC, 2008).....	3
Slika 2: Vloga virulentnih dejavnikov ob vdoru bakterij <i>Campylobacter</i> v celice črevesnega epitelija (Snelling in sod., 2005);	6
Slika 3: Prevalenca kampilobakterioz in salmoneloz v Sloveniji od leta 2000 do 2009 (IVZ, 2001 – 2010)	7
Slika 4: Vir infekcij z bakterijami <i>Campylobacter</i> spp. (Young in sod., 2007)	8
Slika 5: Prevalenca z bakterijami <i>Campylobacter</i> kontaminiranih analiziranih vzorcev mesa in živali (EFSA, 2006 – 2010a; Smole Možina in sod., 2011)	11
Slika 6: Prevalenca kontaminacije mesa z bakterijami <i>Campylobacter</i> med leti 2004 in 2008 (EFSA, 2006 –2010a)	12
Slika 7: Odstotek izolatov <i>Campylobacter</i> spp. iz perutnine v letu 2008, odpornih proti ciprofloksacinu (EFSA, 2010e)	13
Slika 8: Odstotek <i>Campylobacter</i> spp. iz perutnine v letu 2008, odpornih proti eritromicinu (EFSA, 2010e).....	13
Slika 9: Odstotek <i>Campylobacter</i> spp. iz perutnine v letu 2008, odpornih proti tetraciklinu (EFSA, 2010e)	14
Slika 10: Strukturna formula ciprofloksacina (fluorokinolon) (FDA, 2009).....	14
Slika 11: Strukturna formula eritromicina (makrolid) (FDA, 2006)	15
Slika 12: Strukturna formula tetraciklina (FDA, 2010).....	15
Slika 13: Shema poskusa diplomskega dela	1
Slika 14: Molekulski označevalec pomnožkov DNK – 100 bp na agaroznem geli (Fermentas, 2011)	25
Slika 15: Naprava za PCR, BioRad	29
Slika 16: Banjica za gelsko elektroforezo (levo)	30
Slika 17: Generator elektroforeze BioRad (desno)	30
Slika 18: Komora za fotografiranje agaroznih gelov pod svetlobo UV spektra.....	31
Slika 19: <i>Campylobacter</i> spp. na ovčjem krvnem agarju (levo).....	32
Slika 20: Epruveti z gojiščem Sensititre® CAMHBT+LHB (desno).....	32
Slika 21: Shema mikrotitrtske ploščice Sensititre® za določanje odpornosti	33
Slika 22: <i>Campylobacter</i> spp. na gojišču CCDA (levo)	33
Slika 23: Sensititre® mikrotitrtska ploščica za določanje odpornosti (desno)	33
Slika 24: Primer agarognega gela s pomnožki PCR za identifikacijo vrst <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i>	35
Slika 25: Razvrstitev izolatov <i>Campylobacter jejuni</i> po podobnosti dobljenih rezultatov s 6 genetskimi označevalci.....	41
Slika 26: Mnogokratna odpornost izolatov <i>Campylobacter</i> iz mesa v letu 2009. Upoštevani so antibiotiki: gentamicin, ciprofloksacin, tetraciklin in eritromicin.....	45
Slika 27: Mnogokratna odpornost humanih izolatov <i>Campylobacter</i> v letu 2009. Upoštevani so antibiotiki: gentamicin, ciprofloksacin, tetraciklin in eritromicin.....	47
Slika 28: Delež proti posameznim antibiotikom odpornih izolatov <i>Campylobacter</i> iz mesa v letu 2009 (N=65); odpornost določena z metodo mikrodilucije	47

Slika 29: Primerjava odpornosti slovenskih izolatov <i>Campylobacter</i> iz mesa v letu 2008 in 2009; odpornost določena z metodo mikrodilucije (za leto 2008 v okviru slovenskega poročila EFSA, za leto 2009 v tej diplomski nalogi)	48
Slika 30: Odpornost humanih izolatov <i>Campylobacter</i> spp. proti posameznim antibiotikom v letu 2009; odpornost določena z metodo difuzije z diskami	48
Slika 31: Odpornost slovenskih humanih izolatov <i>Campylobacter</i> v letu 2008 in 2009; odpornost določena z metodo difuzije z diskami.....	49
Slika 32: Delež odpornih izolatov <i>Campylobacter</i> iz hrane in humanih kliničnih vzorcev v letu 2009	49

KAZALO PREGLEDNIC

Stran

Preglednica 1: Incidenca in prevalenca prijavljenih kampilobakterioz in salmoneloz v Evropi od leta 2004 do 2008 (EFSA, 2006 – 2010a)	7
Preglednica 2: Sestavine osnovnega agarja Blood agar base No.2 (Oxoid, CM0271)	20
Preglednica 3: Sestavine krvnega ovčjega agarja	20
Preglednica 4: Sestavine osnovnega gojišča CCDA (Oxoid, CM739)	21
Preglednica 5: Sestavine dodatka za selektivnost CCDA Selective Supplement (Oxoid, SR155E).....	21
Preglednica 6: Sestavine osnovnega gojišča Columbia (Oxoid, SR048C).....	21
Preglednica 7: Sestavine dodatka za rast (Oxoid, SR232E)	22
Preglednica 8: Sestavine dodatka za selektivnost (Oxoid, SR069)	22
Preglednica 9: Sestavine gojišča za zamrzovanje (za 1 enoto).....	22
Preglednica 10: Sestavine gojišča Brain Heart Infusion (Oxoid CM0375)	23
Preglednica 11: Sestava 2% agarognega gela	24
Preglednica 12: Sestava 10x pufra TAE	24
Preglednica 13: Sestava 0,5x pufra TAE	25
Preglednica 14: Sestava molekulskega označevalca dolžin pomnožkov DNK – 100 bp	25
Preglednica 15: Rezultati molekularne identifikacije <i>Campylobacter jejuni</i> in <i>C. coli</i> v primerjavi s klasično identifikacijo	36
Preglednica 16: Prikaz dobljenih pomnožkov genotipizacije izolatov <i>Campylobacter jejuni</i> iz različnih virov	39
Preglednica 17: Ugotovljene vrednosti MIK ($\mu\text{g}/\text{ml}$) testiranih izolatov <i>Campylobacter</i> spp. iz piščančjega mesa.....	42
Preglednica 18: Parametri ugotavljanja odpornosti z metodo mikrodilucije (EFSA, 2007c).....	44
Preglednica 19: Odstotek proti posameznim antibiotikom odpornih izolatov <i>Campylobacter</i> iz hrane; odpornost določena z metodo mikrodilucije.....	44
Preglednica 20: Minimalne inhibitorne koncentracije naključno izbranih 11 humanih izolatov <i>Campylobacter</i> spp. iz leta 2009, določene z metodo mikrodilucije	45
Preglednica 21: Odpornost izbranih 11 humanih izolatov <i>Campylobacter</i> spp. iz leta 2009, določena z metodo difuzije z diskri	46
Preglednica 22: Parametri ugotavljanja odpornosti z metodo difuzije z diskri (EFSA, 2010a).....	46
Preglednica 23: Odstotek proti posameznim antibiotikom odpornih humanih izolatov <i>Campylobacter</i> ; odpornost določena z metodo difuzije z diskri	47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AhpC	Alkil hidroperoksid reduktaza (angl. alkyl hydroperoxid reductase)
aspA	Aspartokinazni gen
BHI	Možgansko-srčni infuzijski bujon (angl. Brain Heart Infusion Broth)
Bp	Bazni pari
CCDA	Ogljeni cefoperazon deoksiholat agar (angl. charcoal cefoperazone desoxycholate agar)
CDC	Center za nadzor in preprečevanje bolezni (angl. Centers for Disease Control and Prevention)
CFU	Število kolonijskih enot (angl. colony forming units)
CIP	Ciprofloksacin (angl. ciprofloxacin)
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CAMHBT	Tekoče gojišče Mueller Hinton s pufom TES
CAMHBT+LHB	Tekoče gojišče Mueller Hinton s pufom TES in dodatkom defibrinirane konjske krvi
CHL	Kloramfenikol (angl. Chloramphenicol)
CDT	Citoletalni toksin (angl. Cytolethal Distending Toxin)
dNTP	Deoksinukleotid trifosfat (angl. Deoxynucleotide Triphosphate)
DnaJ	Protein toplotnega stresa
DnaK	Šaperon
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
ddH ₂ O	Dvakrat destilirana voda
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (angl. European Food Safety Authority)
ERY	Eritromicin
FlaRS	Dvokomponentni regulatorni sistem za nadzor gibanja bička
GrpE	Protein toplotnega stresa
GBS	Guillain-Barré-ov sindrom
GEN	Gentamicin
hipO	Hipurikazni gen O
HspR	Negativni regulator izražanja genov toplotnega stresa
HrcA	Protein toplotnega stresa
HACCP	Analiza tveganja in ugotavljanja kritičnih kontrolnih točk (angl. Hazard Analysis Critical Control Point)
KatA	Glavni katalazni gen
LOS	Lipoooligosaharidni sloj
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
ml	Mililiter
NaCl	Natrijev klorid
NAL	Nalidiksinska kislina
OxyR	Regulatorni sistem za odgovor na oksidativni stres
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PCR-ELISA	Verižna reakcija s polimerazo – encimski imunski test (angl. Polymerase Chain Reaction - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
PerR	Regulatorni gen za odporost proti peroksidu v stacionarni fazи

QRDR	Regija kinolonskih odpornostnih determinant (angl. Quinolone Resistance-Determining Region)
RNK	Ribonukleinska kislina
RacRS	Regulatorni sistem za odziv na toplotni stres pri bakterijah <i>Campylobacter</i>
rpm	Obrati na minuto (angl. rounds per minute)
spp.	Vrsta (lat. species)
STR	Streptomicin
SoxRS	Regulatorni sistem za odgovor na oksidativni stres
<i>SpoT</i>	Gen za obvladovanje splošnega stresnega odziva
TAE	Tris baza/acetat/EDTA
TET	Tetraciklin
<i>tet(O)</i>	Genski zapis za odpornost proti tetraciklinu
µl	Mikroliter
µg	Mikrogram
UPGMA	Metoda neponderirane aritmetične sredine (angl. Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean)
VBNC	Živo, a negojljivo stanje (angl. Viable But Not Culturable)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)
ZZV MB	Zavod za zdravstveno varstvo Maribor

1 UVOD

Kampilobaktri so majhne, običkane Gram-negativne bakterije v obliki zavitih ali spiralnih palčk. Najbolje rastejo pri temperaturi 42°C in v mikraerofilni atmosferi. Take pogoje jim nudi gastrointestinalni trakt živali, ki je njihov naravni prostor. Najpogosteje jih najdemo v črevesju perutnine, nekoliko redkeje tudi v črevesju prašičev, goveda in drobnice.

Bakterije *Campylobacter* predstavljajo vedno večji problem, tako v medicini, kot v živilski industriji. Bolezni, ki jih povzroča ta patogen, so v zadnjih letih precej pogostejše kot bolj poznane salmoneloze. Povzpele so se v sam vrh med okužbami, povezanimi s hrano (EFSA, 2005-2009). Vzrok za to gre večinoma iskati v slabih higieniskih praksih med samo predelavo hrane, kjer prihaja do kontaminacije mesa s črevesno vsebino živali, ki vsebuje kampilobakte. Kontaminirano meso, predvsem piščanče, predstavlja glavni vir sporadičnih okužb, medtem ko redkejše izbruhe povzročata neustrezno obdelana in kontaminirana pitna voda in mleko.

S tradicionalnimi metodami ne moremo razlikovati med sevi različnega izvora, ki povzročajo bolezni pri ljudeh. Včasih je nezanesljiva tudi biokemijska identifikacija vrste (Zorman in Smole Možina, 2002). Zato se veliko dela vлага v raziskovanje genetskih označevalcev, s katerimi bi lahko zanesljivo identificirali bakterijsko vrsto in razlikovali seve znotraj iste vrste in tako sledili izvoru patogenega seva. Na ta način bi lažje ugotovili vir okužbe.

V primeru sporadičnega obolenja je zelo težko ugotoviti vir, s katerim se je bolnik okužil. Analiza ostankov hrane večinoma ni mogoča, ker ti niso več na voljo, zato gre le za sledenje vira okužbe na podlagi anketnega poročanja bolnika.

Okužbe s kampilobaktri večinoma izzvenijo same, brez zdravljenja, ali pa le-to vključuje le blaženje simptomov (predvsem rehidracijo organizma). Do problemov pa lahko pride, ko je potrebno klinično zdravljenje s protimikrobnimi zdravili. Poleg dejstva, da so se kampilobaktri v zadnjem desetletju v številnih razvitih državah povzpeli na sam vrh med povzročitelji bakterijskih gastroenteritisov pri ljudeh, skrb zbuja podatki o njihovi naraščajoči odpornosti proti nekaterim protimikrobnim zdravilom, ki se uporabljajo v humani in veterinarski medicini, pa tudi v priroji živali za hrano ljudi (Aarestrup in Engberg, 2001). Za učinkovito zdravljenje je torej zelo pomembno poznavanje odpornostnega profila bakterij *Campylobacter*.

Z analizo odpornosti bakterij pa lahko posredno ugotavljamo tudi vzroke za visoko odpornost. V primeru kampilobaktrov rezultati kažejo zelo visoko odpornost proti antibiotikom, ki se uporabljajo za preventivo in kurativo v veterini, kar kaže na to, da je vzrok za visoke stopnje odpornosti v prekomerni uporabi določenih antibiotikov v veterini. Ko enkrat poznamo vzroke, se lahko tudi premišljeno lotimo učinkovite odprave problemov.

1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE DIPLOMSKE NALOGE

1.1.1 Cilji diplomske naloge

Zadali smo si naslednje cilje:

- Z metodo PCR identificirati izbrane seve *Campylobacter* spp. (ki so bili izolirani iz mesa, vode, fecesa in kože živali ter humanih kliničnih vzorcev) in preveriti ujemanje rezultatov klasične identifikacije sevov na osnovi hipuratnega testa in analize pomnožkov hipurikaznega in aspartokinaznega gena;
- Preizkusiti nove genetske označevalce za razlikovanje bakterijskih sevov *Campylobacter jejuni* iz posameznih ekoloških niš (meso, voda, živali, ljudje).
- Določiti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) sedmih različnih antibiotikov (gentamicina, streptomicina, ciprofloksacina, tetraciklina, nalidiksinske kisline, eritromicina in kloramfenikola) za izbrane seve *Campylobacter* spp., ki so bili pridobljeni iz različnih virov v letu 2009 in primerjati njihovo odpornost s podatki o odpornosti izolatov iz prejšnjih let;
- Ugotoviti trend pojavnosti odpornih izolatov bakterij *Campylobacter* spp. v drugih evropskih državah in ga primerjati s slovenskimi podatki;

1.1.2 Delovne hipoteze diplomske naloge

Predpostavili smo naslednje delovne hipoteze:

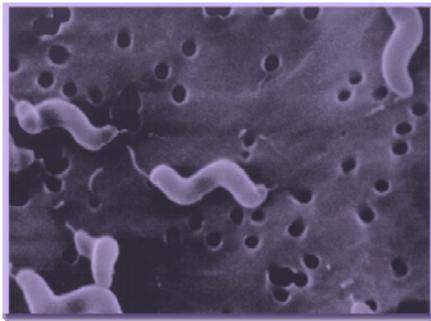
- Klasična identifikacija ni vedno zanesljiva zaradi specifičnosti hipuratnega testa;
- Na podlagi novih genetskih označevalcev bomo lahko razlikovali seve iz različnih virov;
- Odpornost sevov *Campylobacter* proti antibiotikom v skladu z evropskimi trendi tudi v Sloveniji narašča in bo zato pri sevih iz leta 2009 višja kot v prejšnjih letih, še posebej pri vrsti *C. coli*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *Campylobacter*

2.1.1 Splošne značilnosti bakterij rodu *Campylobacter*

Bakterije *Campylobacter* je leta 1886 prvi opazil Escherich, vendar so jih komaj leta 1972 priznali kot pomembne povzročitelje bolezni, povezanih s hrano (Park, 2002). Kampilobaktri so majhne, običkane Gram-negativne bakterije v obliki zavitih ali spiralnih palčk. V dolžino merijo od 0,5 do 8 μm in v širino od 0,2 do 0,5 μm (Horrocks, 2009). Uvrščamo jih v red *Campylobacterales* (skupaj z rodovoma *Helicobacter* in *Wolinella*). V rod *Campylobacter* uvrščamo 18 vrst, med katerimi so najbolj zanimive termotolerantne vrste, ki povzročajo kampilobakterioze pri ljudeh in rastejo med 30 in 64°C. Optimalna temperatura za njihovo rast je 42°C. Od drugih patogenih bakterij, ki povzročajo okužbe s hrano, se razlikujejo predvsem po tem, da za rast potrebujejo mikraerofilno atmosfero z 10% CO₂ in 5% O₂. Rezervoar bakterij *Campylobacter* predstavlja voda in skoraj vse domače in produkcijske živali, še posebej perutnina. Bakterije *Campylobacter* so zoonotske bakterije, saj se prenašajo iz živali na ljudi in povzročajo obolenja s hudo diarejo. Okužbe imajo lahko tudi trajne nevrološke in revmatske posledice (Humphrey in sod., 2007).



Slika 1: Bakterije rodu *Campylobacter* (CDC, 2008)

2.1.2 Fiziologija bakterij *Campylobacter*

Campylobacter se od drugih patogenih bakterij, povezanih z zastrupitvami s hrano, razlikuje v tem, da je zelo občutljiv na zunanje okoljske dejavnike. Zahteva namreč zelo specifične pogoje za rast in je nenavadno občutljiv na okoljski stres. Manjkajo jim mnogi mehanizmi za adaptacijo, ki so pri drugih bakterijskih patogenih povezani z odpornostjo proti stresu (Park, 2002).

Dve izmed najpomembnejših fizioloških lastnosti, ki bakterije *Campylobacter* zelo omejujeta pri razmnoževanju izven živalskega gostitelja, sta rast v mikraerofilni atmosferi in pri temperaturi 42 °C. Zaradi tega so bakterije te vrste nesposobne razmnoževanja na hrani med predelavo ali skladiščenjem (Park, 2002).

Kampilobaktri so na splošno sposobni prenašati stres slabše kot ostali patogeni, povezani s hrano. Občutljivi so na izsuševanje in na suhih površinah slabo preživijo. Zelo občutljivi so tudi na osmotski stres. Pri 2 % koncentraciji natrijevega klorida ne rastejo več, čeprav je to v primerjavi s salmonelami in listerijo, ki rasteta še pri 4,5 – 10 % NaCl, zelo nizka koncentracija. Tako nizka toleranca je najverjetneje posledica odsotnosti osnovnih regulacijskih mehanizmov sinteze in transporta ozmolitov oz. kompatibilnih topljencev (Park, 2002).

Kampilobaktri ne morejo rasti pri vrednosti pH, nižji od 4,9 (Park, 2002). Sposobni so se odzivati na spremembe temperature in prostega kisika, vendar še niso povsem razjasnjeni vplivi teh dejavnikov, ki so pomembni tudi v živilih, na odpornost in preživetje teh patogenih bakterij. Oksidativni stres ima vpliv tudi pri procesu zamrzovanja in taljenja živil. Prav tako imajo mnoga gojišča zmanjšano občutljivost, ker bakterij ne obvarujejo pred kisikovimi radikali, ki nastajajo v aerobnih razmerah gojenja (Humphrey in sod., 2006). Pri obrambi pred oksidativnim stresom igra pomembno vlogo superoksid dismutaza, ki so jo našli tako v *C. jejuni*, kot tudi v *C. coli*. Mutante z okvarjenim encimom slabše preživijo v mleku, na perutninskem mesu in med zamrzovanjem. Ključni regulator oksidativnega stresa je PerR, ki regulira izražanje proteinov AhpC in KatA. Kampilobaktri namreč nimajo klasičnih regulatorjev oksidativnega stresa, kot sta na primer SoxRS in OxyR (Park, 2002).

Sposobni so obvladovati splošni stresni odziv s sistemom SpoT. Tovrsten stres je pomemben tudi za pritrditev, vdor v gostiteljsko celico in znotrajcelično preživetje (Humphrey in sod., 2006).

Bakterije *Campylobacter* nimajo proteinov hladnega stresa kot ostale bakterije, zato ne morejo rasti pri temperaturah, nižjih od 30 °C. Kljub temu, da se pri nizkih temperaturah ne morejo razmnoževati, lahko na določeni hrani preživijo daljša obdobja v velikem številu. Prav tako kažejo pri nizkih temperaturah opazno metabolno aktivnost, vključno z *de novo* sintezo proteinov, kemotakso in aerotakso (Humphrey in sod., 2006).

Campylobacter je občutljiv tudi na visoke temperature. Pri visokotemperaturnem šoku se zaščiti s sintezo proteinov toplotnega stresa, kot so DnaJ, DnaK, Lon proteaza, HrcA, GrpE in HspR. Mutante v genu *dnaJ* so nesposobne rasti pri 46 °C, kar vpliva tudi na sposobnost kolonizacije. Odziv toplotnega stresa pri vrsti *Campylobacter* regulira dvokomponentni sistem RacRS. Ta sistem je odgovoren za različno izražanje proteinov pri 37 °C in 42 °C (Park, 2002). Dokazano je, da bakterije, ki so pred izpostavitvijo visokim temperaturam stradane 5 ur, lažje prenašajo stres toplotnega šoka in preživijo v večjem številu kot bakterije, ki predhodno rastejo pri optimalnih hranilnih pogojih (Klančnik in sod., 2006). Bolje preživijo tudi bakterije, ki so v eksponentni fazici rasti, saj so bolj aktivne in sposobne sinteze zaščitnih dejavnikov (Klančnik in sod., 2008).

Prehod v stacionarno fazo spremi niz sprememb, ki vključujejo povečano odpornost proti toplotnemu, oksidativnemu, osmotskemu in kislinskemu stresu. Povečana odpornost omogoča organizmu, da preživi med procesiranjem in skladiščenjem hrane. Glavni regulator, ki nadzira fiziološke procese v stacionarni fazi, je sigma faktor RpoS in je ključen za preživetje bakterije v stacionarni fazi. Pri vrsti *C. jejuni* so ugotovili odsotnost tega sistema, vendar prevzamejo njegovo vlogo drugi mehanizmi, ki pa še niso podrobno raziskani (Park, 2002).

Kampilobaktrom manjkajo mnogi prilagoditveni odgovori na okoljski stres, med drugim tudi mediatorji splošnega stresa stacionarne faze, RpoS ter SoxRS, ki je vključen v odgovor na

oksidativni stres. Zaradi tovrstnih pomanjkljivosti v svoji fiziologiji si morajo preživetje zagotoviti na drugačen način. To jim uspeva s hitro in dinamično prilagoditvijo na stresne pogoje s prehodom iz spiralne v kokoidno obliko, kar navadno sprembla tudi prehod v živo, a negoljivo stanje (Klančnik in sod., 2006). 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., 2008).

Prehod kampilobaktrov v živo, a negoljivo stanje (Viable but Non-Culturable – VBNC) vzpodbudi izpostavitev oksidativnemu stresu, nizkim temperaturam in stradanje. Navadno ga sprembla tud morfološka spremembra iz spiralne v kokoidno obliko, vendar to ni nujno. *Campylobacter* lahko v stanju VBNC ob zadostni vlagi preživi tudi več kot 130 dni. Prehod v stanje VBNC pomeni relativen upad v gojljivosti, ne pa tudi v živosti celic (Klančnik in sod., 2008).

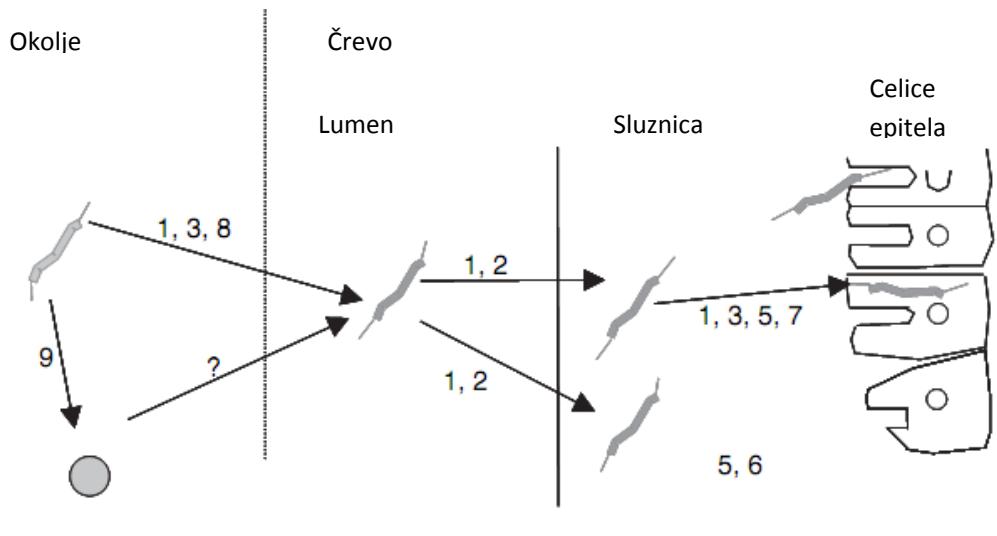
2.1.3 Patogeneza bakterij rodu *Campylobacter* in simptomi obolenja

Campylobacter jejuni in *Campylobacter coli* sta del normalne mikrobiote večine sesalcev in ptic. Čeprav lahko pri mladih mačkah in psih kolonizacija izzove diarejo, je pri živalih na splošno neškodljiva. Nasprotno pa se okužba človeka večinoma konča z boleznijo (Wassenaar, 1999).

Študij patogeneze kampilobaktrov je otežen zaradi pomanjkanja ustreznih živalskih modelov. Večina raziskav zato poteka *in vitro* na celičnih kulturah, ki predstavljajo uporabno alternativo za raziskavo interakcij med *Campylobacter* in gostiteljevim epitelijem, ki se zgodijo med okužbo (Friis, 2004).

Okužba z bakterijami *Campylobacter* se najpogosteje pokaže kot akutni gastroenteritis, ki ga spremljajo vnetje, bolečine v trebušni votlini, vročina, diareja, slabost in redkeje tudi bruhanje. Bolezen je zelo pogosta tudi zaradi nizke infektivne doze, saj za okužbo zadostuje 500 do 800 bakterij. Inkubacijska doba za akutno diarejo je 2 do 5 dni, simptomi pa lahko trajajo vse do 2 tedna (Young in sod., 2007). Opazili so tudi, da posamezni sevi pri različnih ljudeh povzročijo različne simptome (Wassenaar, 1999).

Epidemiološke študije nakazujejo na dve oblici bolezni, ki sta odvisni od socialno-ekonomskega statusa. V razvitem svetu se kampilobakterioza kaže kot krvava diareja in v večini primerov izzveni brez zdravljenja. V deželah v razvoju pa prevladuje v obliki vodene diareje in je pogostejša pri otrocih, ki se na ta način verjetno naravno imunizirajo proti infekcijam s *Campylobacter* v odrasli dobi (Young in sod., 2007).



Slika 2: Vloga virulentnih dejavnikov ob vdoru bakterij *Campylobacter* v celice črevesnega epitelija (Snelling in sod., 2005);

1 – gibljivost, 2 – kemetaksa, 3 – obramba z oksidativnim stresom, 4 – adhezija, 5 – invazija, 6 – produkcija toksinov, 7 – prevzem železa, 8 – odgovor na temperaturni stres, 9 – kokoidno speče stanje, ● - celica *Campylobacter* v kokoidnem spečem stanju, — - viabilna celica *Campylobacter*, ■ - epitelna celica

2.1.4 Incidenca humanih kampilobakterioz

Na območju večine držav Evropske unije, Islandije, Norveške, Švice in Lihtenštajna se izvaja sistem nadzora nad okužbami z bakterijami *Campylobacter* spp. Podatke posameznih držav zbira in objavlja v obliki skupnih in nacionalnih letnih poročil Evropska agencija za varno hrano (EFSA).

Po nekaterih literturnih virih na vsak prijavljen primer kampilobakterioze pride 9 primerov, ki ostanejo neprijavljeni (Humphrey in sod., 2007). Po podatkih ameriške agencije CDC (FoodNet, 2008) je razmerje med registriranim številom kampilobakterioz in dejansko pogostnostjo obolenja med prebivalstvom 1:34. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) pa ocenjuje, da bo vsako leto okuženih približno 1% prebivalstva Zahodne Evrope (Humphrey in sod., 2007).

V letu 2004 so na Evropski agenciji za varno hrano (EFSA) zabeležili 183.961 primerov laboratorijsko potrjenih kampilobakterioz. Splošna incidenca je bila 47,6 na 100.000 prebivalcev, kar je nekoliko več kot pri salmonelozah (42,2). Vse države članice EU, ki izvajajo nadzor nad kampilobakteriozami (vključno z Islandijo in Norveško), razen Španije in Švedske, so v letu 2004 beležile porast primerov kampilobakterioz pri ljudeh za povprečno 32 % v primerjavi z letom 2003. Število je visoko predvsem na račun incidence na Češkem, ki je dosegla 249,6 primerov na 100.000 prebivalcev (EFSA, 2006).

Preglednica 1: Incidenca in prevalenca prijavljenih kampilobakterioz in salmoneloz v Evropi od leta 2004 do 2008 (EFSA, 2006 – 2010a).

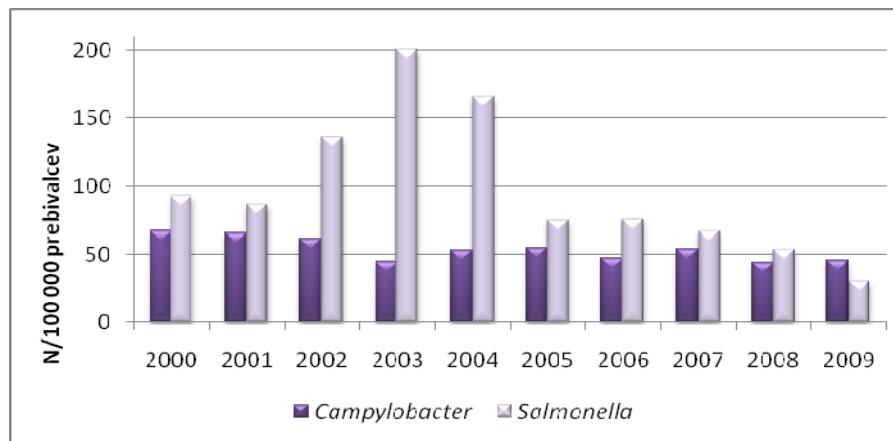
	Kampilobakterioze		Salmoneloze	
	Število primerov	Število primerov/100.000 prebivalcev	Število primerov	Število primerov/100.000 prebivalcev
2004	183961	47,6	163091	42,2
2005	197361	51,6	173879	38,2
2006	175561	46,1	164011	35,8
2007	200507	45,2	155995	31,1
2008	190566	40,7	131468	26,4

V letu 2005 je EFSA potrdila prevalenco 51,6 primerov kampilobakterioz na 100.000 prebivalcev v EU (vključno z Islandijo in Norveško). Skupno število okužb pri ljudeh v EU je doseglo 197.361. V primerjavi z letom 2004 je povprečna incidenca narastla za 7,8 %, medtem ko so v Avstriji, Danski, Franciji, Litvi in Španiji zaznali padec okužb s kampilobaktri v primerjavi z letom 2004 (EFSA, 2007a).

V letu 2006 je incidenca kampilobakterioz padla na 46,1 primerov na 100.000 prebivalcev, skupaj je bilo zabeleženih 175.561 primerov. Padec obolenj so zabeležili na Švedskem, porast pa na Irskem in na Slovaškem (EFSA, 2007b).

Število primerov je v leto 2007 narastlo v primerjavi z letom poprej za skoraj 25.000 primerov in sicer na 200.507. Ne glede na to pa je povprečna incidenca kampilobakterioz v Evropi nekoliko padla in se ustavila pri 45,2 na 100.000 prebivalcev. Razlog za to je najverjetneje vstop dveh velikih članic v EU v letu 2007 in ponovno poročanje Italije po dolgem času. Vse članice EU, razen Estonije, Madžarske, Litve, Nizozemske in Španije so v letu 2007 potrdile porast kampilobakterioz (EFSA, 2009).

V zadnjih petih letih je *Campylobacter* spp. postal glavni bakterijski povzročitelj gastrointestinalnih okužb v večini držav Evropske unije in ZDA. Podobni trend so prvič opazili v letu 2009 tudi v Sloveniji. *Campylobacter* je tako v prevalenci v zadnjih letih prekosil salmonelo (EFSA, 2009; IVZ, 2010; CDC, 2010).



Slika 3: Prevalenca kampilobakterioz in salmoneloz v Sloveniji od leta 2000 do 2009 (IVZ, 2001 – 2010)

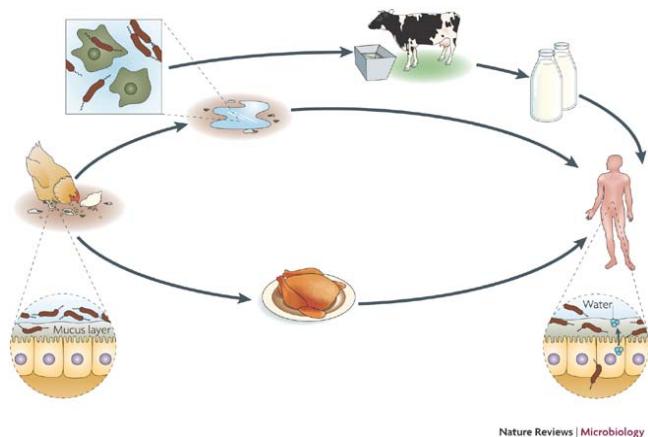
2.1.5 Epidemiologija

Kampilobakterioza ima značilnosti sezonskega obolenja, saj se največ primerov obolenj pojavi v poletnih mesecih, na severni polobli predvsem junija in julija (Humphrey in sod., 2007).

Do velikih izbruhov okužb s *Campylobacter* spp. prihaja zelo redko. Glavna vira izbruhov sta surovo mleko in neklorirana površinska voda. Večina primerov kampilobakterioz je sporadičnih ali v obliki majhnih izbruhov znotraj družin. V tovrstnih primerih je redkokdaj mikrobiološko identificiran vir okužbe, ker je težko najti mikrobiološki dokaz s kultivacijo enakega tipa kampilobaktra iz sumljivega vira, kot iz pacienta. Večinoma se namreč obrok, ki je vir okužbe zaužije v celoti in ostankov, ki bi služili kot material za analizo, ni na razpolago (Nachamkin in Blaser, 2000).

Največjo nevarnost za sporadične okužbe z bakterijami *Campylobacter* spp. predstavlja perutninsko meso, saj je velik delež svežega in zamrznjenega mesa okuženega. Stopnja kontaminacije je glede na literaturne vire različna in sega od $\log_{10} 2$ do $\log_{10} 5$ CFU na piščančji trup (Nachamkin in Blaser, 2000) pa do $\log_{10} 3$ CFU/g (Bardoň in sod., 2011), kar lahko poleg nizke infekcijske doze predstavlja veliko nevarnost za potrošnike. Dokaz za to lahko najdemo v primeru t.i. dioksinske krize Belgiji, kjer so leta 1999 v maju in juniju zaradi vsebnosti dioksina iz prodaje umaknili perutnino in mleko. V tem času pa se je pojavnost humanih kampilobakterioz zmanjšala kar za 40 % (Humphrey in sod., 2007, Bardoň in sod., 2011).

Termofilni *Campylobacter* spp. so široko razširjeni v naravi. Njihov osnovni rezervoar predstavljajo prebavila divjih in domačih ptic in sesalcev. Glavni vir okužbe poleg perutnine (Corry in Atabay, 2001) predstavljajo tudi druge vrste mesa, surovo mleko, ptičje mleko, ustekleničena mineralna voda, solata, sadje, uživanje neobdelane vode iz narave, stik z domačimi živalmi in kanalizacijo ter bolezenska stanja, kot so na primer diabetes ali zmanjšana želodčna kislina zaradi uživanja inhibitorjev protonskih črpalk (Frost in sod., 2001; Friedman in sod., 2004; Humphrey in sod., 2007).



Slika 4: Vir infekcij z bakterijami *Campylobacter* spp. (Young in sod., 2007)

2.1.6 Preprečevanje prenosa bolezni

Kampilobakterioza je bolezen, ki se prenaša iz živali preko hrane na ljudi. Zaradi tega je pri preprečevanju širjenja bolezni pomembno iskati rešitve že pri samem izvoru bakterije, to je v okolju proizvodnih živali. Pri živalih, ki so gojene v hlevih, je lažje nadzorovati okužbo živali z dezinfekcijo prostora, razkužilom na vhodu in higieno delavcev, medtem ko okužbe pri zunanjih živalih ne moremo preprečiti. V primeru zunanje reje je potrebno toliko več pozornosti nameniti preprečevanju okužbe mesa in mleka kasneje v prehranski verigi. To večinoma vključuje izboljšanje higiene pri molži krav in klanju živali ter pravilni pasterizaciji mleka. Z ustrezno higieno med klanjem se lahko izognemo navzkrižni kontaminaciji mesa s črevesno vsebinou živali. Pomembno je tudi zagotoviti čim manj stresne pogoje med transportom živali, saj se v okolišinah, povezanih s stresom gostiteljske živali, povečajo ravni kampilobaktrov (Humphrey in sod., 2007).

Analize v Evropski uniji so pokazale zelo močno povezavo med okužbo jate piščancev s *Campylobacter* in kontaminacijo trupov teh piščancev. Verjetnost, da bodo trupi piščancev okuženi s kampilobaktri, je okrog 30-krat večja pri okuženih jatah, kot pri neokuženih. Prav tako je stopnja kontaminacije piščančijih trupov iz koloniziranih jat praviloma veliko večja od kontaminacije trupov iz nekoloniziranih jat. Te ugotovitve kažejo kako pomembna je kolonizacija piščančijih jat z bakterijo, ne le za prevalenco okužbe mesa, ampak tudi za stopnjo okužbe. Okuženi trupi pa lahko izvirajo tudi iz nekoloniziranih jat, kar nakazuje možnost navzkrižne kontaminacije v klavnicih (EFSA, 2010c).

Tveganje za okužbo piščančijih trupov narašča tudi s starostjo piščancev, pripravljenih za zakol. Prav tako je možnost za okužbo večja, če so so piščanci procesirani proti koncu dneva in v določenih mesecih v letu. Največja možnost za okužbo je med julijem in septembrom. Analize so pokazale, da tudi čas med vzorčenjem trupov in testiranjem vzorcev vpliva na povečano tveganje za detekcijo kampilobaktrov (EFSA, 2010c).

Na farmah lahko zmanjšajo možnost za okužbo s tem, da gojijo samo eno vrsto živali, za napajanje uporabljajo neoporečno vodo in ne dovolijo stika jate z ostalimi domačimi živalmi ali pticami. Pomembna je tudi temeljita dezinfekcija rejnega prostora pred začetkom gojenja nove jate. Ker so kampilobaktri v primerjavi s salmonelami relativno občutljivi na čistilna sredstva in razkužila, zadostuje čiščenje, ki je predpisano za odstranitev salmonel (Humphrey in sod., 2007).

Dejavni, za katere je bilo ugotovljeno, da nimajo bistvenega vpliva na stopnjo kontaminacije trupov s *Campylobacter*, so tip produkcijske jate, zmanjševanje števila živali v jatah, kapaciteta klavnice, vrsta hlajenja trupov in prisotnost kontaminacije s salmonelo (EFSA, 2010c).

Horizontalni prenosti kampilobaktra med jatami se lahko kontrolirajo s prehranskimi dodatki v obliki koktejlov s kompetitivno nepatogeno črevesno floro, vendar v praksi ta pristop do zdaj ni pokazal želenih rezultatov. Ena izmed rešitev je tudi razvoj učinkovitega cepiva proti kampilobakteriozi za živali. Kot najbolj učinkovita metoda se je izkazala terapija z bakteriofagi, vendar uporaba bakteriofagov, podobno kot uporaba antibiotikov, lahko vodi v razvoj odpornih sevov, ki nato predstavljajo še večji problem (Humphrey in sod., 2007).

Eden od načinov zniževanja števila bakterij na mesu je tudi daljše hlajenje mesa in s tem tudi sušenje, ki je neugodno za preživetje kampilobaktrov. Ugotovljeno je namreč bilo, da svinjsko

in goveje meso, ki se dlje časa sušita v hladilnici, vsebujeta nižje število bakterij, kot piščanče meso, ki gre takoj v prodajo (Humphrey in sod., 2007).

Ker kampilobaktri predstavljajo nevarnost že pri nizkem številu, mora biti njihova prisotnost v hrani pred zaužitjem preprečena. Zaradi tega inhibicija rasti ne pride v poštev kot metoda nadzora. V primerjavi z ostalimi patogeni so kampilobaktri relativno občutljivi na temperaturne procese, zastavljene v okviru sistema HACCP, zato bi ti lahko delovali kot kontrola. Ker v Evropski uniji nikakor ni zaželjeno obdelovanje mesa s kemičnimi sredstvi (čeprav je že nekaj let dovoljeno), ostane edina možnost topotna obdelava in ponekod, kjer je tovrstno obdelovanje zakonsko dovoljeno, visokoenergijsko elektromagnetno obsevanje (Humphrey in sod., 2007).

Pri preprečevanju okužb s kampilobaktri je pomembna dobra kmetijska praksa in dobra higienska praksa skozi ves postopek predelave živila. To vključuje uporabo neoporečne vode za zalivanje, napajanje živali, čiščenje in podobno. Neupoštevanje teh načel je namreč povzročilo večino izbruhov, ki smo jih zabeležili v zadnjih dveh desetletjih (Humphrey in sod., 2007).

Svetovna zdravstvena organizacija za zdravje (WHO) je začrtala pet ključnih smernic za varnejšo hrano:

- ohranjaj čistočo,
- ločuj surovo in kuhano hrano,
- temeljito prekuhaj,
- hrani hrano na varnih temperaturah,
- uporabljam varno vodo in surove sestavine.

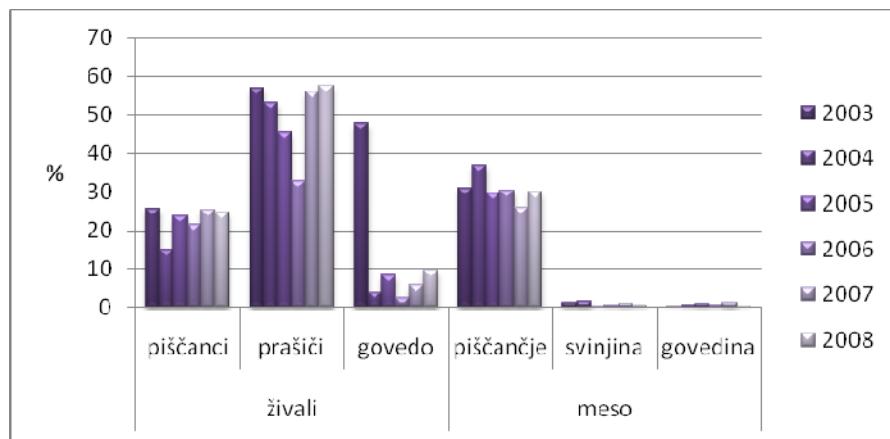
Zgoraj naštete smernice se navezujejo tudi na bakterije *Campylobacter* in surovo hrano, kot je na primer perutniško meso, ki je lahko vir okužbe. Navzkrižna kontaminacija se je namreč izkazala za pomemben vzrok 30 % izbruhov kampilobakterioze. Pomembno je ločevanje hrane, ki predstavlja nevarnost in jo bomo termično obdelali od hrane, ki jo bomo zaužili surovo. Paziti moramo tudi na higieno pripomočkov, s katerimi obdelujemo potencialno okuženo hrano. Le tako se lahko izognemo navzkrižni kontaminaciji, na primer solate s piščanjim mesom. *Campylobacter* lahko prezivi na delovnih površinah tudi po 24 urah od priprave surovega piščanca, zato je po pripravi obroka potrebno temeljito čiščenje delovnih površin in kuhinjskih pripomočkov (Humphrey in sod., 2007).

Campylobacter je slabo odporen proti visokim temperaturam, zato pasterizacija in kuhanje zagotovita varnost hrane za uporabnika (Humphrey in sod., 2007).

Bolniki s kampilobakteriozo ne smejo delati na delovnih mestih, povezanih s hrano, dokler niso 48 ur brez simptomov bolezni. Po izteku tega obdobja ni nobenih razlogov, ki bi jim preprečevali vrnitev na delovno mesto. Na ta način se prepreči širjenje okužbe z bolnika na hrano v proizvodnji (Humphrey in sod., 2007).

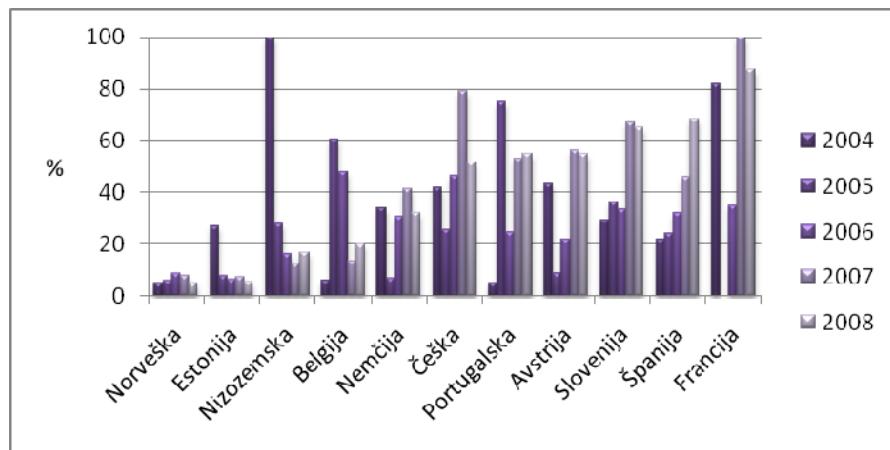
2.1.7 Prevalenca mesa v prometu, kontaminiranega z bakterijami *Campylobacter*

Izmed prehranskih izdelkov ima surovo meso, predvsem perutninsko, najvišjo stopnjo kontaminacije z bakterijami *Campylobacter*. Po podatkih iz poročila EFSA za leto 2007 je bilo v evropskih državah v letu 2007 povprečno kontaminiranih 26 % analiziranih vzorcev piščančjega mesa, medtem ko je delež v nekaterih državah dosegel celo 86,5 %. V vzorcih ostalih vrst mesa je bil *Campylobacter* zaznan redkeje, v svinjskem in govejem mesu v od 0,9 do 1,2 % testiranih vzorcev. Po drugi strani pa zasledimo visoko prevalenco okužb z bakterijami *Campylobacter* pri prašičih na farmah (Slika 5). To je najverjetneje povezano z razlikami v klavni praksi, saj se meso manjših živali lažje in pogosteje kontaminira med klanjem. Morda pa k velikim razlikam med okuženostjo klavnih živali in prevalenco bakterij na mesu v prometu prispevajo še drugi, trenutno nepojasnjeni dejavniki (Smole Možina in sod., 2011).



Slika 5: Prevalenca z bakterijami *Campylobacter* kontaminiranih analiziranih vzorcev mesa in živali (EFSA, 2006 – 2010a; Smole Možina in sod., 2011)

Predvsem problematične so južne evropske države, kjer je že zaradi klimatskih pogojev nadzor nad širjenjem okužbe otežen. Najboljše rezultate v preprečevanju okužb živali dosegajo v skandinavskih državah. Pri preprečevanju navzkrižne kontaminacije mesa s črevesno vsebino živali je potrebno vložiti veliko truda v zagotavljanje optimalnih higieniskih razmer v klavnicih, kjer najpogosteje pride do kontaminacije mesa (EFSA, 2009).



Slika 6: Prevalenca kontaminacije mesa z bakterijami *Campylobacter* med leti 2004 in 2008 (EFSA, 2006 – 2010a)

Slovenija glede na delež z bakterijami *Campylobacter* kontaminiranega mesa v prometu po podatkih EFSA-e sodi v vrh evropskih držav. Glede na podatke EFSA-e iz let 2004-2007 prevalenca narašča ali ostaja na enakem nivoju kot leta poprej.

2.1.8 Odpornost bakterij rodu *Campylobacter* proti antibiotikom

Odpornost patogenih bakterij *Campylobacter* proti antibiotikom v zadnjem desetletju stalno narašča. Na ta trend vpliva tako uporaba antibiotikov v veterini kot v medicini. Infekcije s *Campylobacter* so navadno samoomejujoče in v nekaj dneh izzvenijo brez uporabe antibiotikov. Pri otrocih, ostarelih in posameznikih z oslabljenim imunskim sistemom pride pogosto do zapletov in v teh primerih je potrebno zdravljenje. Za klinično terapijo kampilobakterioze se najpogosteje uporablja makrolidni antibiotik eritromicin. Zaradi širokega spektra delovanja na enterične patogene, se pogosto uporablajo tudi fluorokinolonski antibiotiki, kot je na primer ciprofloksacin. V primerih sistemске okužbe se uporablja tetraciklini in gentamicin (Luangtongkum in sod, 2009).

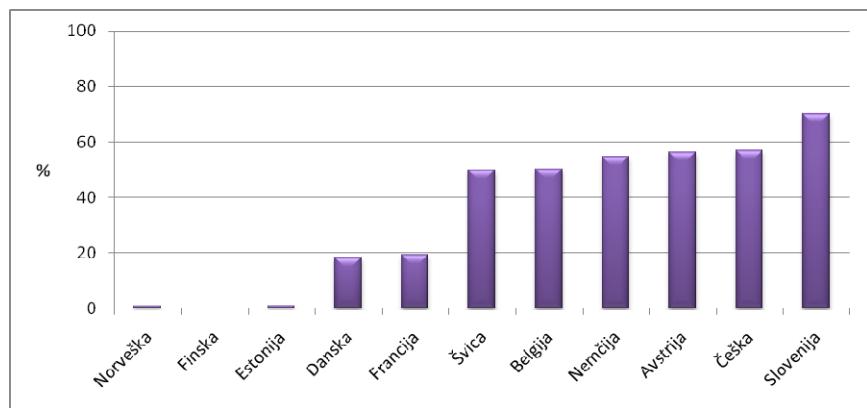
2.1.8.1 Splošni trendi odpornosti bakterij *Campylobacter*

Zaradi široke razširjenosti uporabe antibiotikov se odpornost kampilobaktrov proti tem substancam pojavlja vse pogosteje, kar predstavlja skrb za zdravje ljudi. Razvoj in prenos odpornosti pri kampilobaktri je zapleten proces, ker so to zoonozni organizmi, ki so lahko izpostavljeni uporabi antibiotikov tako v prieji živali, kot v humani medicini (Luangtongkum in sod, 2009).

2.1.8.2 Prevalenca odpornosti bakterij *Campylobacter* proti antibiotikom

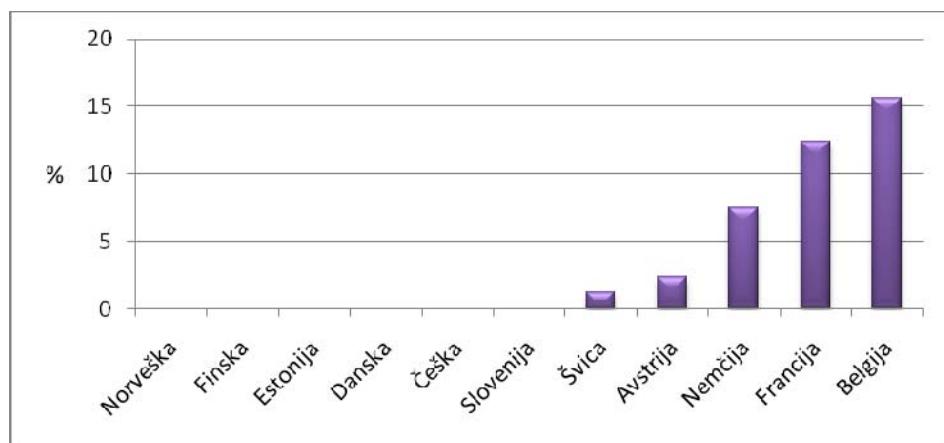
Iz mnogih držav po svetu poročajo o hitrem porastu deleža proti antibiotikom odpornih sevov *Campylobacter*. Pred letom 1992 so v Kanadi in ZDA redko opazili seve *Campylobacter*, odporne proti fluorokinolonom (predvsem ciprofloksacinu), glede na najnovejša poročila pa število tovrstnih humanih sevov močno narastlo in predstavlja tudi do 47 % vseh izoliranih sevov. Tudi v evropskih državah je 17-99 % izolatov iz živali in ljudi odpornih proti

fluorokinolonom. Podoben trend naraščanja odpornosti proti omenjenemu antibiotiku opažajo tudi v Afriki in Aziji, medtem ko je v Avstraliji in Novi Zelandiji delež odpornih sevov znatno nižji (Luangtongkum in sod, 2009).



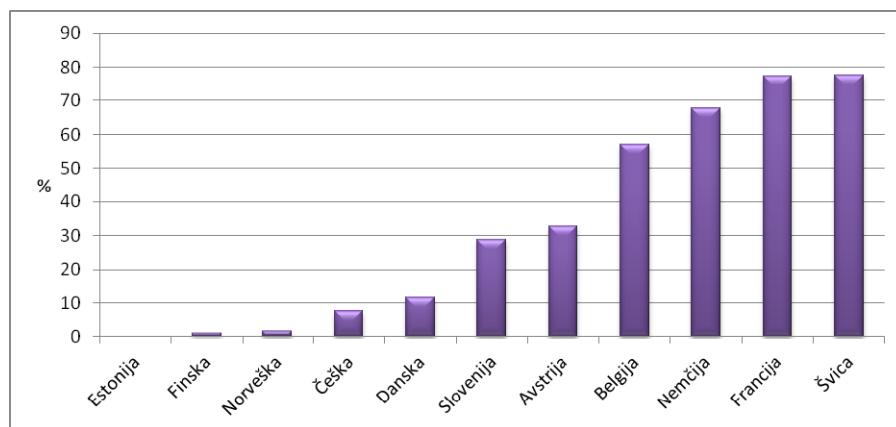
Slika 7: Odstotek izolatov *Campylobacter* spp. iz perutnine v letu 2008, odpornih proti ciprofloksacinu (EFSA, 2010e)

V nekaterih državah opažajo tudi povečano odpornost proti makrolidom. Na splošno je stopnja odpornosti proti eritromicinu v Kanadi in ZDA nizka; odpornih je do 10 % sevov. Prav tako je stopnja odpornosti nizka in stabilna v evropskih državah. Opažajo pa, da so sevi *Campylobacter coli* bolj odporni od sevov *Campylobacter jejuni*. Zaskrbljujoče je, da je v Severni Ameriki odpornih kar 40 % *Campylobacter coli*, izoliranih iz puranov in prašičev, v Evropi pa od 15 % do kar 80 % sevov *E. coli*, izoliranih iz piščancev in prašičev. Podobni trendi so opaženi tudi na ostalih kontinentih (Luangtongkum in sod, 2009).



Slika 8: Odstotek *Campylobacter* spp. iz perutnine v letu 2008, odpornih proti eritromicinu (EFSA, 2010e)

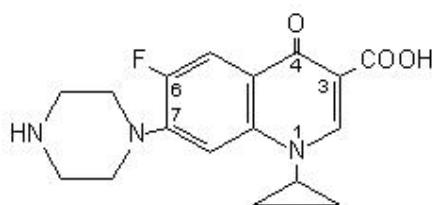
V evropskih državah je opazna velika razlika v pojavnosti odpornosti med severnimi in južnimi državami. Na Norveškem in Švedskem lahko najdemo najnižje stopnje okuženosti mesa s *Campylobacter*, sevi, ki jih izolirajo, pa so skoraj vsi občutljivi proti antibiotikom. Na drugi strani lahko v južnih državah, kot so Španija, Italija, pa tudi srednjeevropskih državah, kot sta Avstrija in tudi Slovenija, opazimo popolno nasprotje – visoko prevalenco kontaminacije mesa in visoke stopnje odpornosti proti antibiotikom (EFSA, 2009).



Slika 9: Odstotek *Campylobacter* spp. iz perutnine v letu 2008, odpornih proti tetraciklinu (EFSA, 2010e)

2.1.8.3 Mehanizmi odpornosti

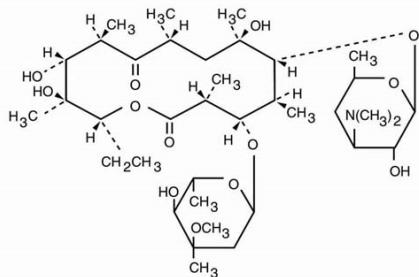
Pri kampilobaktri je odpornost proti fluorokinolonom večinoma povzročena s točkovnimi mutacijami v regiji, ki določa odpornost proti kinolonom (quinolone resistance-determining region – QRDR). Ta regija se nahaja v zaporedju DNA, ki kodira DNA girazo A. Pri gram negativnih bakterijah so v odpornost proti fluorokinolonom vpleteni tudi geni, ki kodirajo topoizomerazo IV (*parC/parE*), vendar *Campylobacter* teh genov nima. Vse znane determinante za odpornost proti fluorokinolonom so pri bakterijah *Campylobacter* kodirane na kromosomu. Najpogosteje opažena mutacija pri izolatih *Campylobacter*, odpornih proti fluorokinolonom, je spremembra C2567T v genu *gyrA*. Ta spremembra vodi do substitucije T86I v girazi in povzroči visoko odpornost proti fluorokinolonom. Poleg mutacije v genu *gyrA* k odpornosti znatno prispeva tudi aktivnost izlivne črpalke CmeABC. Črpalka namreč aktivno iznaša antibiotik iz celice in deluje sinergistično z mutacijami v *gyrA* (Luangtongkum in sod., 2009). Pred kratkim so ugotovili, da ima tudi gen *cmeG* velik vpliv pri pojavu odpornosti. Z mutacijo le-tega so dosegli ne le zmanjšano bakterijsko rast, ampak tudi zmanjšano odpornost kampilobaktrov proti ciprofloksacinu, gentamicinu, tetraciklinu, rifampicinu, etidijevemu bromidu, žolčni kislini in vodikovemu peroksidu (Jeon in sod., 2011).



Slika 10: Strukturna formula ciprofloksacina (fluorokinolon) (FDA, 2009)

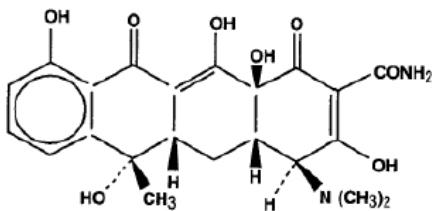
Odpornost kampilobaktrov proti makrolidom je večinoma povezana s tarčno modifikacijo in aktivnim izlivom. Do modifikacije ribosomske tarče lahko pride z encimsko posredovanjo metilacijo ali točkovno mutacijo v 23S rRNA in/ali proteinih L4 in L22. Odpornost, posredovana z metilacijo rRNA, je bila do zdaj opažena le pri vrsti *Campylobacter rectus*, medtem ko so točkovne mutacije v 23S rRNA priznane kot najpogostejši mehanizem makrolidnih rezistenc pri *Campylobacter jejuni* in *C. coli* (Kurinčič in sod., 2007). Do teh točkovnih mutacij pride na mestu 2074 in 2075 v 23S rRNA. K povisani odpornosti proti

makrolidom lahko pripomorejo tudi izlivne črpalki CmeABC. Pri sevih s srednjo ali nizko odpornostjo lahko inaktivacija izlivnih črpalk povrne popolno občutljivost sevov. Tudi pri zelo odpornih sevih inaktivacija črpalk močno zniža odpornost. Aktiven izliv in točkovne mutacije pa pri bakterijah *Campylobacter* ne povzročijo le odpornosti proti makrolidom (eritromicinu, klaritromicinu, azitromicinu in tilozinu), temveč tudi proti ketolidom (Luangtongkum in sod., 2009).



Slika 11: Strukturna formula eritromicina (makrolid) (FDA, 2006)

Odpornost proti tetraciklinom je pri bakterijah *Campylobacter* posredovana s *tet(O)*, ki je zelo razširjen med izolati iz živali. *Tet(O)* kodira ribosomski zaščitni protein in je edini tet gen, ki so ga našli v kampilobaktri. Ta protein prepozna vezavno mesto A na ribosому in se z njim veže na tak način, da pride do konformacijske spremembe ribosoma, kar povzroči sprostitev vezane molekule tetraciklina. Konformacijska sprememba se ohrani dlje časa in omogoči nemoteno elongacijo. Glede na drugačno vsebnost baznih parov GC v genu *tet(O)* domnevajo, da ga je vrsta *Campylobacter* pridobila s horizontalnim genskim prenosom od vrste *Streptomyces*, *Streptococcus* ali *Enterococcus* spp. Pri večini sevov *Campylobacter* je zapis *tet(O)* na plazmidu, vendar imajo nekateri sevi kopijo zapisa tudi na kromosomu. Tudi odpornost proti tetraciklinom je povezana z izlivnimi črpalkami CmeABC (Luangtongkum in sod., 2009).



Slika 12: Strukturna formula tetraciklina (FDA, 2010)

V primerjavi s fluorokinoloni, makrolidi in tetraciklini je odpornost kampilobaktrov proti ostalim antibiotikom deležna manj pozornosti. Odpornost proti aminoglikozidom je vzrok proteinske modifikacije, večinoma povzročene z encimi 3'-aminoglikozid fosfotransferazami, 6-aminoglikozid adeniltransferazami in 3',9-aminoglikozid adeniltransferazami. β -laktamski antibiotiki imajo večinoma omejeno učinkovitost na kampilobakte, odpornost proti β -laktamskim antibiotikom pa je večinoma posredovana preko β -laktamaz in intrinzične odpornosti. *Campylobacter* poseduje intrinzično odpornost proti mnogim antibiotikom, vključno z bacitracinom, novobiocinom, rifampinom, streptograminom B, trimetoprimom in vankomicinom. Mehanizmi intrinzične odpornosti še niso popolnoma pojasnjeni, vendar

najverjetneje vključujejo nizko prepustnost membrane in aktiven izliv s pomočjo nespecifičnih izlivnih transporterjev (Luangtongkum in sod., 2009).

2.1.8.4 Prenos determinant za odpornost proti antibiotikom

Poleg mehanizmov, ki temeljijo na mutacijah, lahko bakterije *Campylobacter* pridobijo genske zapise za odpornost proti protimikrobnim zdravilom tudi s horizontalnim genskim prenosom. Horizontalni prenos DNK med sevi *Campylobacter* je bil dokazan tako v bakterijskih kulturah, kot tudi v piščančjem črevesju. Pri bakterijah je horizontalni genski prenos posredovan z naravno transformacijo, konjugacijo in transdukcijo. Izmed teh sta za gensko manipulacijo kampilobaktrov najpogosteje uporabljeni transformacija in konjugacija. Konjugacija ima pomembno vlogo pri prenosu plazmidnih zapisov za odpornost, kot je na primer *tet(O)*. Naravna transformacija pa je glavni mehanizem za prenos kromosomskih zapisov za odpornost proti fluorokinolonom in makrolidom (Luangtongkum in sod., 2009).

2.1.9 Metode identifikacije bakterij rodu *Campylobacter*

Obstajajo biokemijske, imunološke in molekularne metode za detekcijo in identifikacijo bakterij *Campylobacter*. Od teh se danes večinoma še vedno uporablja biokemijska metoda po ISO standardu 10272. Klasična identifikacija *Campylobacter* do vrste temelji na hipuratnem testu, ki dokazuje prisotnost encima hipurikaze pri vrsti *C. jejuni*, vendar je test nezanesljiv zaradi težavnega odčitavanja rezulatov (Suzuki in Yamamoto, 2008). Poleg tega pa obstajajo tudi neznačilni sevi, ki so lahko vzrok napačne identifikacije. Pogosti so tudi na piščančjem mesu (Zorman in Smole Možina, 2002).

Za predobogatitev se najpogosteje uporablja Boltonov ali Prestonov bujon, kot izolacijski medij pa agar CCDA (charcoal cefaperazone deoxycholate agar), agar Karmali, agar Abeyta-Hunt (-Bark) ali agar Preston (Suzuki in Yamamoto, 2008).

Za detekcijo in razlikovanje med vrstama *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* iz perutninskih vzorcev se lahko uporablja tudi metoda PCR-ELISA. Deluje na principu oligonukleotidne sonde, specifične za medgenski vmesnik med 16S in 23S ribosomske RNK. Če je metoda kombinirana s predbogativijo kulture, lahko z njo zaznamo prisotnost kampilobaktrov in identificiramo *C. coli* in *C. jejuni* v vzorcih perutninskega mesa (Humphrey in sod., 2007).

Vedno pogosteje se za identifikacijo kampilobaktrov uporabljajo metode detekcije, ki temeljijo na zaznavanju specifične DNK. Njihove prednosti so boljša občutljivost, natančnost in točnost ter hitrost, vendar je z njimi nemogoče določiti samo žive bakterije, ker metode zaznajo DNK tako živih kot mrtvih bakterij (Humphrey in sod., 2007).

Med uveljavljenimi metodami za identifikacijo vrst *Campylobacter jejuni* in *C. coli* je dvokratna reakcija PCR. Temelji na zaznavanju gena *hipO*, specifičnega za vrsto *C. jejuni* in gena *aspA*, specifičnega za vrsto *C. coli*. V vsako reakcijo dodamo po 4 začetne oligonukleotide - JE1 in JE2, ki sta specifična za gen *hipO*, in COL1 in COL2, ki sta specifična za gen *aspA*. Po reakciji pomnožke PCR nanesemo na agarozni gel in izpeljemo gelsko elektroforezo. Gel po končani elektroforezi pobarvamo z raztopino etidijevega

bromida, ki interkalira med bazne pare verige DNK in fluorescira pod svetlobo UV spektra. Iz gela glede na označevalce 100-baznih parov določimo velikost pomnožka v posamezni reakciji. Pomnožek gen *hipO* je velik 735 baznih parov, pomnožek gena *aspA* pa 500 bp in zaradi manjše velikosti potuje dlje po gelu. Metoda identifikacije z dvokratno reakcijo PCR se je izkazala za zanesljivejšo od klasične identifikacije (Zorman in Smole Možina, 2002; Kos in sod., 2006).

2.1.10 Genotipizacija bakterij *Campylobacter jejuni*

S tradicionalnimi metodami tipizacije, kot so serotipizacija ali tipizacija s fagi, ne moremo razlikovati sevov iz različnih virov, ki povzročajo bolezen pri ljudeh. Na poti k dosegu tega cilja se je metoda filogenetskega modeliranja z genotipizacijo v povezavi z bayezijanskimi algoritmi izkazala kot uspenejša. Olivia L. Champion se je s skupino svojih sodelavcev (2005) lotila primerjave celotnega genoma *Campylobacter jejuni*, pri čemer so za kontrolo uporabili sekveniran sev *C. jejuni* NCTC11168, prvotno izoliran iz fecesa britanskega pacienta z gastroenteritisom. Primerjave so se lotili s tehnologijo mikročipov v povezavi z matematično analizo. Na ta način so bile določene filogenetske povezave in z robustno, a hkrati občutljivo metodo tudi genetske povezave med bakterijskimi populacijami.

V oblikovanje mikročipov je bilo vključenih 1654 sekveniranih genov tipskega seva *C. jejuni* NCTC11168. Po označevanju in hibridizaciji je bila izvedena filogenomska primerjava in identifikacija genov, ki napovedujejo izvor sevov. Rezultati so pokazali jasno razdelitev analiziranih sevov v dve skupini glede na njihov živi ali neživi izvor. Identificirana je bila tudi skupina šestih genov (*cj1321* do *cj1216*) znotraj lokusa za O-glikozilacijo flagelina, ki se je izkazal kot najpomembnejši indikator skupine sevov živega izvora, kar so potrdili z validacijo s PCR. Z uporabo BLAST-a je bila predvidena funkcija genov *cj1321* do *cj1216*. Ugotovljeno je bilo, da je *cj1321* podoben acetil transferazi mnogih bakterijskih vrst, da sta *cj1322* in *cj1323* podobna hidroksiacetil dehidrogenazi, da bi *cj1324* glede na visoko podobnost WbpG lahko bil protein, vključen v biosintezo LPS, da je *cj1325* podoben *cj1330*, ki je vključen v sintezo pseudaminske kisline, medtem ko *cj1326* nima nobene očitne podobnosti s katerim izmed znanih proteinov. Ti geni naj bi nosili zapis za specifično obliko flagelina, ki jo najdemo samo v sevih živega izvora, saj naj bi jim to omogočalo lažje preživetje v prebavilih in izboljšano pritrjevanje na gostiteljske celice (Champion in sod., 2005).

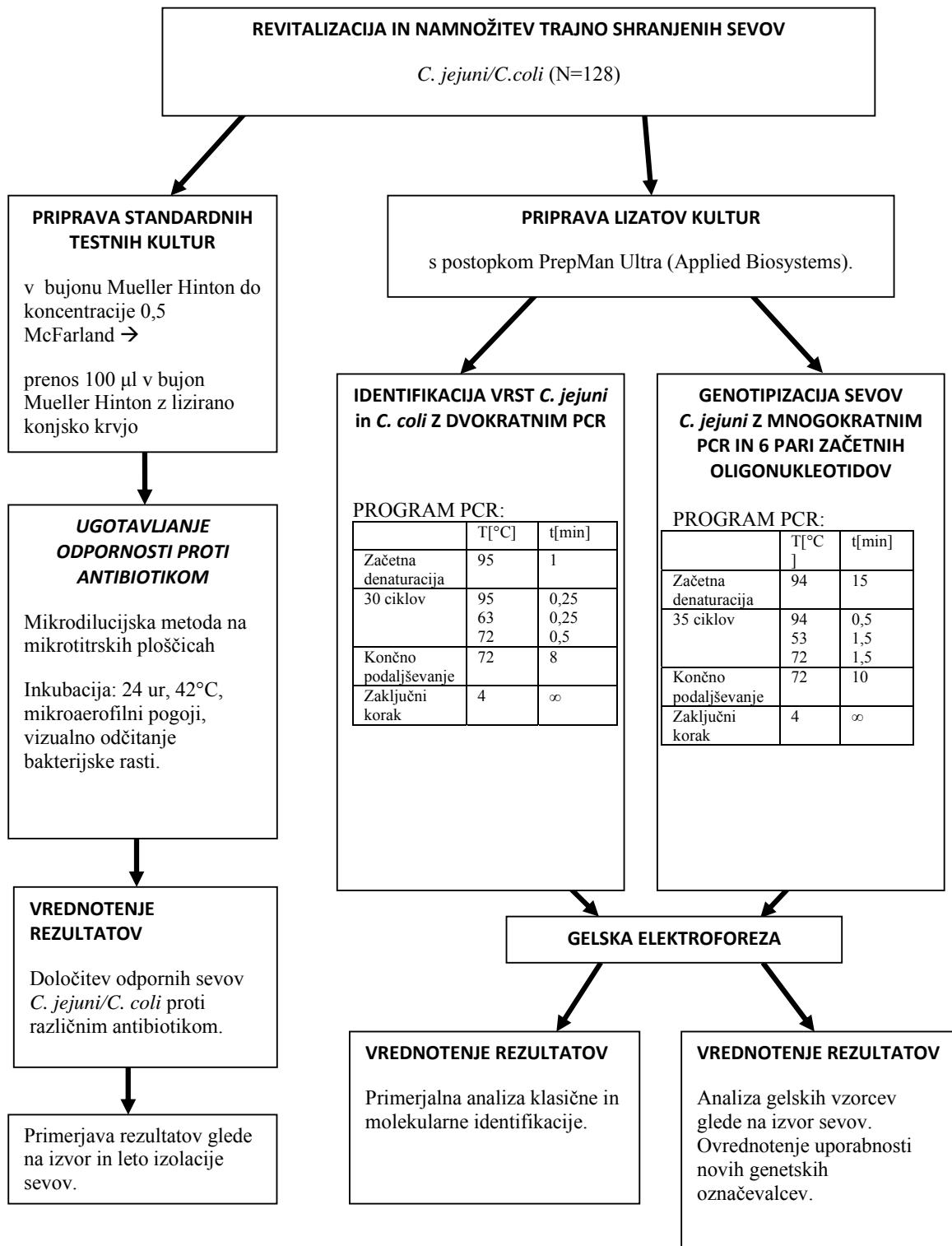
V skupino sevov živega izvora se je uvrstilo 88,6 % izolatov iz živih rezervoarjev, v skupino neživega izvora pa izolati, ki so bili večinoma iz vode. V skupino z živim izvorom se je uvrstilo 55,9 % vseh izolatov in 44,3 % kliničnih izolatov, medtem, ko se je v skupino z neživim izvorom uvrstil manjši delež vseh izolatov (44,1 %), ampak večji delež kliničnih izolatov (55,7 %). Podatki nakazujejo na to, da je večji delež bolnikov okuženih s sevi iz neživih virov (Champion in sod., 2005).

V naknadni neodvisni raziskavi, izvedeni leta 2007, Kärenlampi in njegovi sodelavci niso mogli potrditi ugotovitev Championove in sodelavcev iz leta 2005. V raziskavi, kjer so validirali genetske označevalce in molekularne metode tipizacije za določitev vira okužb s *C. jejuni* in *C. coli*, so namreč ugotovili, da prisotnost skupine genov *cj1321* do *cj1216*, ni v povezavi z živim izvorom analiziranih sevov. Pri tem dopuščajo možnost, da je to posledica razlik med populacijami *C. jejuni* živega izvora iz različnih geografskih območij – v tem primeru med Finsko in Veliko Britanijo (Kärenlampi in sod., 2007).

V diplomski nalogi smo na podoben način, kot je opisano v omenjenih dveh raziskavah preizkušali nove genetske označevalce za določitev izvora sevov *C. jejuni*, ki so bili razviti v okviru angleške partnerske skupine trenutno potekajočega evropskega projekta Biotracer, v katerem sodeluje raziskovalna skupina za živilsko mikrobiologijo Biotehniške fakultete.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SHEMATSKI PRIKAZ OPRAVLJENEGA DELA



Slika 13: Shema poskusa diplomskega dela

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mikroorganizmi

Za proučevanje odpornosti proti antibiotikom smo uporabili izolate bakterij *Campylobacter* iz piščančjega mesa, izolirane v letu 2008 in 2009 na Zavodu za Zdravstveno varstvo Maribor. Z metodo PCR smo identificirali vse seve bakterij *Campylobacter* iz različnih virov, ki so bili vključeni v analizo, z mnogokratnim PCR pa smo tipizirali 63 izbranih sevov *C. jejuni*. Skupno 104 seve smo dobili iz Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor, 24 iz Veterinarske fakultete in 10 iz zbirke Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, med katerimi je bil tudi referenčni sev *C. jejuni* NCTC 11168. Sevi so izvirali iz piščančjega mesa v prodaji, površinskih voda, humanih kliničnih vzorcev ter fecesa in kože živali.

V vseh zbirkah so bili sevi trajno shranjeni v zaščitnem gojišču BHI z dodatkom glicerola in defibrinirane konjske krvi pri temperaturi -80 °C.

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

Pri delu smo uporabljali naslednja, že komercialno pripravljena gojišča, ali pa smo jih pripravili iz posameznih sestavin:

- Sensititre® mikrotitrskie ploščice za določanje odpornosti proti antibiotikom 7 antibiotikom – gentamicinu, streptomicinu, ciprofloksacinu, tetraciklinu, eritromicinu, nalidiksinski kislini in kloramfenikolu (Treck Diagnostic Systems);
- Gojišče Sensititre® CAMHBT (Treck Diagnostic Systems);
- Gojišče Sensititre® CAMHBT + LHB (Treck Diagnostic Systems);
- Ovčji krvni agar: pripravili smo ga iz osnovnega agarja (Oxoid, CM0271), defibrinirane ovčje krvi (Oxoid, SR0051) in destilirane vode.

3.2.2.1 Ovčji krvni agar

Preglednica 2: Sestavine osnovnega agarja Blood agar base No.2 (Oxoid, CM0271)

Sestavina	Količina (g/l)
Proteozni pepton	15,0
Jetrni prebavek	2,5
Kvasni ekstrakt	5,0
Natrijev klorid	5,0
Agar	12,0

Preglednica 3: Sestavine krvnega ovčjega agarja

Sestavina	Količina
Krvni agar, osnova No.2	20,0 g
Defibrinirana ovčja kri	35,0 ml
Destilirana voda	500 ml

V 500 ml destilirane vode smo vmešali 20 g osnovnega gojišča krvni agar, osnova No. 2. Sestavine smo dobro premešali in raztopili v mikrovalovni pečici. Gojišče smo nato sterilizirali 20 minut pri 121 °C. Ko se je ohladilo na 40-45 °C, smo aseptično dodali 35 ml defibrinirane ovčje krvi, previdno premešali in gojišče v brezprašni komori razlili v petrijeve plošče. Vrednost pH gojišča smo uravnali pri 25 °C na 7,4 ± 0,2.

3.2.2.2 Gojišče CCDA

Sestava:

- Osnovno gojišče CCDA (Oxoid, CM739);
- Dodatek za selektivnost CCDA Selective Supplement (Oxoid, SR155E);
- Destilirana voda.

Preglednica 4: Sestavine osnovnega gojišča CCDA (Oxoid, CM739)

Sestavina	Količina (g/l)
Hranilni bujon	5,0
Aktivno oglje	4,0
Hidroliziran kazeinat	3,0
Železov sulfat	0,25
Natrijev piruvat	0,25
Agar	12,0

Preglednica 5: Sestavine dodatka za selektivnost CCDA Selective Supplement (Oxoid, SR155E)

Sestavina	Količina (mg/l)
Cefoperazon	64,0
Amfotericin	20,0

V 500 ml destilirane vode smo vmešali 22,75 g osnovnega gojišča CCDA. Sestavine smo dobro premešali in raztopili v mikrovalovni pečici. Gojišče smo nato sterilizirali 20 minut pri 121 °C. Ko se je ohladilo na 50 °C, smo aseptično dodali eno ampulo dodatka za selektivnost SR0155, previdno premešali in gojišče v brezprašni komori razlili v petrijeve plošče.

3.2.2.3 Selektivni krvni agar Columbia

Sestava:

- Osnovni medij (Oxoid, CM331);
- Sterilna defibrinirana konjska kri (Oxoid, SR048C);
- Dodatek za rast (Oxoid, SR232E);
- Dodatek za selektivnost (Oxoid, SR069);
- Destilirana voda.

Preglednica 6: Sestavine osnovnega gojišča Columbia (Oxoid, SR048C)

Sestavina	Količina (g/l)
Pepton	23,0
Škrob	1,0
Natrijev klorid	5,0
Agar	10,0

Preglednica 7: Sestavine dodatka za rast (Oxoid, SR232E)

Sestavina	Količina (mg/l)
Natrijev prituват	250,0
Natrijev metabisulfat	250,0
Železov sulfat	250,0

Preglednica 8: Sestavine dodatka za selektivnost (Oxoid, SR069)

Sestavina	Količina
Polimiksin	5000 I.U./l
Rifampicin	10 mg/l
Trimetoprim	10 mg/l
Amfotericin	10 mg/l

V 1000 ml destilirane vode smo vmešali 39 g osnovnega gojišča Columbia osnovni krvni agar. Sestavine smo dobro premešali in raztopili v mikrovalovni pečici. Gojišče smo nato sterilizirali 20 minut pri 121°C. Ko se je ohladilo na 50 °C, smo aseptično dodali 5 % sterilne defibrinirane konjske krvi SR048C, dve ampuli dodatka za selektivnost SR069 in dve ampuli dodatka za rast SR232E, previdno premešali in gojišče v brezprašni komori razlili v petrijeve plošče.

3.2.2.4 Agar Campylosel

Uporabljali smo že pripravljene 90 mm petrijeve plošče s trdnim gojiščem Campylosel™ (Biomérieux, 43361).

3.2.2.5 Gojišče za zamrzovanje

Sestava:

- Osnovni medij Brain Heart Infusion (Oxoid CM0375);
- Sterilna defibrinirana konjska kri (Oxoid, SR048C);
- Glicerol (Merck, 356350),
- Destilirana voda.

Preglednica 9: Sestavine gojišča za zamrzovanje (za 1 enoto)

Sestavine	Količina
Gojišče BHI	0,6 ml
Defibrinirana konjska kri	0,2 ml
Glicerol	0,2 ml

Preglednica 10: Sestavine gojišča Brain Heart Infusion (Oxoid CM0375)

Sestavina	Količina (g/l)
Trdnine telečjega možganskega izvlečka	12,5
Trdnine govejega srčnega izvlečka	5,0
Proteozni pepton	10,0
Natrijev klorid	5,0
Glukoza	2,0
Dinatrijev fosfat	2,5
Agar	10,0

V 1000 ml destilirane vode smo vmešali 47g osnovnega gojišča brain heart infusion. Sestavine smo dobro premešali in raztopili v mikrovalovni pečici. Gojišče smo nato sterilizirali 20 minut pri 121°C. Iz ohlajenega gojišča smo nato pripravili gojišče za zamrzovanje tako, da smo v posamezni krio epruveti zmešali 0,6 ml gojišča BHI, 0,2 ml glicerola in 0,2 ml defibrinirane konjske krvi.

3.2.3 Reagenti

3.2.3.1 Reagenti za PCR

Mešanica za PCR za identifikacijo vrste

Sestavine mešanice:

- Voda za PCR (Qiagen, 129115);
- Pufer REDTaq za PCR (10x) (Sigma Aldrich);
- Mešanica dNTP-jev (2mM) (Promega);
- Oligonukleotidni začetniki (vsi v koncentraciji 1 µg/µl):
 - COL3.3. (5'-GGTATGATTCTACAAAGCGAG-3');
 - COL4.4 (5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3');
 - JEJ3.3 (5'-GAAGAGGGTTGGGTGGT-3');
 - JEJ4.4 (5'-AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG-3');
 - DNK-polimeraza REDTaq (1U/µl) (Sigma Aldrich).

Začetni oligonukleotidi (vsi v založni koncentraciji 10µM) (Omega):

- Cj0056-2-F (5'-GAAAGAAGTGAAGGGTGGT-3');
- Cj0056-2-R (5'-TTATTCAAAGACAGGACTTGA-3');
- Cj1139-2-F (5'-ATGAGTCAAATTCCATCAT-3');
- Cj1139-2-R (5'-GTTCTTGAATATTAGCTTCT-3');
- Cj1422-2-F (5'-ATGCTCAACCCAAATTGAGC-3');
- Cj1422-2-R (5'-GGCAAATTTAAATCATTGCATG-3');
- Cj0485-2-F (5'-GATCTATGCCTAAAGAGCACG-3');
- Cj0485-2-R (5'-TCCTTAGCAAAAGCACAGCC-3');

- Cj1324-2-F (5'-GTGATCACTGCGTGATGCCA-3');
- Cj1324-2-R (5'-CAGTAAAACCACGACTTTAGC-3');
- Cj1720-2-F (5'-AAATGGAACCTGTTATCCAC-3');
- Cj1720-2-R (5'-TCAACCTCCACCGATAAAGT-3').

Priprava založne koncentracije začetnih oligonukleotidov

Založno koncentracijo začetnih oligonukleotidov smo pripravili tako, da smo v brezprašni komori za pripravo mešanice za PCR posameznemu liofiliziranemu začetnemu oligonukleotidu dodali po 1 ml sterilne vode za PCR in vsebino premešali. Tako smo dobili začetne oligonukleotide v založni koncentraciji 10 µM.

3.2.3.2 Reagenti za gelsko elektroforezo

Agarozni gel

Za gelsko elektroforezo smo pripravljali 2 % agarozni gel. Sestava agarognega gela in priprava posameznih sestavin je bila naslednja:

- Agaroza za rutinsko rabo (Sigma Aldrich);
- 0,5 x pufer TAE.

Preglednica 11: Sestava 2% agarognega gela

Sestavina	Količina (g)
Agaroza za rutinsko rabo	3,6
0,5x pufer TAE	180

Pufer TAE

0,5x pufer TAE smo pripravljali iz 10x steriliziranega pufra TAE, ki smo ga hranili v temni steklenici pri 4 °C.

10x pufer TAE

Sestava:

- Tris baza, 0,4M (Promega, H5131);
- Ocetna kislina, 100 % (Merck);
- Na₂EDTA, 0,02 M (Sigma, E5134),
- ddH₂O.

Preglednica 12: Sestava 10x pufra TAE

Sestavina	Količina
Tris baza	48,44 g
Ocetna kislina	12 ml
Na ₂ EDTA	7,44 g
ddH ₂ O	do 1 litra

Sestavine smo raztopili v 900 ml ddH₂O, z ocetno kislino uravnali pH na 8,1 in dopolnili z ddH₂O do 1 litra. Pripravljen pufer smo sterilizirali pri 121 °C 20 minut, ga ohladili in v temni steklenici shranili v hladilnik.

0,5x pufer TAE

Sestava:

- 10 x pufer TAE;
- ddH₂O.

Preglednica 13: Sestava 0,5x pufra TAE

Sestavina	Količina (ml)
10x pufer TAE	50
ddH ₂ O	950

Raztopina etidijevega bromida

Uporabljali smo raztopino etidijevega bromida s koncentracijo 0,5 µg/ml.

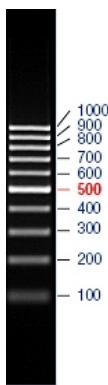
Molekulski označevalec dolžin pomnožkov DNK – 100 bp

Sestava:

- 100 bp DNA lestvica (Fermentas);
- Voda za PCR (Qiagen, 129115);
- Nanašalni pufer, 6x (Fermentas).

Preglednica 14: Sestava molekulskega označevalca dolžin pomnožkov DNK – 100 bp

Sestava	Količina
100 bp DNA lestvica	10 µl
Voda za PCR	40 µl
Nanašalni pufer	10 µl



Slika 14: Molekulski označevalec pomnožkov DNK – 100 bp na agaroznem gelu (Fermentas, 2011)

3.2.4 Laboratorijska oprema

Splošni mikrobiološki material:

- Avtomatske pipete (Gilson, Eppendorf);
- Nastavki za avtomatske pipete (Gilson, Eppendorf);
- 2 mililitrske centrifugirke (Eppendorf);
- 1,5 mililitrske centrifugirke (Sarstedt);
- Krioepruvete (Sarstedt);
- Merilni valji (Plastibrand);
- Laboratorijske steklenice (Duran);
- Injekcijske brizgalke, 2ml (BD Plastipak);
- Stojala za mikrocentrifugirke (Kemomed d.o.o.);
- Laboratorijska igla (Tik d.o.o.);
- Rokavice (Shield Scientific);
- Nitrilne rokavice (Shield Scientific);
- Plastične cepilne zanke (Labortechnika, Golias);
- Petrijeve plošče (Labortechnika, Golias);
- Vatenke (Wstfield Medical Limited);
- Vrečke za mikroaerofilno atmosfero (Biomérieux),
- Vrečke za avtoklaviranje (Plastibrand);
- Spitaderm (Ecolab);
- Parafilm (Pechiney plastic packaging).

Laboratorijska oprema:

- Brezprašna komora (PIO, SMBC 122AV);
- Digestorij (Elektromedicina, TIP382);
- Ph meter (Hanna Instruments, HI 221);
- Tehnica (Mettler Toledo, PB1502-S);
- Brezprašna komora za pripravo mešanice za PCR (Holten LaminAir);
- Naprava za PCR (Aplied Biosystem; Bio Rad – iCycler);
- Inkubator, 42 °C (Kambič);
- Vodna kopel (Kambič, WB-30);
- Hladilnik (Gorenje, Bosch, Zanussi);
- Zamrzovalnik, -20 °C (Gorenje, LTH);
- Zamrzovalnik, -80 °C (Heto Ultra Freeze);
- Mikrovalovna pečica (Sanyo, Cook'n'grill 1300);
- Generator elektroforeze (Bio Rad);
- Banjice za elektroforezo (Bio Rad);
- Kamera za fotografiranje obarvanega agaroznega gela (Canon);
- Komora za fotografiranje obarvanega agaroznega gela (BioRad, GelDoc 2000);
- Program za fotografiranje obarvanega agaroznega gela (Quantity 1, BioRad);
- Vrtinčnik (Yellowline, TTS2);
- Plinski gorilnik;
- Plinska jeklenka z mešanico plina (Istragas: 3% O₂; 10% CO₂; 87% N₂);
- Anaerobni lonci (Oxoid, Ago 25A);
- Centrifuga (Eppendorf, MiniSpin plus);
- Programska oprema: MS Office; BioNumerics, Applied Maths; GelCompar II, Applied Maths);

- Avtoklav (Sutjeska, SU 30);
- Magnetno mešalo (Tehnica Rotamix, SHP-10);
- Muha za magnetno mešalo;
- Densitometer (Densicheck);
- Inkubator (Kambič, 42 °C);
- Inkubator (Kambič, 60 °C).

3.2 METODE DELA

3.3.1 Revitalizacija kultur

Kulture, s katerimi smo delali, so bile shranjene v zamrzovalniku pri -80 °C. Na ZZV MB smo kulture revitalizirali na selektivnem gojišču Campylosel (Biomerieux) ali ovčjem krvnem agarju. Gojišče Campylosel smo uporabili za prenos izolatov iz ZZV MB na Biotehniško fakulteto, ovčji krvni agar pa za pripravo vcepka za mikrodilucijo na ZZV MB. Iz posamezne krioerpruvetke smo s cepilno zanko na gojišče aseptično prenesli po eno kroglico s kulturo.

V Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo na Biotehniški fakulteti smo kulture, shranjene v gojišču za zamrzovanje (BHI z dodatkom glicerola in defibrinirane konjske krvi) revitalizirali na selektivnem krvnem agarju Columbia. Iz krioerpruvetke smo gojišče s cepilno zanko aseptično prenesli na selektivni krvni agar Columbia. Nacepljene petrijeve plošče smo nato inkubirali 24 ur pri 42 °C, v mikraerofilnih pogojih, ki smo jih zagotovili z mešanico plinov v razmerju 5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂ ali komercialno dostopnimi vrečkami za vzpostavitev mikraerofilne atmosfere CampyGen (CN35, Oxoid, Anglija). Po inkubaciji smo zrasle kolonije s cepilno zanko ponovno aseptično razmazali na krvni agar Columbia in inkubirali 24 ur pri 42 °C v mikraerofilni atmosferi.

3.3.2 Molekularna identifikacija bakterij *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* z metodo PCR

3.3.2.1 Priprava lizata kulture

Lizate kultur smo pripravljali z reagentom PrepMan Ultra® (Applied Biosystems). V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100 µl sterilne destilirane vode in s cepilno zanko aseptično dodali nekaj kolonij kulture. Suspenzijo smo premešali na vrtinčniku in centrifugirali 5 minut pri 13.000 rpm. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in v mikrocentrifugirko dodali 100 µl reagenta PrepMan Ultra®. Suspenzijo smo spet zmešali na vrtinčniku in centrifugirali 3 minute pri 12.000 rpm. Po centrifugiranju smo v svežo sterilno mikrocentrifugirko prenesli 50 µl supernatanta. Tako pripravljen lizat smo lahko hranili v hladilniku pri 4 °C do enega meseca.

3.3.2.2 Princip in izvedba metode

Molekularna identifikacija *C. jejuni* in *C. coli* temelji na rekciji verižne polimerizacije. Gre za metodo hitrega pomnoževanja DNK *in vitro*. Reakcija PCR je sestavljena iz denaturacije, vezave začetnih oligonukleotidov in podaljševanja verige. Pri vsaki stopnji kroga reakcije določimo čas in temperaturo, pri kateri se bo reakcija izvajala. Pri denaturaciji izberemo temperaturo in čas, pri kateri dvoverižna vijačnica DNK razpadne, hkrati pa polimeraza ne izgubi aktivnosti. Optimalna temperatura je med 92 °C in 95 °C, trajanje pa med 15 sekund in 1 minuto. Temperatura, pri kateri se vežejo začetni oligonukleotidi je približno 5 °C pod temperaturo tališča interakcije začetnih oligonukleotidov z matrično DNK. Trajanje stopnje vezave začetnih oligonukleotidov je od 0,5 do 1 minute. Temperaturo stopnje podaljševanja

DNA določimo glede na temperaturni optimum encima, ki ga uporabljamo in je po navadi med 71 °C in 80 °C. Optimalno število krogov PCR je odvisno predvsem od koncentracije matrične DNK. Preveliko število krogov privede do visokega števila nespecifičnih pomnožkov in produktov z napačno vgrajenimi nukleotidi, zato je pomembno, da v reakcijo damo toliko matrične DNK, da se v 25-30 krogih sintetizira dovolj pomnožene DNK, da jo lahko zaznamo in imamo dovolj za nadaljnje delo (Herzog-Velikonja in sod, 2000).



Slika 15: Naprava za PCR, BioRad

Pri identifikaciji *Campylobacter jejuni* in *C. coli* se pomnožujejo geni, specifični za ti dve vrsti. Za *Campylobacter jejuni* je specifičen gen *hipO*, ki kodira encim hipurikazo, ki hidrolizira hipurat. Za *Campylobacter coli* je značilen gen *aspA*, ki kodira aspartokinazo, katera katalizira reakcijo nastanka lizina, metionina in treonina iz asparaginske kisline. V mešanico za PCR smo dodali dva začetna oligonukleotida, ki sta našla komplementarno zaporedje na genu *aspA* in dva za zaporedje gena *hipO*. Pomnožek gena *asp* je bil dolg 735 baznih parov in je zato med elektroforezo prepotoval krajšo razdaljo kot pomnožek gena *hipO*, ki je bil velik le 500 baznih parov (Zorman in Smole Možina, 2002).

Stopnja začetne denaturacije reakcije je tekla 1 minuto pri 95 °C. Osrednji krog reakcije je stekel 30-krat po programu 15-sekundne denaturacije pri 95 °C, 15-sekundne vezave začetnih oligonukleotidov pri 63 °C in 30-sekundnega podaljševanja verige pri 72 °C. Korak končnega podaljševanja verige je tekel 8 minut pri 72 °C, čemur je sledilo ohlajanje na 4 °C.

3.3.3 Genotipizacija bakterij *Campylobacter jejuni* z mnogokratnim PCR

3.3.3.1 Priprava lizata kulture

Lizat smo pripravili z reagentom PrepMan Ultra® na enak način kot za identifikacijo sevov z metodo PCR.

3.3.3.2 Princip in izvedba metode

Genotipizacija temelji na identifikaciji posameznih genetskih označevalcev, specifičnih za seve *Campylobacter jejuni* iz posameznih ekoloških niš. V mnogokratnem PCR smo uporabili 12 oligonukleotidnih začetnikov, specifičnih za 6 genetskih označevalcev. Zaradi visokega

Števila oligonukleotidnih začetnikov smo izpeljali za vsak posamezen izolat 2 večkratni reakciji PCR s po 6 oligonukleotidnimi začetniki, da smo se izognili inhibiciji zaradi previsoke koncentracije le-teh. Pripravili smo mešanico za PCR 3 in mešanico za PCR 4, vsako s po 6 različnimi oligonukleotidnimi začetniki. Pomnožki, ki smo jih pričakovali na agaroznem gelu po gelski elektroforezi, so bili veliki 415, 703 in 900 baznih parov (mešanica za PCR 1) ter 406, 599 in 765 baznih parov (mešanica za PCR 2).

Stopnja začetne denaturacije reakcije je tekla 15 minut pri 94 °C. Osrednji krog reakcije stekel 35-krat po programu 30-sekundne denaturacije pri 94 °C, 90-sekundne vezave začetnih oligonukleotidov pri 53 °C in 90-sekundnega podaljševanja verige pri 72 °C. Korak končnega podaljševanja verige je tekel 10 minut pri 72 °C, čemur je sledilo ohlajanje na 4 °C.

3.3.4 Gelska elektroforeza

3.3.4.1 Priprava agaroznega gela

Pri delu za diplomsko nalogu smo uporabljali 2 % agarozni gel. Agarozo smo v mikrovalovni pečici raztopili v 0,5x pufru TAE in pri tem pazili, da raztopina ni vrela. Agarozo smo raztopljal, dokler ni postala raztopina popolnoma bistra, brez vidnih plavajočih delcev. Raztopino smo nato ohladili na približno 60 °C in jo vlili v model za gel, v katerega smo predhodno namestili glavnicek. Po 20 minutah, ko se je gel strdil in spremenil barvo iz prozorne v belo, smo odstranili glavnicek in gel položili v banjico za elektroforezo, napolnjeno z 0,5x pufrom TAE.

3.3.4.2 Princip in izvedba metode

Po končani reakciji smo pomnožke PCR razredčili z mešanico vode za PCR in nanašalnega pufra (3 µl pomnožka, 5µ vode za PCR in 2 µl 6x nanašalnega pufra), jih nanesli na agarozni gel in izvedli gelsko elektroforezo. Pomnožkov iz reakcije PCR ni bilo potrebno redčiti, ker so že vsebovali obarvano REDTaq polimerazo in REDTaq pufer za PCR, ki imata enake lastnosti kot nanašalni pufer.



Slika 16: Banjica za gelsko elektroforezo (levo)

Slika 17: Generator elektroforeze BioRad (desno)

Elektroforeza temelji na sposobnosti potovanja nabitih delcev v električnem polju. DNK je negativno nabita biološka molekula, ki v električnem polju potuje proti pozitivno nabiti katodi. Hitrost potovanja molekule DNK je odvisna od njene velikosti in od električnega polja, ki deluje nanjo. Nosilci električnega toka, ki teče med elektrodama, so nabite molekule vzorca in ioni, ki so sestavni del elektroforeznega pufra. Elektroforezo izvedemo na nosilcu, ki je potopljen v elektroforezni pufer. Kot nosilec lahko uporabimo agarozni gel. Snovi, ki se razlikujejo po elektroforetski mobilnosti, se pri elektroforezi različno hitro premikajo skozi gel. Zasledujemo jih s primerno analitsko metodo (Sepčić in sod., 2002).

3.3.4.3 Odčitavanje rezultatov

Gel smo po elektroforezi pobarvali z raztopino etidijevega bromida, ki se vrine med baze v dvojni vijačnici DNK in pod lučjo z UV spektrom svetlobe fluorescira. Glede na prepotovano razdaljo DNK označevalca z znanimi velikostmi fragmentov DNK smo lahko ocenili velikost posameznega PCR pomnožka. Pri identifikaciji vrste smo z metodo PCR v posamezni reakciji dobili en sam pomnožek, pri genotipizaciji pa do tri pomnožke.



Slika 18: Komora za fotografiranje agaroznih gelov pod svetlobo UV spektra

3.3.5 Analiza rezultatov genotipizacije

Rezultate smo analizirali s programom BioNumerics®, kjer smo izbrali algoritmom Dice in metodo izrisovanja dreves UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean; metoda neponderirane aritmetične sredine).

Ker smo za vsak izolat izvedli dve različni PCR reakciji s po 6 oligonukleotidnimi začetniki, smo na koncu dobili dve skupini gelov, ki smo jih označili kot skupini PCR 1 in PCR 2. Vsak izolat je tako lahko imel do tri pomnožke na gelu iz skupine PCR 1 in do tri pomnožke na gelu iz skupine PCR 2.

Pri skupini podatkov PCR 1 smo optimizacijo nastavili na 0,6 % in pozicijsko toleranco na 3,0 %, pri skupini PCR 2 pa smo optimizacijo nastavili na 0 %, pozicijsko toleranco pa na 9,0 %.

3.3.6 Metoda ugotavljanja odpornosti proti antibiotikom z mikrodilucijo na ploščah Sensititre® (Trek Diagnostic Systems)

3.3.6.1 Priprava vcepka

Iz kulture, ki smo jo 24 ur inkubirali pri 42 °C v mikraerofilnih pogojih na ovčjem krvnem agarju, smo pripravili vcepek. Iz ovčjega krvnega agarja smo z vatenko prenesli v 5 ml gojišča Sensititre® CAMHBT (tekoče gojišče Mueller Hinton s pufrom TES) toliko kolonij, da smo dosegli koncentracijo 0,5 McFarland, kar je enako koncentraciji $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ celic na mililiter suspenzije. Iz tako pripravljene in premešane suspenzije smo nato prenesli 100 µl v 11 ml gojišča Sensititre® CAMHBT+LHB (tekoče gojišče Mueller Hinton s pufrom TES in dodatkom defibrinirane konjske krvi) in tako pripravili inokulum.



Slika 19: *Campylobacter* spp. na ovčjem krvnem agarju (levo)

Slika 20: Epruveti z gojiščem Sensititre® CAMHBT+LHB (desno)

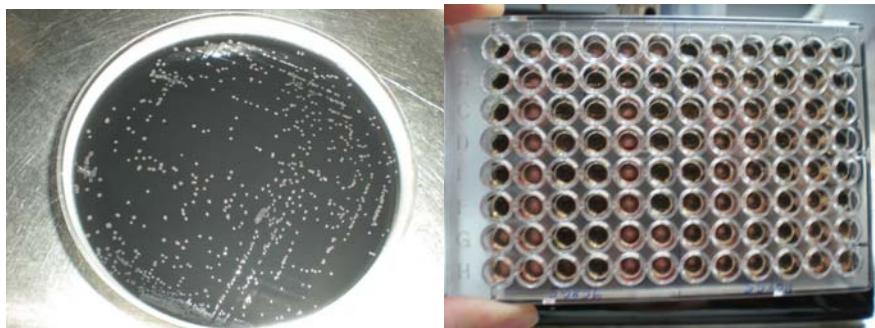
3.3.6.2 Princip in izvedba metode

Po 100 µl vcepka smo odpipetirali v vsako jamico polovice mikrotitrsko ploščice Sensititre® za določanje odpornosti proti 7 različnim antibiotikom (gentamicinu, streptomicinu, ciprofloksacinu, tetraciklinu, eritromicinu, nalidiksinski kislini in kloramfenikolu). Napolnjeno ploščico smo nato prelepili s samolepilnim trakom, ki je nad vsako jamico pustil majhno odprtino za dostop zraka. S tem smo zagotovili mikraerofilne pogoje. Ploščice smo nato inkubirali 24 ur pri 42 °C v mikraerofilnih pogojih.

	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	POZ KON	GEN 0,25	CIP 0,12	TET 0,5	ERY 1	NAL 2	POZ KON
H	GEN 0,12	CIP 0,06	TET 0,25	ERY 0,5	POZ KON	POZ KON	GEN 0,12	CIP 0,06	TET 0,25	ERY 0,5	POZ KON	POZ KON

Slika 21: Shema mikrotitrtske ploščice Sensititre® za določanje odpornosti

Za vsak testiran sev smo naredili kontrolo koncentracije in čistosti kulture. Kontrolo smo pripravili iz pozitivne kontrole v jamici na plošči, ki ni vsebovala antibiotika. Iz jamice s pozitivno kontrolo smo z 10-mikrolitersko cepilno zanko prenesli 10 µl kulture na agar CCDA in mrežasto razmazali. Nato smo pripravili še redčitev, tako, da smo 10 µl kulture iz jamice s pozitivno kontrolo prenesli v 50 µl sterilne destilirane vode. Na drugo kontrolno gojišče CCDA smo prenesli 10µl pripravljenе redčitve in mrežasto razmazali. Rezultate smo upoštevali, če je na plošči z neredčeno kontrolo zraslo več kot 100 CFU, na plošči z redčeno kontrolo pa manj kot 10 CFU in če je na kontrolnih ploščah zrastla čista kultura. Bakterije *Campylobacter* so na gojišču CCDA sive barve, premera do 1,5 mm in nekoliko sluzastega videza.



Slika 22: *Campylobacter* spp. na gojišču CCDA (levo)

Slika 23: Sensititre® mikrotitrtska ploščica za določanje odpornosti (desno)

Metoda temelji na inhibiciji rasti kulture zaradi prisotnosti antibiotika. Minimalno inhibitorno koncentracijo določimo vizualno tako, da določimo jamico z najnižjo koncentracijo antibiotika, pri kateri ni več vidne rasti. Rast je vidna kot usedlina na dnu jamice.

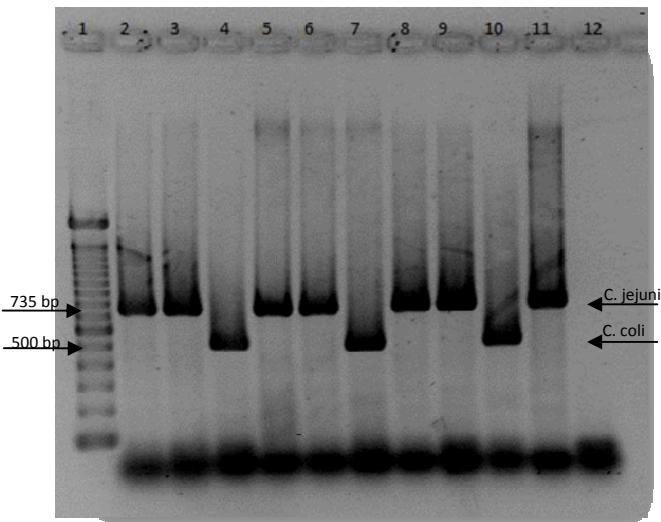
4 REZULTATI

Eksperimentalno delo je potekalo v Laboratoriju za živila in predmete splošne rabe ZZV Maribor in Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Biotehniške fakultete v obdobju od 16. 11. 2009 do 12. 2. 2010.

4.1 MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ *Campylobacter* Z METODO PCR

Z molekularno metodo identifikacije smo želeli preveriti točnost predhodne klasične identifikacije (po ISO 10272:1995) 125 sevov rodu *Campylobacter*, ki so izhajali različnih virov: piščančjega mesa, površinskih vod, humanih kliničnih vzorcev ter fecesa in kože živali.

Identifikacije je potekala s 4 oligonukleotidnimi začetniki, od teh sta dva specifično prepoznaла gen *hipO*, druga dva pa gen *aspA*. Velikost pomnožka gena *hipO*, specifičnega za vrsto *Campylobacter jejuni*, je bila 735 baznih parov, velikost pomnožka *aspA*, specifičnega za vrsto *C. coli*, pa 500 baznih parov.



Slika 24: Primer agarognega gela s pomnožki PCR za identifikacijo vrst *C. jejuni* in *C. coli*. Pomnožki na gelu: 1: molekulske označevalec pomnožkov DNA (100 bp), 2: 49/4 (toplotna liza, 10-kratna redčitev), 3: 11168 (toplotna liza, 10-kratna redčitev), 4: 7114 (toplotna liza, 10-kratna redčitev), 5: 49/4 (liza s PrepMan-om, neredčen vzorec), 6: 11168 (liza s PrepMan-om, neredčen vzorec), 7: 7114 (liza s PrepManom, neredčen vzorec), 8: 49/4 (liza s PrepMan-om, 10-kratna redčitev), 9: 11168 (liza s PrepMan-om, 10-kratna redčitev), 10: 7114 (liza s PrepMan-om, 10-kratna redčitev), 11: K43/4 (izolat čiste DNA, neredčen vzorec), 12: negativna kontrola (voda za PCR). V nadaljnjih reakcijah smo kot pozitivno kontrolo za *C. jejuni* uporabljali sev 49/4, za *C. coli* pa sev 7114.

V spodnji preglednici so prikazani rezultati klasične (po ISO 10272:1995) in molekularne identifikacije izbranih izolatov. Z vijolično barvo so označeni izolati, katerih klasična in molekularna identifikacija se ni ujemala.

Preglednica 15: Rezultati molekularne identifikacije *Campylobacter jejuni* in *C. coli* v primerjavi s klasično identifikacijo

Zaporedna številka	Laboratorijska številka seva	Klasična tipizacija z biokemijo	Tipizacija s PCR	Vrsta izolata
1	29856	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
2	29852	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
3	29854	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
4	29783	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
5	29782	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
6	29781	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
7	30972	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
8	31008	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
9	33767	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
10	33759	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
11	36354	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
12	36356	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
13	38758	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
14	42101	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
15	42124	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
16	44731	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
17	44732	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
18	44733	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
19	44734	<i>C. lari</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
20	44735	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
21	47482	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
22	47511	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
23	48441	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
24	48468	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
25	48467	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
26	48466	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
27	48461	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
28	48462	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
29	48471	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
30	49658	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
31	49600	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
32	49601	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
33	49659	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
34	52230	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
35	52236	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
36	52250	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
37	52241	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
38	52238	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
39	53197	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
40	53123	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
41	47509	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
42	53124	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
43	53198	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
44	53191	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso

Nadaljevanje preglednice 15: Rezultati molekularne identifikacije *Campylobacter jejuni* in *C. coli* v primerjavi s klasično identifikacijo

45	53196	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
46	54677	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
47	54678	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
48	55191	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
49	55190	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
50	55188	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
51	57356	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
52	57357	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
53	57358	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
54	57359	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
55	57360	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
56	57378	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
57	57379	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
58	57380	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
59	57381	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
60	57382	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
61	58429	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
62	58430	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
63	60074	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
64	60057	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
65	60077	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
66	60098	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
67	60089	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
68	60094	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
69	60230	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
70	60981	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
71	61034	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
72	61035	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	meso
73	60982	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	meso
74	1603	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	voda
75	00554	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	voda
76	1377	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	voda
77	00551	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	voda
78	01378	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	voda
79	01379	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	voda
80	01587	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	voda
81	00816	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	voda
82	01604	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	voda
83	9152	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	humani
84	9387	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	humani
85	9493	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	humani
86	9711	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	humani
87	9090	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	humani
88	9795	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	humani
89	9829	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	humani
90	9091	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	humani
91	9581	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	humani

Nadaljevanje preglednice 15: Rezultati molekularne identifikacije *Campylobacter jejuni* in *C. coli* v primerjavi s klasično identifikacijo

92	9544	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	humani
93	24982/43	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Voda (Sava-Medno)
94	17343/21	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Ljubljanica
95	17343/22	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Ljubljanica
96	17341/20	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Ljubljanica
97	07/803	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	površinske vode
98	1855/32	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	meso
99	1744/23	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Ljubljanica
100	17697/26	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	Reka, pri II. Bistrici
101	07/807	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	površinske vode
102	122/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces piščanca
103	123/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces piščanca
104	660/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces piščanca
105	1518/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces piščanca
106	1591/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces piščanca
107	846/09	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces piščanca
108	965/09	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces piščanca
109	1093/09	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces piščanca
110	1190/09	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	koža piščanca
111	244/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces purana
112	1186/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces purana
113	1271/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces purana
114	1297/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces purana
115	2252/09	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces purana
116	654/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	koža purana
117	670/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	koža purana
118	885/1/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	koža purana
119	885/2/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	koža purana
120	2900/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	koža purana
121	180/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces goveda
122	211/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces goveda
123	609/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces goveda
124	1728/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces goveda
125	1292/08	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	feces goveda

V 101 primerih od 125 (80,8 %) je bila molekularna identifikacija enaka kot klasična. V vseh primerih odstopanja je bil s klasično metodo identificiran *C. jejuni*, z molekularno pa *C. coli*.

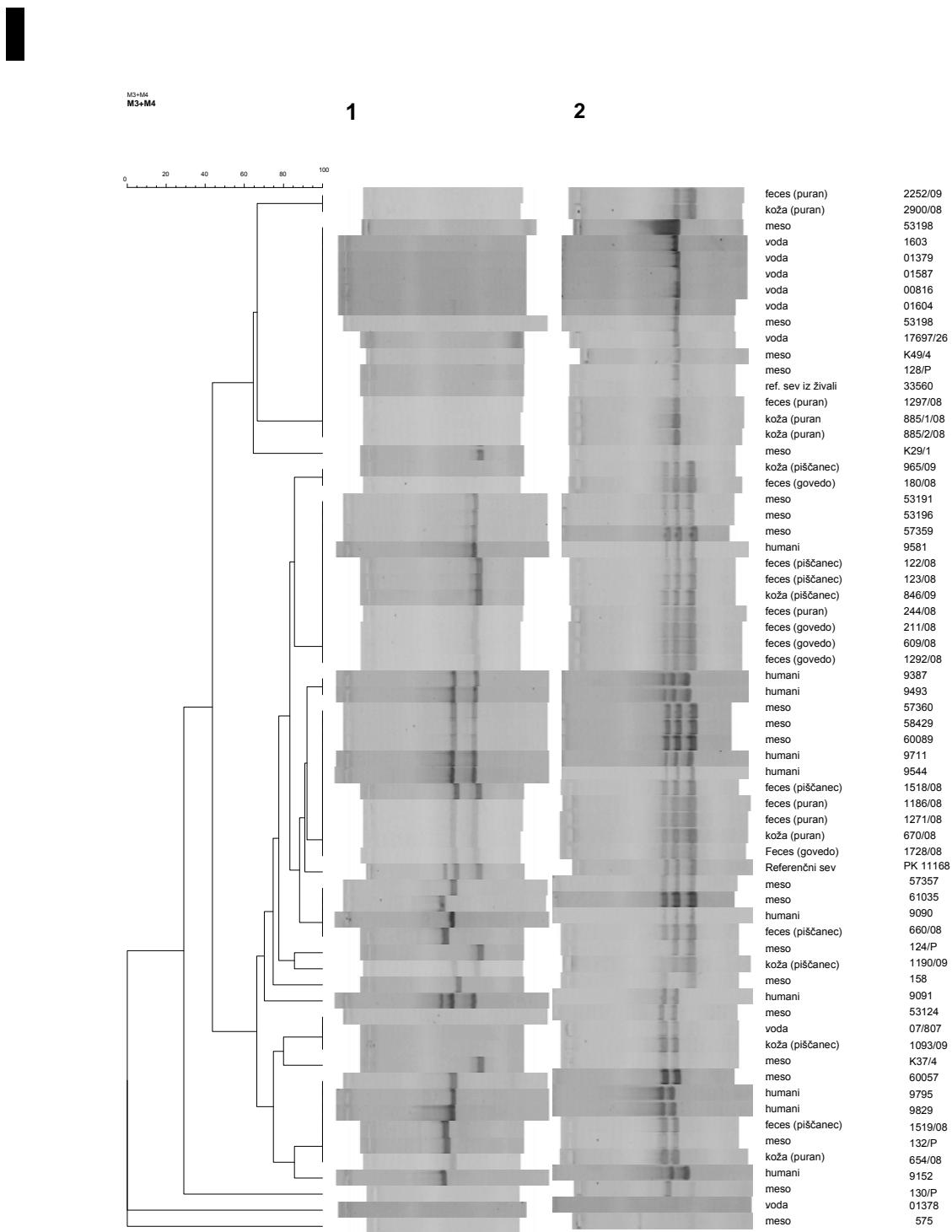
4.2 GENOTIPIZACIJA BAKTERIJ *Campylobacter jejuni* Z MNOGOKRATNIM PCR

V raziskavo validacije šestih novih genetskih označevalcev za določanje izvora seva smo vključili 62 sevov *Campylobacter jejuni*, izoliranih iz fecesa živali in ljudi, mesa ter vode. S pomočjo 6 novih genetskih označevalcev smo želeli določiti ali izolat izhaja iz živega ali neživega okolja. V preglednici 16 so označeni pomnožki specifičnih dolžin, ki smo jih dobili v dveh ločenih pomnožitvah (v tabeli označenih kot PCR 1 in PCR 2). Z vijolično barvo so označeni pozitivni pomnožki.

Preglednica 16: Prikaz dobijenih pomnožkov genotipizacije izolatov *Campylobacter jejuni* iz različnih virov

Nadaljevanje preglednice 16: Prikaz dobljenih pomnožkov genotipizacije izolatov *Campylobacter jejuni* iz različnih virov

123/08						feces piščanec
660/08						feces piščanec
1518/08						feces piščanec
1591/08						feces piščanec
846/09						koža piščanec
965/09						koža piščanec
1093/09						koža piščanec
132/P						meso
124/P						meso
128/P						meso
130/P						meso
575						Voda (Bosna, 2004)
K29/1						meso (Slovenija, 2002)
K37/4						meso (Slovenija, 2002)
158						meso (Slovenija, 2001)
33560						ref. sev iz živali
1190/09						koža piščanec
244/08						feces puran
1186/08						feces puran
1271/08						feces puran
1297/08						feces puran
2252/09						feces puran
654/08						koža puran
670/08						koža puran
885/1/08						koža puran
885/2/08						koža puran
2900/08						koža puran
180/08						feces govedo
211/08						feces govedo
609/08						feces govedo
1728/08						feces govedo
1292/08						feces govedo



Slika 25: Razvrstitev izolatov *Campylobacter jejuni* po podobnosti dobljenih rezultatov s 6 genetskimi označevalci

4.3 ANTIBIOTSKA ODPORNOST BAKTERIJ *Campylobacter*

4.3.1 Antibotska odpornost izolatov *Campylobacter* iz hrane

S komercialnimi mikrotitrskimi ploščami Sensititre® smo določali minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) sedmih antibiotikov 74 izolatom *Campylobacter* iz piščančjega mesa v prodaji. Od tega je bilo 66 živilskih sevov pridobljenih v letu 2009, 8 pa v letu 2008. Dodatno smo v preiskave vključili 11 humanih izolatov bakterij *Campylobacter* iz leta 2009. Določali smo njihovo odpornost proti 7 antibiotikom; aminoglikozidoma gentamicinu in streptomicinu, fluorokinolonu ciprofloxacinu, kinolonu nalidiksinski kislini, tetraciklinu, kloramfenikolu in makrolidu eritromicinu.

Kjer so vrednosti MIK navedene na temnejših poljih, so bili sevi glede na smernice Evropske Unije odporni proti posameznim antibiotikom.

Izolati, označeni z *, so bili izolirani v letu 2008, ostali v letu 2009.

Preglednica 17: Ugotovljene vrednosti MIK ($\mu\text{g}/\text{ml}$) testiranih izolatov *Campylobacter* spp. iz piščančjega mesa

Zap. št.	Lab. številka seva	Vrsta bakterije	MIK ($\mu\text{g}/\text{ml}$)						
			GEN	STR	CIP	TET	ERI	NAL	CHL
1	29856*	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	<0,25	<0,5	>64	<2
2	29852*	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	2	<0,5	64	<2
3	29854*	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	2	>32	>64	4
4	29782*	<i>C. coli</i>	1	>16	>4	>16	<0,5	>64	<2
5	29781*	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	<0,25	<0,5	<2	32
6	30972*	<i>C. coli</i>	1	>16	>4	>16	<0,5	>64	4
7	33759	<i>C. coli</i>	0,5	<1	>4	<0,25	<0,5	64	<2
8	36356	<i>C. coli</i>	0,5	2	0,12	<0,25	<0,5	8	<2
9	48468	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	>16	<0,5	>64	<2
10	48467	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	1	<0,5	>64	<2
11	48466	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	8	<0,5	>64	<2
12	48461	<i>C. coli</i>	0,5	2	<0,06	0,5	1	64	<2
13	48462	<i>C. coli</i>	0,5	2	>4	<0,25	<0,5	>64	4
14	48471	<i>C. coli</i>	0,5	2	4	<0,25	<0,5	64	<2
15	49601	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	1	0,5	>64	<2
16	52230	<i>C. coli</i>	1	>16	>4	>16	<0,5	>64	<2
17	52236	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	16	1	>64	4
18	47509	<i>C. coli</i>	1	>16	>4	>16	<0,5	64	<2
19	54677	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	>16	>32	>64	4
20	55191	<i>C. coli</i>	1	4	>4	>16	1	>64	4
21	55190	<i>C. coli</i>	1	4	>4	>16	1	>64	<2
22	55188	<i>C. coli</i>	1	4	>4	>16	<0,5	>64	<2

Nadaljevanje pregledince 17: Ugotovljene vrednosti MIK ($\mu\text{g}/\text{ml}$) testiranih izolatov *Campylobacter* spp. iz piščančjega mesa

23	57356	<i>C. coli</i>	1	>16	>4	>16	<0,5	64	<2
24	57378	<i>C. coli</i>	0,5	<1	4	<0,25	<0,5	64	<2
25	57379	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	>16	<0,5	>64	
26	57380	<i>C. coli</i>	0,5	2	>4	<0,25	<0,5	64	<2
27	57381	<i>C. coli</i>	1	>16	>4	>16	<0,5	64	<2
28	57382	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	>16	<0,5	>64	<2
29	58430	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	>16	>32	>64	<2
30	60074	<i>C. coli</i>	0,5	2	<0,06	<0,25	<0,5	<2	<2
31	60077	<i>C. coli</i>	0,5	2	<0,06	<0,25	<0,5	4	<2
32	60098	<i>C. coli</i>	0,5	>16	>4	>16	<0,5	>64	<2
33	60094	<i>C. coli</i>	0,5	<1	>4	>16	<0,5	>64	<2
34	60230	<i>C. coli</i>	1	>16	>4	>16	>32	>64	<2
35	60981	<i>C. coli</i>	0,5	2	>4	>16	<0,5	>64	4
36	61034	<i>C. coli</i>	1	2	>4	>16	<0,5	>64	<2
37	60982	<i>C. coli</i>	0,5	2	>4	>16	1	>64	<2
38	54678	<i>C. jejuni</i>	0,25	<1	<0,06	8	>32	32	<2
39	57358	<i>C. jejuni</i>	0,25	<1	<0,06	<0,25	<0,5	<2	<2
40	29783*	<i>C. jejuni</i>	0,5	<1	>4	<0,25	<0,5	64	<2
41	31008*	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	>16	<0,5	2	<2
42	33767	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	16	<0,5	>64	<2
43	36354	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	0,12	0,5	<0,5	8	<2
44	38758	<i>C. jejuni</i>	0,5	<1	>4	<0,25	<0,5	>64	<2
45	42101	<i>C. jejuni</i>	0,5	>16	>4	>16	<0,5	>64	<2
46	42124	<i>C. jejuni</i>	2	8	<0,25	>16	2	16	<2
47	44731	<i>C. jejuni</i>	0,5	<1	0,25	<0,25	<0,5	4	<2
48	44732	<i>C. jejuni</i>	0,5	<1	0,12	0,5	<0,5	4	<2
49	44733	<i>C. jejuni</i>	0,5	<1	>4	>16	<0,5	>64	<2
50	44734	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	>16	<0,5	>64	<2
51	44735	<i>C. jejuni</i>	0,5	>16	>4	>16	<0,5	>64	<2
52	47482	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	<0,25	<0,5	>64	<2
53	49658	<i>C. jejuni</i>	0,5	>16	>4	<0,25	<0,5	64	<2
54	49600	<i>C. jejuni</i>	0,5	>16	>4	2	<0,5	64	<2
55	49659	<i>C. jejuni</i>	0,5	>16	>4	<0,25	>32	>64	<2
56	52250	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	>16	<0,5	>64	<2
57	52241	<i>C. jejuni</i>	1	4	>4	>16	<0,5	>64	4
58	52238	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	>16	>32	>64	<2
59	53197	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	<0,25	<0,5	>64	<2
60	53123	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	16	<0,5	>64	<2
61	53124	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	>16	<0,5	>64	<2

Nadaljevanje pregledince 17: Ugotovljene vrednosti MIK ($\mu\text{g}/\text{ml}$) testiranih izolatov *Campylobacter* spp. iz piščančjega mesa

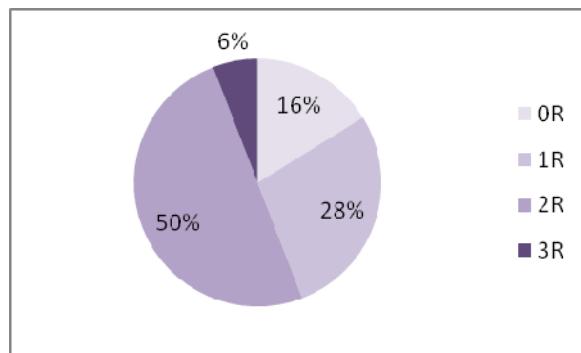
62	53198	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	<0,06	<0,25	<0,5	32	<2
63	53191	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	<0,25	<0,5	>64	<2
64	53196	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	<0,25	<0,5	>64	<2
65	57357	<i>C. jejuni</i>	0,25	<1	4	<0,25	<0,5	64	<2
66	57359	<i>C. jejuni</i>	0,5	<1	>4	<0,25	<0,5	>64	<2
67	57360	<i>C. jejuni</i>	0,5	<1	>4	>16	<0,5	>64	<2
68	58429	<i>C. jejuni</i>	0,5	<1	>4	>16	<0,5	>64	<2
69	60057	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	<0,25	<0,5	>64	<2
70	60089	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	>16	<0,5	>64	<2
71	61035	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	>16	1	64	<2
72	47511	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	1	<0,25	<0,5	>64	<2
73	48441	<i>C. jejuni</i>	0,5	>16	>4	>16	<0,5	>64	4
74	60093	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	<0,06		<0,25	4	<2

Preglednica 18: Parametri ugotavljanja odpornosti z metodo mikrodilucije (EFSA, 2007c)

Antibiotik	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	Razpon uporabljenih koncentracij ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Razpon koncentracij, ki ga priporoča EFSA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Kloramfenikol	>16	>16	2-32	
Ciprofloksacin	>1	>1	0,06-4	0,06-8
Gentamicin	>1	>2	0,12-8	0,125-16
Nalidiksinska kislina	>16	>32	2-64	
Streptomicin	>2	>4	1-16	0,5-32
Eritromicin	>4	>16	0,5-32	0,5-64
Tetraciklin	>2	>2	0,25-16	0,125-16

Preglednica 19: Odstotek proti posameznim antibiotikom odpornih izolatov *Campylobacter* iz hrane; odpornost določena z metodo mikrodilucije

	GEN	STR	CIP	TET	ERY	CHL
<i>Campylobacter</i> spp.	1,4	39,2	85,1	54,1	9,5	1,4
<i>C. coli</i>	0,0	52,2	91,3	56,5	8,7	4,3
<i>C. jejuni</i>	2,0	34,0	82,0	52,0	10,0	0,0



Slika 26: Mnogokratna odpornost izolatov *Campylobacter* iz mesa v letu 2009. Upoštevani so antibiotiki: gentamicin, ciprofloksacin, tetraciklin in eritromicin

4.3.1 Antibiotična odpornost humanih izolatov *Campylobacter*

V primerjavo smo vključili tudi 200 humanih izolatov *Campylobacter jejuni*, *C. coli* in *C. lari*, ki so jih prejeli v Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor (ZZV MB) na Oddelku za humano mikrobiologijo med 1. 4. 2009 in 31. 12. 2009. Na teh sevih so na ZZV MB preverjali odpornost proti 5 antibiotikom (ampicilinu, gentamicinu, eritromicinu, tetraciklinu in ciprofloksacinu) z eksperimentalno metodo difuzije z diskami.

Izmed teh 200 izolatov, smo naključno izbrali 11 izolatov, ki smo jih ponovno testirali z eksperimentalno metodo mikrodilucije na komercialnih mikrotitrskih ploščah Sensititre®.

Preglednica 20: Minimalne inhibitorne koncentracije naključno izbranih 11 humanih izolatov *Campylobacter* spp. iz leta 2009, določene z metodo mikrodilucije

Zap. št.	Lab. številka seva	Vrsta bakterije		MIK							
		Klasična tipizacija z biokemijo	Tipizacija s PCR	GEN	STR	CIP	TET	ERY	NAL	CHL	
1	9152	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	0,5	4	>4	<0,25	<0,5	>64	<2	
2	9387	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	<0,25	<0,5	>64	<2	
3	9795	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	0,5	<1	>4	0,5	<0,5	>64	<2	
4	9493	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	<0,25	<0,5	>64	<2	
5	9829	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	0,5	<1	>4	0,5	<0,5	>64	<2	
6	9711	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	>16	<0,5	>64	<0,2	
7	9581	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	<0,06	<0,25	<0,5	8	<0,2	
8	9544	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	>16	<0,5	>64	<2	
9	9090	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	>16	<0,5	>64	<2	
10	9091	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	0,5	<1	>4	<0,25	<0,5	>64	<2	
11	9483	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	0,5	2	>4	<0,25	<0,5	>64	<2	

Kjer je vrednost MIK označena z vijolično barvo, so bili sevi glede na smernice Evropske Unije odporni proti posameznim antibiotikom (EFSA, 2007c).

Preglednica 21: Odpornost izbranih 11 humanih izolatov *Campylobacter* spp. iz leta 2009, določena z metodo difuzije z diskami

Zap. št. seva	Lab. Št. seva	Klasična identifikacija	Molekularna identifikacija	AMP	GEN	ERI	TET	CIP
1	9152	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	S	S	S	S	R
2	9387	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	R	S	S	S	R
3	9795	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	S	S	S	S	R
4	9493	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	R	S	S	S	R
5	9829	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	I	S	S	S	R
6	9711	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	R	S	S	R	R
7	9581	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	S	S	S	S	S
8	9544	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	R	S	S	R	R
9	9090	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	R	S	S	R	R
10	9091	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	S	S	S	S	R
11	9483	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	S	S	S	S	R

R... odporni sevi

I.... delno odporni sevi

S... občutljivi sevi

Kjer je polje označeno z vijolično barvo, so bili sevi glede na smernice Evropske Unije odporni proti posameznim antibiotikom (EFSA, 2010a).

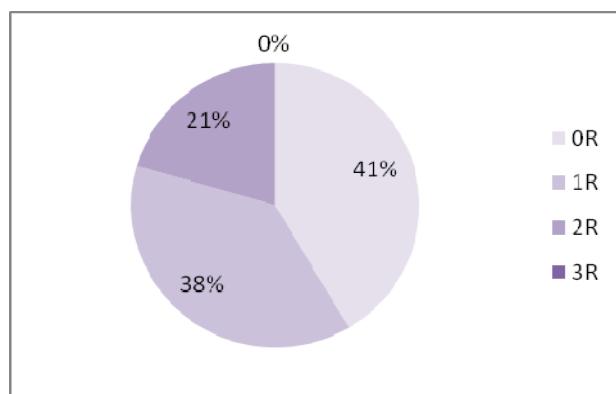
Preglednica 22: Parametri ugotavljanja odpornosti z metodo difuzije z diskami (EFSA, 2010a)

Razpon cone inhibicije za posamezne antibiotike (mm)		Koncentracije posameznih antibiotikov na diskih (μ g)	
Antibiotik	Odporni	Občutljivi	
Ciprofloxacin	>25	<22	5
Ampicilin	>19	<14	10
Tetraciklin	>19	<17	30
Gentamicin	>15	<16	15
Eritromicin	>22	<17	15

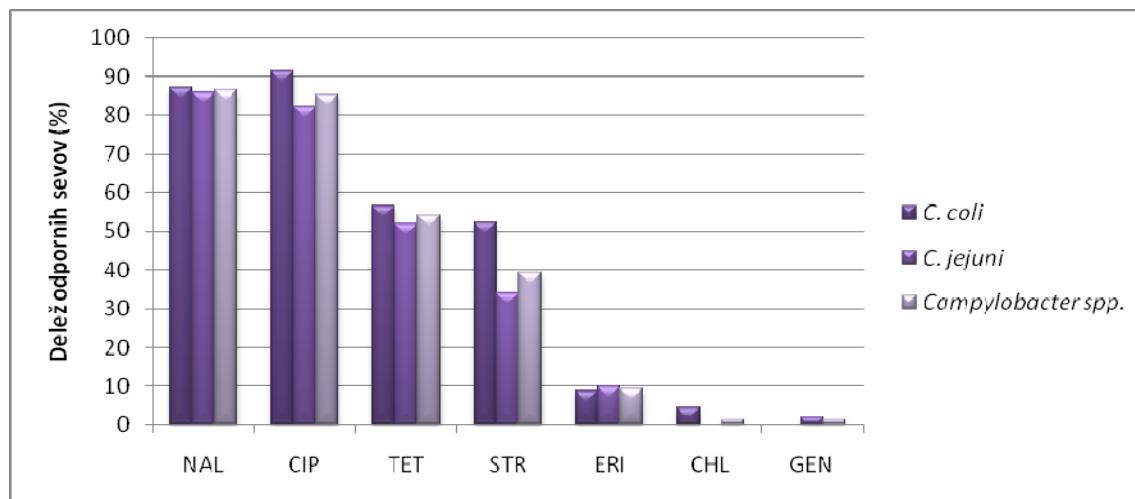
Humani izolati iz Oddelka za humano mikrobiologijo Zavoda za Zdravstveno varstvo Maribor so bili identificirani samo s klasično metodo po ISO standardu. Izmed 200 sevov, jih je bilo 173 identificiranih kot *C. jejuni*, 11 kot *C. coli* in 16 kot *C. lari*.

Preglednica 23: Odstotek proti posameznim antibiotikom odpornih humanih izolatov *Campylobacter*; odpornost določena z metodo difuzije z diskami

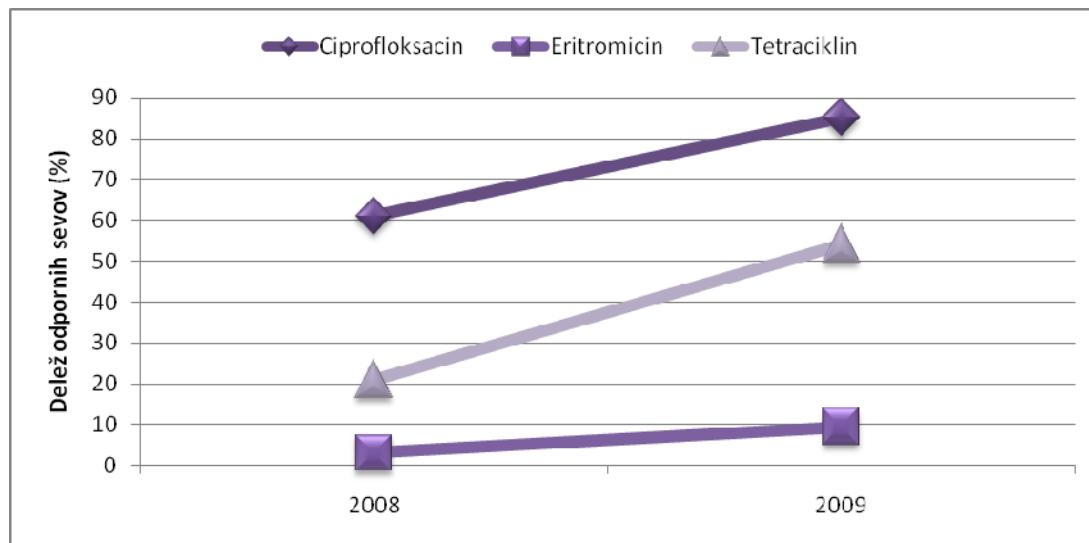
Odstotek odpornih izolatov proti posameznim antibiotikom					
	Ciprofloksacin	Ampicilin	Tetraciklin	Gentamicin	Eritromicin
<i>Campylobacter</i> spp.	55,0	40,5	22,5	1,5	0,0
<i>C. jejuni</i>	53,8	40,5	20,8	1,7	0,0
<i>C. coli</i>	9,1	54,5	18,2	0,0	0,0
<i>C. lari</i>	100,0	31,3	43,8	0,0	0,0



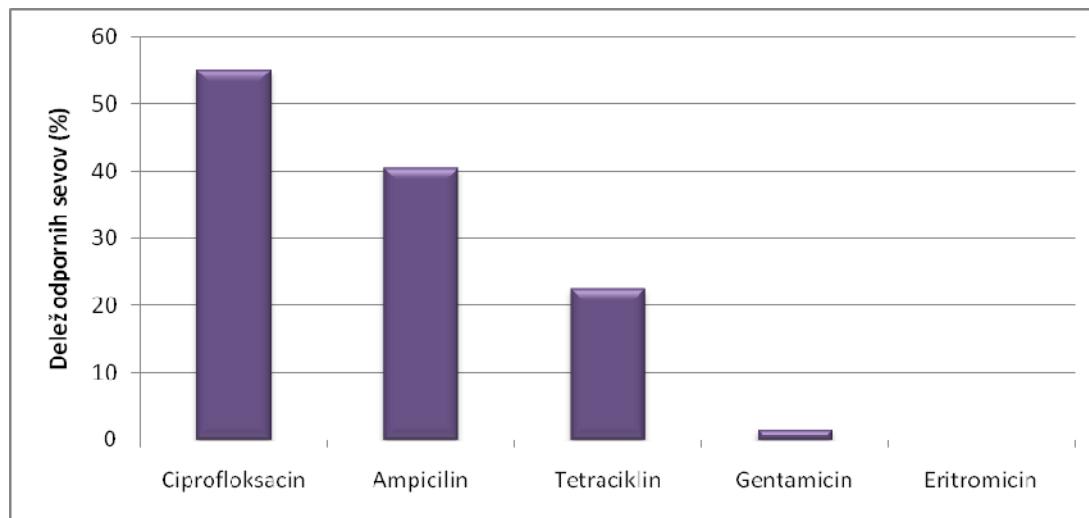
Slika 27: Mnogokratna odpornost humanih izolatov *Campylobacter* v letu 2009. Upoštevani so antibiotiki: gentamicin, ciprofloksacin, tetraciklin in eritromicin



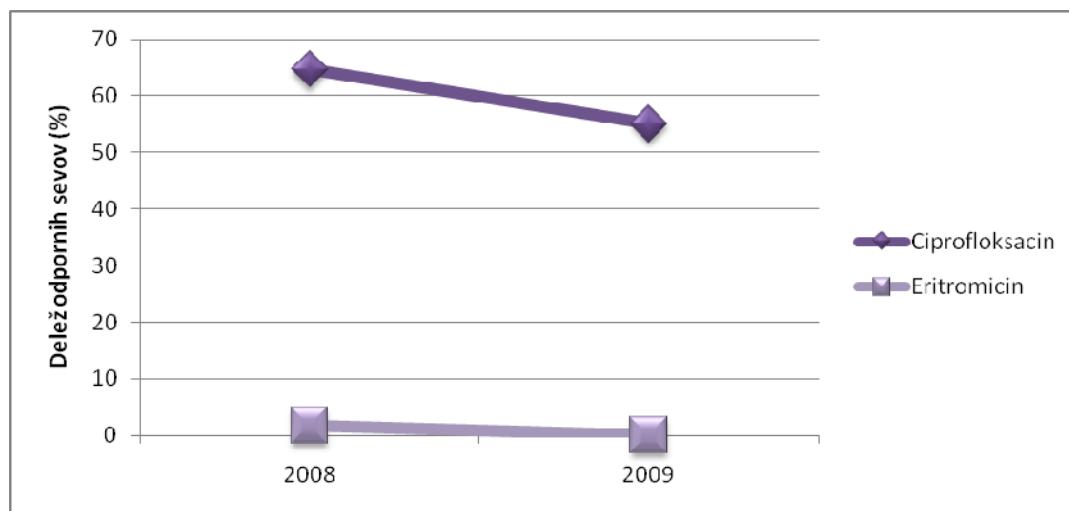
Slika 28: Delež proti posameznim antibiotikom odpornih izolatov *Campylobacter* iz mesa v letu 2009 (N=65); odpornost določena z metodo mikrodilucije



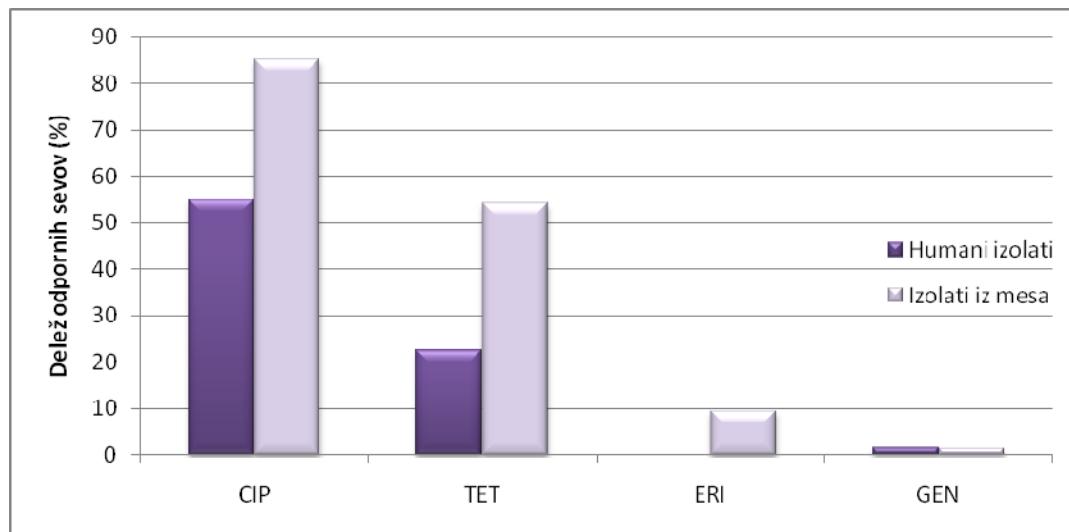
Slika 29: Primerjava odpornosti slovenskih izolatov *Campylobacter* iz mesa v letu 2008 in 2009; odpornost določena z metodo mikrodilucije (za leto 2008 v okviru slovenskega poročila EFSA, za leto 2009 v tej diplomski nalogi)



Slika 30: Odpornost humanih izolatov *Campylobacter* spp. proti posameznim antibiotikom v letu 2009; odpornost določena z metodo difuzije z diskami



Slika 31: Odpornost slovenskih humanih izolatov *Campylobacter* v letu 2008 in 2009; odpornost določena z metodo difuzije z diskami



Slika 32: Delež odpornih izolatov *Campylobacter* iz hrane in humanih kliničnih vzorcev v letu 2009

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Standardna in molekularna identifikacija bakterij *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli*

V raziskavi smo z molekularno metodo hoteli potrditi klasično fenotipsko identifikacijo bakterij *Campylobacter* po standardu ISO 10272. Klasična identifikacija vrste, ki temelji na morfologiji in fenotipskih lastnostih, namreč ni popolnoma zanesljiva. Ločevanje *C. jejuni* od drugih kampilobaktrov namreč temelji na hipuratnem testu, v katerem *C. jejuni* hidrolizira hipurat, torej daje pozitivno reakcijo, ostali kampilobaktri pa negativno. Ta točka identifikacije je hkrati lahko problematična in nezanesljiva, saj vsi sevi *C. jejuni* ne izražajo gena *hip* oz. ga nekateri sploh nimajo, kar poraja dvom v točnost končne identifikacije vrste. Zaradi tega dvoma smo pričakovali manjša odstopanja med klasično biokemijsko in molekularno identifikacijo z dvokratno reakcijo PCR, in sicer tako, da se bodo nekateri s klasično metodo identificirani *C. coli* po identifikaciji z molekularno metodo izkazali kot *C. jejuni*. Po opravljeni primerjalni analizi dobljenih rezultatov pa smo dobili drugačen rezultat. Klasična in molekularna identifikacija sta se popolnoma ujemali pri vseh sevih iz enega od laboratorijskih, kjer so bili sevi pred tem standardno identificirani, pri drugem laboratoriju pa je bil rezultat enak le v 76,2 % (za 77 od 101 seva) (Preglednica 15). Poleg tega je prišlo do obratnih neujemanj kot smo jih pričakovali. S klasično metodo identificirani *C. jejuni* so bili z molekularno metodo identificirani kot *C. coli* pri vseh sevih, kjer je prišlo do različnega rezultata identifikacije. Vzrok za to je najverjetneje iskati v izvedbi omenjenega testa in subjektivnem odločanju pri odčitavanju rezultata, kar kaže na nezanesljivost klasične identifikacije.

5.1.2 Analiza rezultatov genotipizacije

Po analizi rezultatov validacije šestih genetskih označevalcev smo rezultate analizirali s programom BioNumerics®, kjer smo izbrali algoritem Dice in metodo izrisovanja dreves UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Sevi so se v izrisanem dendrogramu razvrstili v 20 skupin. 55,5 % sevov se je razvrstilo v dve večji skupini. V prvi večji skupini, ki se nahaja na vrhu dendrograma (Slika 25), najdemo 17 sevov, od katerih je 35,3 % (6 od 17) iz vode. V to skupino se je uvrstilo 75 % vseh sevov, izoliranih iz vode. Ker je v skupini tudi več kot polovica sevov iz fecesa ali mesa, ne moremo priti do nobenih statistično relevantnih zaključkov. Druga večja skupina, ki se nahaja v spodnjem delu dendrograma, vključuje 46 sevov (na sliki 25 so to sevi od 965/09 do 130/P). V drugi skupini izstopata dve večji podskupini s specifičnim genetskim profilom. V prvi je 11 sevov (od 53191 do 1292/08), od katerih jih je 90,9 % živalskega izvora (3 iz mesa, 6 iz fecesa in 1 iz kože) in 9,1 % iz humanega izvora. V drugo podskupino se je razvrstilo 12 sevov (od 9387 do 1728/08), od katerih je 66,6 % živalskega izvora (3 iz mesa, 4 iz fecesa in 1 iz kože) in 56,6 % humanega izvora.

Na podlagi naše validacije šestih genetskih označevalcev na 63 sevih iz različnih virov (živih in neživih), ne moremo potrditi izhodne hipoteze, ki trdi, da lahko z njimi razlikujemo med sevi *Campylobacter jejuni* iz živih in neživih rezervoarjev.

5.1.3 Analiza rezultatov testiranja izolatov *Campylobacter* na odpornosti proti antibiotikom

5.1.3.1 Analiza rezultatov testiranja izolatov *Campylobacter* iz hrane na odpornost proti antibiotikom

Rezultati odpornosti v letu 2009

V raziskavi smo z metodo mikrodilucije na komercialno pripravljenih mikrotitrskih ploščah Sensititre® preverjali odpornost izolatov *Campylobacter* iz piščančjega mesa proti 7 različnim antibiotikom (gentamicinu, streptomicinu, ciprofloksacinu, nalidiksinski kislini, tetraciklinu, eritromicinu in kloramfenikolu). Testirali smo 74 izolatov iz piščančjega mesa, od katerih je bilo 65 izolatov izoliranih v letu 2009, 8 pa v letu 2008.

Zelo velik delež izolatov iz piščančjega mesa v prodaji v letu 2009 je izkazoval odpornost proti ciprofloksacinu (85,1 % vseh izolatov *Campylobacter*) in nalidiksinski kislini (86,5 % vseh izolatov *Campylobacter*), visok pa je tudi delež sevov, odpornih proti tetraciklinu (54,1 %), streptomicinu in eritromicinu. Slednji je do sedaj veljal za antibiotik z relativno nizko odpornostjo, vendar rezultati izolatov iz leta 2009 kažejo, da je delež odpornih sevov proti antibiotiku močno narasel glede na prejšnja leta (iz 3 % odpornih sevov v letu 2008 na kar 9,5 % odpornih sevov v letu 2009) (Slika 28).

Rezultati odpornosti v letu 2008

V letu 2008 je bilo od 136 izolatov, ki so bili vključeni v nacionalno poročilo Slovenije za EFSA 61 % odpornih proti ciprofloksacinu, 51,5 % proti nalidiksinski kislini, 21 % proti tetraciklinu, 10 % proti streptomicinu, 3 % proti eritromicinu in 1,5 % proti gentamicinu (EFSA, 2010e).

Primerjava rezultatov odpornosti v letu 2008 in 2009

Rezultati testiranja izolatov *Campylobacter* iz piščančjega mesa iz leta 2009 na odpornost proti 7 različnim antibiotikom kažejo opazen porast odpornosti v primerjavi z letom 2008. V skladu s pričakovanji in evropskimi trendi lahko potrdimo naraščanje odpornosti sevov *Campylobacter* spp. tudi v Sloveniji, kar je razvidno tudi iz slike 29. Najpogosteje so sevi *Campylobacter* izkazovali odpornost proti fluorokinolonom, kinolonom in makrolidom.

Na sliki 29 vidimo, da je v skladu z evropskimi trendi tudi pri nas v letu 2009 narasla odpornost proti fluorokinulonu ciprofloksacinu, in sicer iz 61 % na 85 %. Enak trend je opazen tudi pri odpornosti proti tetraciklinu, kjer je odpornost narasla iz 21 % na 54 % odpornih sevov.

Podobno kot pri ciprofloksacinu in tetraciklinu narašča odpornost tudi proti kinolonu nalidiksinski kislini. Opazen je namreč velik porast odpornosti, za kar 29,3 % v enem samem letu. Odpornih je bilo 86,4 % vseh testiranih izolatov iz leta 2009 (Slika 29, Preglednica 17).

Rezultati testov na izolatih iz leta 2009 kažejo kar 6,5 % povišanje stopnje rezistence proti eritromicinu, kar je zelo nezaželeno, saj se eritromycin uporablja za zdravljenje humane kampilobakterioze (Preglednica 17).

Kot pri eritromicinu lahko opazimo močan porast deleža odpornih sevov *C. jejuni* tudi pri aminoglikozidnem antibiotiku streptomycinu. Odpornost med sevi *C. jejuni* je narasla iz občutljivosti v letu 2008, na kar 23,1 % odpornost v letu 2009, medtem ko se je skupna odpornost kampilobaktrov proti temu antibiotiku dvignila za 15,8 % in se obdržala pri 34,5 % odpornih sevov.

Izjemi sta kloramfenikol in aminoglikozidni antibiotik gentamicin z izjemno nizko stopnjo odpornosti, ki je pri gentamicinu v primerjavi z letom poprej celo upadla, proti kloramfenikolu pa ni bilo ugotovljenih odpornih sevov niti v letu 2008 niti v letu 2009 (Preglednica 17).

Mnogokratna odpornost živilskih izolatov *Campylobacter* v letu 2009

V izračun smo vključili štiri nesorodne antibiotike (gentamicin, ciprofloksacin, tetraciklin, eritromycin), na katere smo testirali tako humane, kot tudi izolate iz hrane.

Izmed 65 testiranih izolatov *Campylobacter* iz mesa, se jih je samo 16 % izkazalo za občutljive proti vsem štirim testiranim antibiotikom. 28 % testiranih izolatov je bilo odpornih proti enemu izmed štirih antibiotikov. Polovica jih je bila odporna proti dvema antibiotikoma in 6 % proti trem.

5.1.3.2 Analiza rezultatov testiranja humanih izolatov *Campylobacter* na odpornosti proti antibiotikom

V primerjavo odpornosti v naši nalogi smo vključili tudi 200 humanih izolatov *Campylobacter* iz Oddelka za humano mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. Tam so izolate testirali z eksperimentalno metodo difuzije z diskami.

Po večini poročanj iz preteklosti je metoda mikrodilucije v 85-100 % primerljiva z metodo difuzije z diskami (Domig in sod., 2007, Hachem in sod., 1996, Liao in sod., 2008). Liao in sod. (2008) poročajo o 85,5 % ujemaju rezultatov, Hachem in sod. (1996) pa celo o popolnem ujemaju rezultatov obeh metod. Tudi Domig (2007) in njegovi sodelavci poročajo o zelo visoki primerljivosti rezultatov metode mikrodilucije ter metode difuzije z diskami.

V našem delu smo z obema metodama testirali le 11 sevov, vendar smo pri vseh dobili enake rezultate. Na podlagi naših rezultatov in zaključkov drugih raziskovalcev smo se odločili za primerjavo rezultatov testiranja odpornosti humanih izolatov z metodo difuzije ter rezultatov testiranja odpornosti izolatov iz hrane z metodo mikrodilucije.

Rezultati odpornosti v letu 2009

Najvišji delež odpornih sevov smo ugotovili v primeru antibiotika ciprofloksacina, in sicer 55 %. Sledila je odpornost proti ampicilinu (40,5 %), tetraciklinu (22,5 %) ter gentamicinu (1,5 %), kar je razvidno iz slike 30. Vsi sevi so bili občutljivi na eritromicin.

Rezultati odpornosti humanih izolatov letu 2008

Za leto 2008 so na voljo le podatki za stopnjo odpornosti proti ciprofloksacinu (64,6 %) in eritromicinu (1,8 %). Skupno število testiranih izolatov je bilo 898 (EFSA, 2010e).

Primerjava rezultatov odpornosti v letu 2008 in 2009

Če primerjamo podatke za leto 2008, ki jih je objavila EFSA (2010e) z našimi podatki za leto 2009, vidimo, da je tako v primeru ciprofloksacina in eritromicina delež odpornosti nekoliko padel (za 9,6 % in 1,8 %). Razlika je majhna, poleg tega pa je treba upoštevati tudi dejstvo, da rezultati niso bili dobljeni v istem laboratoriju za obe leti, kot je bilo v primeru živalskih sevov (Slika 31).

Mnogokratna odpornost humanih izolatov proti antibiotikom v letu 2009

Kar 41 % izmed vseh 200 humanih izolatov iz leta 2009 je bilo občutljivih proti vsem antibiotikom. Proti enemu izmed 4 antibiotikov (gentamicinu, ciprofloksacinnu, tetraciklinu in eritromicinu) jih je bilo odpornih 38 % ter proti dvema 28 %. Noben humani izolat ni kazal odpornosti proti 3 ali več antibiotikom (Slika 27).

5.1.3.3 Primerjava rezultatov testiranja humanih izolatov in izolatov *Campylobacter* iz hrane na odpornosti proti antibiotikom

Odpornost proti posameznim antibiotikom

V primerjavi z izolati iz mesa so bili humani izolati redkeje odporni proti testiranim protimikrobnim zdravilom (Slika 32). Delež odpornih izolatov iz mesa je bil v primeru ciprofloksacina za 30,1 % višji kot pri humanih izolatih. Prav tako velja za eritromicin, kjer je bil delež odpornih sevov iz mesa večji za 9,5 % kot pri humanih izolatih, ki so bili vsi občutljivi na eritromicin. Pri tetraciklinu smo opazili za 31,6 % višji delež odpornih izolatov iz mesa. Odpornost tako humanih izolatov, kot živalskih izolatov proti gentamicinu pa je bila zelo nizka in skoraj enaka (1,5 % oz. 1,4 %).

Mnogokratna odpornost

Tudi pri mnogokratnih rezistencah so rezultati boljši pri humanih izolatih kot pri izolatih iz mesa. Delež vseh občutljivih humanih sevov je bil enak 41 %, medtem ko je bilo občutljivih izolatov iz mesa le 16 %. Proti enemu antibiotiku je bilo odpornih 38 % humanih izolatov in 28 % izolatov iz hrane. Proti dvema antibiotikoma je bilo odpornih 21 % humanih izolatov in polovica izolatov iz mesa. Proti trem antibiotikom je bilo odpornih 6 % izolatov iz hrane. Noben humani izolat ni izkazoval odpornosti proti trem ali več antibiotikom.

V splošnem lahko rečemo, da imajo humani izolati nižje deleže odpornosti proti testiranim antibiotikom.

5.1.3.4 Vzroki za visoko prevalenco odpornosti bakterij *Campylobacter* proti nekaterim antibiotikom

Vzroke za visoko in konstantno naraščajočo odpornost testiranih izolatov iz mesa proti antibiotikom po večini evropskih držav lahko iščemo v široki razširjenosti uporabe le-teh, tako v medicini kot veterini. Globalno ocenjujejo, da se 50 % vseh antibiotikov porabi v veterini (Teuber, 2001). Bakterije, ki v živalih razvijejo odpornost proti antibiotikom, so tako patogeni, povezani s hrano, kot tudi oportunistični patogeni in komenzalne bakterije. Ker so živali z ljudmi povezane z neposrednim stikom, hrano in vodo, lahko v mikroflori živali in ljudi najdemo enake gene za odpornost in mehanizme prenosov le-teh. Zaradi prekomerne uporabe antibiotikov v medicini, kmetijstvu in veterini torej pride do širjenja odpornih bakterij z gnojenjem z živalskimi iztrebki, zalivanjem z oporečno, s fekalijami okuženo vodo in ne nazadnje tudi preko hrane, kontaminirane med proizvodnjo oz. predelavo hrane.

Pri farmskih živalih se antibiotiki uporabljajo tako za zdravljenje bolezni, kot njihovo preprečevanje, poleg tega pa so se podterapevtski odmerki uporabljali tudi za pospeševanje rasti. Slednje je bilo do nedavne zakonske prepovedi v letu 2006 50 let vpeljana praksa tudi v državah Evropske unije, v nekaterih državah izven EU pa je še vedno v uporabi. Uporaba antibiotikov v kmetijstvu je vzbudila skrb že v 60. letih 20. stoletja, ko so v kmetijstvu prenehali uporabljati antibiotike, ki se uporabljajo za zdravljenje ljudi (Donnelly, 1998).

5.2 SKLEPI

- Kot smo predvideli v hipotezi, lahko potrdimo, da klasična metoda identifikacije bakterij *Campylobacter* do vrste ni popolnoma zanesljiva. V naši raziskavi so se rezultati klasične in molekularne identifikacije ujemali v 80,8 % (101 od 125 primerov).
- Na podlagi rezultatov validacije genetskih markerjev ne moremo zaključiti, da z njimi lahko neposredno določimo izvor testiranih sevov, čeprav se je 75 % sevov iz vode razvrstilo v samostojno skupino.
- V skladu z izhodno hipotezo smo ugotovili povišan delež odpornosti kampilobaktrov izoliranih iz hrane proti večini testiranih antibiotikov. V primerjavi s humanimi izolati, so izolati iz hrane izkazali večji delež odpornih sevov proti posameznim protimikrobnim zdravilom, predvsem ciprofloxacinu, nalidiksinski kislini in tetraciklinu. Bistveno večji je bil tudi delež mnogokratno odpornih sevov iz piščančjega mesa (56 %) v primerjavi s kliničnimi sevi (21 %).

6 POVZETEK

Kampilobaktri predstavljajo velik problem v proizvodnji hrane in medicini. V zadnjih letih so vodilni patogeni, ki povzročajo okužbe ljudi preko hrane. Ker njihov naravn rezervoar predstavlja črevesje mnogih živali, zelo pogosto prihaja do kontaminacije mesa s črevesno vsebino klavnih živali. Predvsem problematična je perutnina, ki ima zelo visoko stopnjo okuženosti s kampilobaktri. Bakterije se sicer na samem ne razmnožujejo, ker pogoji izven črevesja tega ne omogočajo, vendar kljub temu predstavljajo resno grožnjo, saj je infektivna doza bakterij *Campylobacter* za človeka zelo nizka.

Večina kampilobakterioz izzveni brez zdravljenja. V primerih težkih okužb pa je potrebno klinično zdravljenje z antibiotiki. Najpogosteje se kampilobakterioze zdravijo z eritromicinom (makrolidni antibiotik), pogosto pa tudi s ciprofloksacinom (fluorokinolonski antibiotik), zaradi njegovega širokega spektra delovanja. Učinkovito zdravljenje vedno bolj omejuje naraščajoča odpornost kampilobaktrov proti večini antibiotikov. Zaradi tega je za učinkovito zdravljenje bistvenega pomena spremljanje odpornosti proti različnim antibiotikom.

V naši raziskavi smo testirali 74 izolatov *Campylobacter* iz piščančjega mesa in 11 humanih izolatov *Campylobacter* na odpornost proti 7 različnim antibiotikom z metodo mikrodilucije. Rezultati kažejo povišan delež odpornosti proti ciprofloksacinu, nalidiksinski kislini, streptomicinu, tetraciklinu in eritromicinu, medtem ko delež odpornosti proti kloramfenikolu in gentamicinu ni narasel in ostaja zelo nizek. Visok je delež odpornosti živalskih sevov proti ciprofloksacinu (80,3 %), ki se uporablja za zdravljenje kampilobakterioze v medicini.

Za verodostojnost določitve odpornosti posameznih vrst kampilobaktrov proti antibiotikom je pomembna zanesljiva identifikacija vrste. Zato smo v raziskavi preverili klasično identifikacijo vseh sevov z molekularno metodo dvokratne reakcije PCR in ugotovili, da smo identični rezultat dobili v 80,8 % testiranih sevov, pri vseh sevih, kjer se je identifikacija vrste razlikovala, pa se je pojavila ista napaka (nezanseljiv rezultat hipuratnega testa). Kot točno smo upoštevali molekularno identifikacijo, ki je bolj specifična.

Danes s klasičnimi metodami tipizacije ne moremo določiti izvora seva, s katerim je posamezen bolnik okužen, zato se veliko dela vлага v raziskovanje novih genetskih označevalcev, s pomočjo katerih bi lahko določili izvor sevov. V naši raziskavi smo validirali 6 genetskih označevalcev, ki so jih pred kratkim razvili na podlagi analize celotnega genoma bakterij *Campylobacter jejuni*. Rezultati tipizacije s temi začetnimi oligonukleotidi niso pokazali neposredne povezave z izvorom sevov. Specifično so se razvrstili le sevi iz vode (75 % teh se je razvrstilo v posebno skupino).

7 VIRI

- Aarestrup F.M., Engberg J. 2001. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. Veterinary Research, 32: 311 – 321.
- Bang D. D., Wedderkopp A., Pedersen K., Madsen M. 2002. Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (*hipO*) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. Molecular and Cellular Probes, 16: 359 – 369.
- Bardoň J., Kolář M., Karpíšková R., Hricová K. 2011. Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in broilers at retail in their Czech Republic and their antibiotic resistance. Food Control, 22: 328 – 332.
- Burnett T. A., Hornitzky M. A., Kuhnert P., Djordjevic S. P. 2002. Speciating *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry and humans using six PCR-based assays. FEMS Microbiology Letters, 216: 201 – 209.
- Carrillo C. D., Taboada E., Nash J. H., Lanthier P., Kelly J., Lau, P.C., Verhulp R., Mykytczuk O., Sy J., Findlay W. A., Amoako A., Gomis S., Willson P., Austin J. W., Potter A., Babiuk L., Allan B., Szymanski C. M. 2004. Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flihA*. Journal of Biological Chemistry, 279: 20327 – 20338.
- Champion O. L., Gaunt W. M., Gundogdu O., Elmi A., Witney A. A., Hinds J., Dorrell N., Wren W. B. 2005. Comparative phylogenomics of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals genetic markers predictive of infection source. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 102, 44: 16043 – 16048.
- CDC. 2008. *Campylobacter*. General information. Atlanta, CDC - Centers for Diseases Control and Prevention: 1 str.
<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/> (januar 2011)
- CDC. 2010. Morbidity and mortality weekly report. Atlanta, CDC - Centers for Diseases Control and Prevention: 16. april 2010: 418 – 421.
<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm5914.pdf> (februar 2011)
- Companyó R., Granados M., Guiteras J., Prat M. D. 2009. Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. Barcelona, Springer-Verlag, 395: 877-891.
- Corry J., Atabay H. 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. Journal of Applied Microbiology, 90: 96 – 114.
- Di Bonaventura G., D'Antonio D., Catamo G., Ballone E., Piccolomini R. 2001. Comparison of Etest, agar dilution, broth microdilution and disk diffusion methods for testing in vitro activity of levofloxacin against *Staphylococcus* spp. isolated from neutropenic cancer patients. International Journal of Antimicrobial Agents, 19: 147 – 154.

- Domig K. J., Mayrhofer S., Zitz U., Mair C., Petersson A., Amtmann E., Mayer H. K., Kneifel W. 2007. Antibiotic susceptibility testing of *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium pseudolongum* strains: Broth microdilution vs. agar disc diffusion assay. International Journal of Food Microbiology, 120: 191 – 195.
- Donnelly P. M. 1998. Commentary on the MAFF technical report: a review of antimicrobial resistance in the food chain. International Journal of Antimicrobial Agents, 12: 63 – 65.
- El-Shibiny A., Connerton P., Connerton I. 2009. Survival at refrigeration and freezing temperatures of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* on chicken skin applied as axenic and mixed inoculums. International Journal of Food Microbiology, 131: 197 – 202.
- EFSA. 2006. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union 2004. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 96 - 116.
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/310anr.pdf> (januar, 2011)
- EFSA. 2007a. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union 2005. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 83 – 102.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/94r.pdf> (januar, 2011)
- EFSA. 2007b. The 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> (januar, 2011)
- EFSA. 2007c. Report of the task force on zoonoses data collection including a proposal for a harmonized monitoring scheme of antimicrobial resistance in *Salmonella* in fowl (*Gallus gallus*), turkeys, and pigs and *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broilers. The EFSA Journal, 18 str.
http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/zoon_report_ej96_amr1_en_0.pdf?ssbinary=true (november, 2010)
- EFSA. 2009. The 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> (januar, 2011)
- EFSA. 2010a. The 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> (januar, 2011)
- EFSA. 2010b. 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: 1 – 2.

- <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/s1503.pdf> (januar, 2011)
- EFSA. 2010c. 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: 1 – 3.
<http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/1503.pdf> (januar, 2011)
- EFSA. 2010d. 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> (januar, 2011)
- EFSA. 2010e. 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> (januar, 2011)
- Fàbrega A., Sànchez-Céspedes J., Soto S., Vila J. 2008. Quinolone resistance in the food chain. International Journal of Antimicrobial Agents, 31: 307 – 315.
- FDA. 2009. Ciprofloxacin. Silver Spring, FDA – Food and Drug Administration: 1 str.
- FDA. 2006. Erythromycin. Silver Spring, FDA – Food and Drug Administration: 1 str.
- FDA. 2010. Tetracyclin. Silver Spring, FDA – Food and Drug Administration: 1 str.
- Fernando U., Biswas D., Allan B., Willson P., Potter A. A. 2007. Influence of *Campylobacter jejuni* *fliA*, *rpoN* and *flgK* genes on colonization of the chicken gut. International Journal of Food Microbiology, 118: 194 – 200.
- Friedman C.R., Hoekstra R.M., Samuel M., Marcus R., Bender J., Shiferaw B., Reddy S., Ahuja S.D., Helfrick D.L., Hardnett F., Carter M., Anderson B., Tauxe R.V. 2004. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet site. Clinical Infectious Diseases, 38, 3: 285 – 296.
- Friis L. M., Pin C., Pearson B. M., Wells J. M. 2004. *In vitro* culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. Journal of Microbiological Methods, 61: 145 – 160.
- Frost J.A. 2001. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. Journal of Applied Microbiology, 90, 6: 85 – 95.
- Gyles C. L. 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. Animal Health Research Reviews, 9: 149 – 158.
- Hachem Y. C., Clarridge J. E., Reddy R., Flamm R., Evans G. D., Tanaka K. S., Graham Y. D. 1996. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. Comparison of E-test, broth microdilution, and disk diffusion for ampicillin, clarithromycin, and metronidazole. Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases, 24: 37 – 41.

- Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2000. Praktikum iz molekularne biologije – teoretični del. Ljubljana, Študentska založba: 59 – 65.
- Horrocks S.M., Anderson R.C., Nisbet D.J., Ricke S.C. 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. Food Microbiology, 15: 18 – 25.
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. 2007. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. International Journal of Food Microbiology, 117: 237 – 257.
- IVZ. 2010. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2009. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 47 – 48.
http://www.ivz.si/nalezljive_bolezni_aktualno?pi=5&_5_Filename=2491.pdf&_5_MediaId=2491&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (februar, 2011)
- IVZ. 2009. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2008. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 37 – 38.
http://www.ivz.si/nalezljive_bolezni_aktualno?pi=5&_5_Filename=1509.pdf&_5_MediaId=1509&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (februar, 2011)
- IVZ. 2008. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2007. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 41 – 42.
http://www.ivz.si/?ni=29&pi=5&_5_Filename=1510.pdf&_5_MediaId=1510&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (februar, 2011)
- IVZ. 2007. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2006. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 35 – 36.
http://www.ivz.si/?ni=29&pi=5&_5_Filename=1511.pdf&_5_MediaId=1511&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (februar, 2011)
- IVZ. 2006. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2005. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 32 – 33.
http://www.ivz.si/?ni=29&pi=5&_5_Filename=1512.pdf&_5_MediaId=1512&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (februar, 2011)
- IVZ. 2005. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2004. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 25 – 26.
http://www.ivz.si/?ni=29&pi=5&_5_Filename=1512.pdf&_5_MediaId=1512&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (februar, 2011)
- IVZ. 2004. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2003. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 27 str.
http://www.ivz.si/?ni=29&pi=5&_5_Filename=1512.pdf&_5_MediaId=1512&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (februar, 2011)
- IVZ. 2003. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2002. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 19 str.
http://www.ivz.si/?ni=29&pi=5&_5_Filename=1512.pdf&_5_MediaId=1512&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (februar, 2011)

- IVZ. 2002. Epidemiološko spremeljanje nalezljivih bolezni 2001. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 18 str.
http://www.ivz.si/?ni=29&pi=5&_5_Filename=1512.pdf&_5_MediaId=1512&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (februar, 2011)
- IVZ. 2001. Epidemiološko spremeljanje nalezljivih bolezni 2000. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 19 str.
http://www.ivz.si/?ni=29&pi=5&_5_Filename=1512.pdf&_5_MediaId=1512&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (februar, 2011)
- Kärenlampi R., Rautelin H., Hänninen M.-L. 2007. Evaluation of genetic markers and molecular typing methods for prediction of sources of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* infections. Applied and Environmental Microbiology, 73: 1683 – 1685.
- Ketley J. M., Konkel M. E. (eds). 2005. *Campylobacter: Molecular and cellular biology*. Norfolk, Horizon Bioscience: 453 str.
- Klančnik A., Botteldoorn N., Herman L., Smole Možina S. 2006. Survival and stress induced expression of *groEL* and *rpoD* of *Campylobacter jejuni* from different growth phases. International Journal of Food Microbiology, 112: 200 – 207.
- Klančnik A., Zorman T., Smole Možina S. 2007. Effects of low temperature, starvation and oxidative stress on the physiology of *Campylobacter jejuni* cells. Croatica Clinica Acta, 81: 41 – 46.
- Klančnik A., Guzej B., Jamnik P., Vučković D., Abram M., Smole Možina S. 2009. Stress response and pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* cells exposed to starvation. Research in Microbiology, 160: 345 – 352.
- 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.
- Kurinčič A., Botteldoorn N., Herman L., Smole Možina S. 2007. Mechanisms of erythromycin resistance of *Campylobacter* spp. isolated from food, animals and humans. International Journal of Food Microbiology, 120: 186 – 190.
- 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.
- Liao C., Kung H., Hsu G., Lu P., Liu Y., Chen C., Lee C., Sun W., Jang T., Chiang P., Cheng Y., Lin H., Shi Z., Wang L., Chuang Y., Tsao S., Lu C., Liu J., Huang C., Hsueh P. 2008. In-vitro activity of tigecycline against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* in Taiwan determined by the broth microdilution and disk diffusion methods. International Journal of Antimicrobial Agents, 32 suppl. 3: S192 - S196.
- Linton D., Lawson A. J., Owen J., Stanley J. 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. Journal of Clinical Microbiology, 35, 10: 2568 – 2572.

- Luangtongkum T., Jeon B., Han J., Plummer P., Logue C. M., Zhang Q. 2009. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: Emergence, transmission and persistence. Future Microbiology, 4: 189-200
- Lund B. M., Baird-Parker T. C., Warwick Gould G. 1999. The microbiological safety and quality of food. Aspen, Aspen Publishers, Inc: 2080 str.
- Madigan T. M., Martinko M. J. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. Edinburgh, Pearson Prentice Hall: 992 str.
- Moore J. E., Barton M. D., Blair I. S., Corcoran D., Dooley J. S. G., Fanning S., Kempf I., Lastovica A. J., Lowrey C. J., Matsuda M., McDowell D. A., McMahon A., Millar B. C., Rao J. R., Rooney P. R., Seal B. S., Snelling W. J., Tolba O. 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. Microbes and Infections, 8: 1955 – 1966.
- Müller A., del León-Kempis M., Dodson E., Wilson S. K., Wilkinskon A. J., Kelly D. J.. 2007. Adhesin and a solute-binding protein: The crystal structure at 1.5 Å resolution of the PEB1a protein from the food-borne human pathogen *Campylobacter jejuni*. Journal of Molecular Biology, 372: 160 – 171.
- Nachamkin I., Blaser J.M. 2000. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, ASM Press: 472 str.
- Park F. S. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology, 74: 177 – 188.
- Sepčić K., Anderluh G., Turk T., Maček P. 2002. Biokemijski praktikum. Ljubljana, Študentska založba: 61 – 67.
- Smole Možina S., Kurinčič M., Klančnik A., Mavri A. 2010. *Campylobacter* and its multi-resistance in the food chain. Trends in Food Science & Technology, 22: 91 – 98.
- Snelling W.J., Matsuda M., Moore J.E, Dooley J.S.G. 2005. Under the microscope *Campylobacter jejuni*. Letters in Applied Microbiology, 41: 297 – 302.
- 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.
- Tauber M. 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. Current Opinion in Microbiology, 4: 493 – 499.
- 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. International Journal of Food Microbiology, 110, 1: 24 – 34.

Wassenaar T. M., , Blaser J. M. 1999. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes and Infection*, 1: 1023 – 1033.

Yokoyama T., Paek S., Ewing P. C., Guerry P., Yeo H. 2008. Structure of a σ^{28} -regulated nonflagellar virulence protein from *Campylobacter jejuni*. *Journal of Molecular Biology*, 384: 364 – 376.

Young K.T., Davis L.M., DiRita V.J.. 2007. *Campylobacter jejuni*. Molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews*, 5: 665 – 679.

Zorman T., Smole Možina S. 2002. Classical and molecular identification of thermotolerant Campylobacters from poultry meat. *Food Technology and Biotechnology*, 40, 3: 177 – 184 .

ZAHVALA

Prisrčna hvala mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za prijaznost in vso pomoč, vzpodbudo ter čas, ki mi ga je namenila v času pisanja diplomske naloge.

~ ~

Hvala delovni mentorici dr. Anji Klančnik za strokovno usmerjanje med delom v laboratoriju.

~ ~

Hvala zaposlenim na Oddelku za Mikrobiologijo Zavoda za Zdravstveno varstvo Maribor, ki so mi omogočili delo v njihovem Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo. Še posebaj hvala dr. Mariji Lušicky za mentorstvo v času dela v njihovem laboratoriju in dr. Katji Zelenik za prijaznost, nasvete in strokovno pomoč.

~ ~

Hvala prof. dr. Romani Marinšek Logar za recenzijo diplomske naloge.

~ ~

Hvala mojim staršem, ki so mi omogočili študij in me ves čas vzpodbjali.

~ ~

Hvala Sanji in prijateljem, ki so se tekom moje študijske poti naučili pričarati nasmehe iz solznih oči.