

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Ljubljana, 2007

BLAŽ MEDJA

**MEHANIZMI ODPORNOSTI BAKTERIJ *Campylobacter jejuni* IN
C. coli PROTI IZBRANIM ANTIBIOTIKOM**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE MECHANISMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF
Campylobacter jejuni AND *C. coli***

GRADUATION THESIS
University Studies

II

Medja B. Mehanizmi odpornosti bakterij *Campylobacter jejuni* in *C. coli* proti izbranim antibiotikom
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo, 2007

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

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

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Blaž Medja

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	MDK 579.24+579.26: 577.18:615.33(043)=863
KG	patogeni mikroorganizmi/ <i>Campylobacter</i> /bakterijska odpornost/antibiotiki/ mikrodilucijska metoda/PAβN/membranske izlivne črpalke/mutacija na <i>23S rRNA</i>
AV	MEDJA, Blaž
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ABRAM, Veronika (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2007
IN	MEHANIZMI ODPORNOSTI BAKTERIJ <i>Campylobacter jejuni</i> in <i>C. coli</i> PROTI IZBRANIM ANTIBIOTIKOM
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 71 str., 16 pregl., 42 sl., 86 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V diplomski nalogi smo z uporabo mikrodilucijske metode ugotavljali odpornost 26 živilskih in kliničnih izolatov <i>Campylobacter</i> spp. na antibiotike eritromicin, ciprofloksacin in tetraciklin. Cilj eksperimentalnega dela je bil ugotoviti, kateri mehanizmi in v kolikšni meri bakterijam zagotavljajo večjo odpornost na omenjene antibiotike. Želeli smo ugotoviti, koliko k povečani bakterijski odpornosti prispeva sistem membranskih izlivnih črpalk in koliko prisotnost mutacije na genu <i>23S rRNA</i> . Kot gojišče smo uporabili tekoče gojišče MHB in trdo gojišče CCDA. Metabolično aktivnost bakterijskih celic smo spremljali z dodatkom reagenta CellTiter-Blue, ki je temeljil na redukciji resazurina v resorufin. Za pomnoževanje gena <i>23S rRNA</i> smo uporabili metodo PCR, za študij pomnožkov pa restriksijsko analizo in gelsko elektroforezo (RFLP). Za določitev aktivnosti membranskih izlivnih črpalk smo uporabili inhibitor PAβN, ki je inhibiral delovanje črpalk CmeABC. Rezultati so pokazali, da te črpalke vplivajo zlasti na povečano bakterijsko odpornost na eritromicin, saj se je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) zaradi dodatka PAβN zmanjšala za faktor 24. Učinek PAβN smo zaznali tudi pri tetraciklinu in ciprofloksacinu, a je bil mnogo manjši kot pri eritromicinu. Proučevali smo tudi koliko mutacija na genu <i>23S rRNA</i> vpliva na povečano bakterijsko odpornost proti eritromicinu. Rezultati so pokazali, da so imeli mutacijo le eritromicin odporni (HLR) izolati. Ugotovili smo, da je bila pri izolatih z mutacijo prisotna tudi aktivnost membranskih izlivnih črpalk, kar pomeni, da sta mehanizma na povečano odpornost delovala vzajemno. Sedmim izmed 26 analiziranih sevov smo določili odpornost na vsaj dva antibiotika (MDR fenotip), vsi med njimi so bili izolirani iz živil.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC MDC 579.24+579.26:577.18:615.33(043)=863
 CX pathogens/*Campylobacter*/bacterial resistance/antibiotics/microdilution method/
 PA β N/efflux pumps/23S *rRNA* mutation
 AU MEDJA, Blaž
 AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/ABRAM, Veronika (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
 Tehnology
 PY 2007
 TI THE MECHANISMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *Campylobacter jejuni*
 AND *C. coli*
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XI, 71 p., 16 tab., 42 fig., 86 ref.
 LA sl
 AL sl/en

AB In this research work the antimicrobial activity of antibiotics erythromycin, ciprofloxacin and tetracycline has been studied against 26 food and human clinical *Campylobacter* spp. isolates by using broth microdilution method. The aim of the experimental work was to find out, which mechanisms were involved in bacterial resistance. The experiment was conducted in order to investigate the role of nucleotide mutation in 23S *rRNA* and bacterial efflux mechanism. All tested cultures were cultivated in MHB liquid medium and on CCDA agar plates. The metabolic activity of bacterial cells was observed by using CellTiter-Blue reagent based on the reduction of resazurin to resorufin which was detected with a fluorescence detector. The gene 23S *rRNA* was multiplied by using PCR, the amplicons were further studied by restriction analysis and gel electrophoresis (RFLP). The antimicrobial susceptibility to all three antibiotics were determined in the absence and presence of efflux pumps inhibitor PA β N, which affected the efflux CmeABC pumps. As the result of PA β N presence, the susceptibility to erythromycin was in average increased 24-fold. The smaller effect of the PA β N was also observed in case of ciprofloxacin and tetracycline. The mutation in gene 23S *rRNA* was determined only at erythromycin high level resistant (HLR) isolates. The presence of efflux pumps activity at the isolates with mutation was also observed, which proved joint activity of these two drug resistance mechanisms. The multi drug resistance (MDR) resistant phenotype was determined at seven out of 26 *Campylobacter* strains, all of them were isolated from food.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	XI
<u>1 UVOD</u>	1
<u>2 PREGLED OBJAV</u>	3
<u>2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i></u>	3
<u>2.1.1 Taksonomska razvrstitev ter fiziološke in metabolične lastnosti</u>	3
<u>2.1.2 Epidemiologija, patogeneza in zdravljenje bolezni</u>	4
<u>2.2 ZDRAVLJENJE BOLEZNI S UPORABO ANTIBIOTIKOV</u>	5
<u>2.2.1 Makrolidi</u>	5
<u>2.2.2 Fluorokinoloni (kinoloni)</u>	6
<u>2.2.3 Tetraciklini</u>	7
<u>2.3 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI NA ANTIBIOTIKE</u>	7
<u>2.3.1 Prevalenca odpornih izolatov</u>	8
<u>2.3.2 Mehanizmi odpornosti bakterije <i>Campylobacter</i> spp.</u>	10
<u>2.3.2.1 Povečana bakterijska odpornost zaradi mutacij</u>	10
<u>2.3.2.2 Povečana odpornost zaradi prisotnosti membranskih izlivnih črpalk</u>	11
<u>2.3.2.2.1 Vpliv inhibicije membranskih izlivnih črpalk na odpornost sevov (MIC)</u>	13
<u>2.3.2.2.2 Inhibitorji membransko izlivnih črpalk</u>	14
<u>2.4 METODE UGOTAVLJANJA ODPORNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i> NA ANTIBIOTIKE</u>	15
<u>2.4.1 Klasične fenotipske metode ugotavljanja občutljivosti na antibiotike</u>	15
<u>2.4.2 Dilucijske metode</u>	15
<u>2.4.3 Genetske metode za ugotavljanje povečane odpornosti na antibiotike</u>	16
<u>2.4.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)</u>	17
<u>2.4.3.2 Restriksijska analiza in študij polimorfizma restriksijskih fragmentov (RFLP)</u>	18
<u>2.4.4 Izolacija molekul bakterijske DNA</u>	19
<u>2.5 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE DIPLOMSKE NALOGE</u>	20
<u>2.5.1 Cilji diplomske naloge</u>	20
<u>2.5.2 Delovne hipoteze</u>	20
<u>3 MATERIAL IN METODE</u>	21
<u>3.1 POTEK DELA</u>	21
<u>3.2 MATERIAL</u>	22
<u>3.2.1 Mikroorganizmi</u>	22
<u>3.2.2 Mikrobiološka gojišča</u>	22
<u>3.2.2.1 Krvni agar Columbia</u>	22
<u>3.2.2.2 Agar CCDA</u>	23

3.2.2.3	Tekoče gojišče Muller Hinton (Mueller Hinton bujon – MHB)	24
3.2.3	Priprava raztopin antibiotikov	24
3.2.3.1	ERITROMICIN (SIGMA-ALDRICH CO.)	24
3.2.3.2	CIPROFLOKSACIN (FLUKA BIOCHEMIKA), TETRACIKLIN (SIGMA-ALDRICH CO.)	24
3.2.4	Priprava reagentov, raztopin in ostalih dodatkov	25
3.2.4.1	Fiziološka raztopina	25
3.2.4.2	Inhibitor PAβN (SIGMA-ALDRICH CO.)	25
3.2.4.3	Reagenti za PCR	25
3.2.4.4	Reagenti za gelsko elektroforezo	25
3.2.4.5	Ostali dodatki	26
3.2.5	Laboratorijska oprema	26
3.3	METODE DELA	27
3.3.1	Revitalizacija bakterij	27
3.3.2	Priprava inokuluma	27
3.3.3	Določanje koncentracije celic v inokulumu	27
3.3.4	Mikrodilucijska metoda v bujonu	28
3.3.4.1	Priprava koncentracij antibiotikov	28
3.3.4.2	Priprava kulture	29
3.3.4.3	Princip ter izvedba metode	29
3.3.4.4	Določitev živosti bakterijskih celic	31
3.3.5	Izolacija kromosomske bakterijske DNA	33
3.3.5.1	Uporabljeni reagenti:	33
3.3.5.2	Izvedba postopka	34
3.3.6	Spektrofotometrično določanje koncentracije DNA	34
3.3.7	Pomnoževanje in restrikcija pomnožka gena 23S rRNA	34
4	REZULTATI	37
4.1	UGOTAVLJANJE VLOGE MEMBRANSKIH IZLIVNIH ČRPALK PRI POVEČANI BAKTERIJSKI ODPORNOSTI PROTI ANTIBIOTIKOM	37
4.1.1	Določitev števila celic v inokulumu	37
4.1.2	Učinek inhibitorja glede na občutljivost sevov za eritromicin	53
4.1.3	Učinek inhibitorja glede na občutljivost sevov za ciprofloksacin in tetraciklin	54
4.1.4	Večkratna odpornost izolatov proti antibiotikom (MDR)	54
4.1.5	Določanje točkovne mutacije na 23S rRNA z metodo PCR-RFLP	55
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	58
5.1	RAZPRAVA	58
5.1.1	Razlogi in posledice prisotnosti odpornih izolatov kampilobakterjev pri ljudeh in živalih	58
5.1.2	Večkratna odpornost proti antibiotikom	59
5.1.3	Metodika ugotavljanja odpornosti bakterij <i>Campylobacter</i> spp. na eritromicin, ciprofloksacin in tetraciklin	59
5.1.3.1	Določanje vrednosti MIC in učinkovitost inhibitorja PAβN z mikrodilucijsko metodo	60
5.1.3.2	Določanje točkovnih mutacij z metodo PCR	60
5.1.4	Vloga izlivnih membranskih črpalk in točkovnih mutacij pri oblikovanju MDR fenotipa	61
5.2	SKLEPI	63
6	POVZETEK	64

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Različni mehanizmi, ki vplivajo na povečano odpornost bakterij na specifične antibiotike(Varagić in sod., 1999; Seme, 2002)	8
Preglednica 2: Sestava osnovnega medija za krvni agar Columbia	22
Preglednica 3: Sestava dodatka za selektivnost <i>Campylobacter</i> Growth Supplement	22
Preglednica 4: Sestava osnovnega medija za agar CCDA	23
Preglednica 5: Sestava dodatka za selektivnost CCDA Selective Supplement	24
Preglednica 6: Sestava osnovnega medija za MHB	30
Preglednica 7: Oznaka luknjic v mikrotiterski ploščici in njihova vsebina	31
Preglednica 8: Prikaz mikrotiterske plošče po končanem dodajanju reagentov in kulture	35
Preglednica 9: Program PCR za ugotavljanje točkovne mutacije	37
Preglednica 10: Koncentracija celic v inokulumu	52
Preglednica 11: Zbirna preglednica rezultatov, prikazanih na slikah 14 do 39	53
Preglednica 12: Učinek inhibitorja membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov za eritromicin	54
Preglednica 13: Delež odpornih sevov in učinek inhibitorja membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov za ciprofloksacin in tetraciklin	54
Preglednica 14: Večkratno odporni izolati glede na njihov izvor	55
Preglednica 15: Postopek priprave koncentracije DNA 25 ng/μl	55
Preglednica 16: Rezultati ugotavljanja prisotnosti točkovne mutacije na pomnoženi sekvenci 23S rRNA	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Bakterija rodu <i>Campylobacter</i> (Kelly D.J., 2007)	3
Slika 2: Kemijska struktura eritromicina (Varagić in sod., 1999)	5
Slika 3: Kemijska struktura ciprofloksacina (Ciprofloksacin, 2007)	6
Slika 4: Strukturna formula tetraciklina (Varagić in sod., 1999)	7
Slika 5: Model tridelne membranske izlivne črpalke	12
Slika 6: Kemijski strukturni formuli inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk CCCP (levo) in PAßN(desno) (Pagès, 2005)	14
Slika 7: Mikrotiterska ploščica	16
Slika 8: Možen način uporabi metode RFLP (RFLP method, 2002)	18
Slika 9: Shema poskusa diplomskega dela	21
Slika 10: Rast kolonij bakterij <i>Campylobacter</i> na selektivnem gojišču CCDA	27
Slika 11: Redukcija resazurina (Riss in Moravec, 2003)	32
Slika 12: Dodajanje barvila CellTiter-Blue™ v luknjice na mikrotiterski plošči	32
Slika 13: Prikaz mikrotiterske ploščice po končani analizi. barve. Dodane reagentne in koncentracije antibiotikov prikazujeta preglednici 7 in 8.	33
Slika 14: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. coli</i> 137; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	39
Slika 15: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. coli</i> 140; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	39
Slika 16: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. coli</i> M37; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	40
Slika 17: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. coli</i> FC8; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	40
Slika 18: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) ciprofloksacin (CIP), tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. coli</i> FC10; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	41
Slika 19: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. coli</i> 229; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	41
Slika 20: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. jejuni</i> 413; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	42
Slika 21: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. jejuni</i> 413; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	42
Slika 22: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. coli</i> WC35; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	43

Slika 23: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. coli</i> FC80; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	44
Slika 24: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolatu <i>C. coli</i> 51/1; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	44
Slika 25: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolatu <i>C. coli</i> CV11076; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	45
Slika 26: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolatu <i>C. coli</i> CV110722; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	45
Slika 27: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolatu <i>C. coli</i> CV110725; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	46
Slika 28: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolatu <i>C. coli</i> CV7114; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	46
Slika 29: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. coli</i> GC154; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	47
Slika 30: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. jejuni</i> VC81; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	47
Slika 31: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolatu <i>C. coli</i> GC190; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	47
Slika 32: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. spp.</i> 111; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	48
Slika 33: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. coli</i> 2235; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	48
Slika 34: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. jejuni</i> 3552; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	49
Slika 35: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. jejuni</i> 3755; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	49
Slika 36: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. coli</i> 44/3; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	50
Slika 37: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) ciprofloksacin (CIP), tetraciklin (TET) pri izolatu <i>C. jejuni</i> 03/573; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	50
Slika 38: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) ciprofloksacin (CIP), tetraciklin(TET) pri izolatu <i>C. coli</i> 171; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	51
Slika 39: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolatu <i>C. coli</i> GC182; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk	51
Slika 40: Učinek inhibitorja (PAßN) na zmanjšanje vrednosti MIC za eritromicin	53
Slika 41: Restriksijski vzorci pomnoženega gena <i>23S rRNA</i> po restrikciji z restriksijskim encimom <i>BsmAI</i> izolatov vrst <i>C. coli</i> in <i>C. jejuni</i> . M: molekularni označevalec dolžin 1 kbp. Na progah 7 in 8 je pri izolatih <i>C. coli</i> 137 in <i>C. coli</i> 140 5 fragmentov, kar potrjuje odpornost na eritromicin. Ostale proge (1-6 in 9-10) imajo 4 fragmente, kar dokazuje, da mutacija ni bila prisotna.	56

Slika 42: Restriksijski vzorci pomnoženega gena *23S rRNA* po restrikciji z restriksijskim encimom *BsmAI* izolatov vrst *C. coli*. M: molekularni označevalec dolžin 1 kbp. Na progah 9 in 12 je pri izolatih *C. coli* M37 in *C. coli* CV 11076 5 fragmentov, kar potrjuje odpornost na eritromicin. Ostale proge imajo 4 fragmente, kar dokazuje, da mutacija ni bila prisotna.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

23S rRNA	podenota 23S ribosomske RNA
A	adenin
ATP	adenozintrifosfat
bp	bazni par
c	koncentracija
C	citozin
CNRCH	(angl. National reference center for <i>Campylobacter</i> and <i>Helicobacter</i>)
CO ₂	ogljikov dioksid
dH ₂ O	destilirana voda
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
EDTA	etilen diamino-tetraocetna kislina
G	gvanin
HLR	angl. high level resistance), visoko odporni sevi, MIC _{ERI} ≥ 16 µg/ml
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
Ile	izolevcin
KH ₂ PO ₄	kalijev dihidrogenfosfat
kbp	kilobazni par
LLR	(angl. low level resistant), nizko odporni sevi, 4 µg/ml ≤ MIC _{ERI} < 16 µg/ml
M	molarnost
MAMA-PCR	angl. mismatch amplification mutation assay-PCR)
MgCl ₂	magnezijev klorid
MDR	(angl. multi drug resistance), večkratna odpornost proti antibiotikom
MHB	Mueller-Hinton bujon
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
mRNA	sporočilna RNA
N ₂	dušik
Na ₂ EDTA	dinatrijev etilen diamino-tetraacetat
NaOH	natrijev hidroksid
O ₂	kisik
PAβN	fenilalanilarginin β-naftilamid
PCR	(angl. Polymerase chain reaction), verižna reakcija s polimerazo
PCR-RFLP	(angl. Restriction fragment length polymorphism – PCR), študij polimorfizma restrikcijskih fragmentov
PCR-SSCP	analiza konformacijskih sprememb enoverižnih fragmentov DNA s PCR
pmol	pikomol (10 ⁻¹² mol)
R	(angl. resistant), odporen
RNA	ribonukleinska kislina
RND	(angl. Resistance nodulation cell division)
RFU	(angl. Relative fluorescence units)
S	(angl. Sensitive), občutljiv MIC _{ERI} < 4 µg/ml
T	timin
Thr	treonin
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
U	učinkovitost inhibitorja PAβN
UV-svetloba	ultravijolična svetloba
V	volumen
µg	mikrogram (10 ⁻⁶ g)

1 UVOD

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

Viri okužbe s to bakterijo so surovo ali premalo toplotno obdelano perutninsko, svinjsko, goveje, ribje meso ter kontaminirano mleko in neklorirana voda (Solomon in Hoover, 1999; Ge in sod., 2002). Okužbe prebavil s to bakterijo potekajo kot vodena, v hujši obliki kot krvava diareja. Bolnik ima značilne bolečine v trebuhu, se slabo počuti in ima vročino. Bolezen poteka kot kratkotrajna diareja, saj le v hujših primerih traja dlje od enega tedna dni (Andlovic, 2002). Okužbe gastrointestinalnega trakta pri človeku povzroča predvsem vrsta *C. jejuni*, 3 do 5 % kampilobakterioz pa povzroča *C. coli* (Microorganisms in foods, 1996).

V modernem načinu proizvodnje živil in živilskih izdelkov so bakterije izpostavljene številnim fizikalno-kemijskim stresom. Njihova preživelost je odvisna od sposobnosti zaznavanja in prilagajanja z mehanizmi, ki povečajo bakterijsko odpornost. Danes obstaja veliko podatkov o naraščajoči odpornosti bakterij *Campylobacter* proti različnim protimikrobno aktivnim snovem, vključno z antibiotiki, ki se uporabljajo v humani in veterinarski medicini. Odpornost bakterijskih izolatov iz živil na antibiotike je nezaželena, saj lahko predstavlja vzrok terapevtske neučinkovitosti pri zdravljenju okužb s patogenimi mikroorganizmi, pa tudi večje tveganje prenosa odpornosti na druge bakterije, npr. v črevesju.

Zaradi različnih vzrokov so številne bakterijske vrste, med njimi tudi kampilobakterji, razvile različne mehanizme, ki povečajo njihovo odpornost proti protimikrobnim snovem. Pozornost smo namenili proučevanju dveh specifičnih protimikrobnih mehanizmov. In sicer: aktivnosti membranskih izlivnih črpalk ter prisotnosti točkovnih mutacij na specifičnih genih (v našem primeru na genu *23S rRNA*). Kot protimikrobna sredstva smo uporabili tri različne antibiotike (eritromicin, ciprofloksacin in tetraciklin), ki se uporabljajo pri zdravljenju kampilobakterioz, tako v humani kot tudi v veterinarski medicini. V eksperimentalni del smo vključili 26 živilskih in humanih (kliničnih) izolatov bakterij *C. jejuni* in *C. coli*, ki so se v predhodnih raziskavah izkazali kot zanimivi za nadaljnje preiskave zaradi povečane odpornosti proti vsaj enemu antibiotiku. Za določitev vrednosti MIC smo uporabili mikrodilucijsko metodo v bujonu v kombinaciji z reagentom Cell-Titer Blue in avtomatiziranim odčitavanjem fluorescentnega signala s čitalcem mikrotiterskih plošč. Prisotnost točkovnih mutacij smo ugotavljali z metodo PCR-RFLP, torej s pomnoževanjem izbranega fragmenta gena *23S rRNA* in z gelsko elektroforezo.

Glavni cilj praktičnega dela je bil ugotoviti, koliko oba omenjena mehanizma vplivata na povečano odpornost bakterijskih celic na izbrane antibiotike. Pri tem smo uporabili primerjalne analize rezultatov, dobljene z ali brez specifičnega inhibitorja membranskih izlivnih črpalk fenilalanin arginin β -naftilamida (PA β N). Predpostavili smo, da se pri izolatih *Campylobacter coli* in *C. jejuni* pogosto pojavlja odpornost proti klinično uporabnim antibiotikom, da dodatek PA β N vpliva na občutljivost testiranih bakterij proti izbranim antibiotikom ter da sta v bakterijsko odpornost proti eritromicinu vključena tako mutacija na genih *23S rRNA* kot tudi aktivno izčrpavanje snovi iz celice.

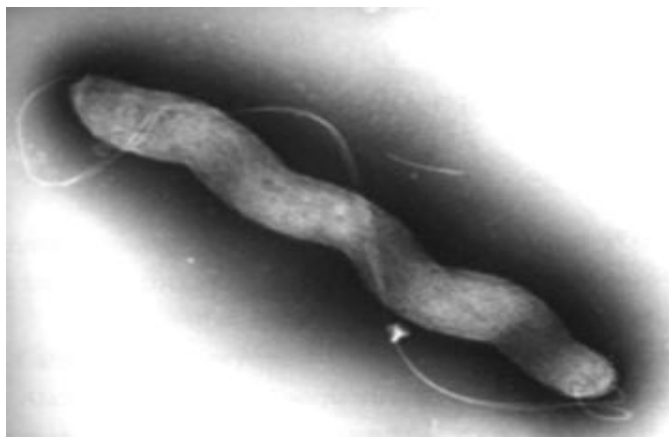
2 PREGLED OBJAV

1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU *Campylobacter*

1 Taksonomska razvrstitev ter fiziološke in metabolične lastnosti

Rod *Campylobacter* (družina Campylobacteraceae) uvrščamo med nesporogene, po Gramu negativne patogene bakterije. Po obliki so spiralno ukrivljene. Gibljivost jim omogočajo spiralno-vijačna oblika ter enopolarni in bipolarni bički (Roberts in sod., 1996). Bakterije so dolge od 0,5 do 5 μm in široke od 0,2 do 0,8 μm . Na gojiščih tvorijo sive, ploščate, okrogle, izbočene kolonije, ki so nepravilnih oblik (Snelling in sod., 2004).

Pomen kampilobakterjev pri boleznih prebavil so zaradi njihovih posebnih rastnih zahtev spoznali pozno. Kljub mikroaerofilnemu metabolizmu so celice občutljive na toksične kisikove radikale in ne prenesejo običajne koncentracije kisika iz atmosfere (Roberts in sod., 1996). Dobro uspevajo samo v atmosferi z manj O_2 (od 5 do 10 %) in z več CO_2 . Poleg tega so tudi termofilni, saj bolje rastejo med 37 in 42 $^{\circ}\text{C}$ (Andlovic, 2002). Občutljivi so na ozmotski stres ter ne prenašajo nizkih vrednosti pH (minimalna vrednost pH, ki še omogoča rast, je 4,9). Minimalna vrednost a_w , pri kateri so še sposobni rasti je, 0,9. Imajo encima oksidaza ter katalaza, nimajo pa lipaze (Park, 2002).



Slika 1: Bakterija rodu *Campylobacter* (Kelly D.J., 2007)

Prenos kampilobakterjev se lahko prepreči z nadzorom proizvodnje, vzdrževanjem higiene, ustreznimi toplotnimi postopki, kloriranjem vode, preprečevanjem vstopa glodalcev ter z ustrežno uporabo sistema HACCP. Ta sistem (ob pravilni izbiri kritičnih kontrolnih točk) izdelkom zagotavlja mikrobiološko neoporečnost in stabilnost ter tako ščiti potrošnika in proizvajalca (van Vliet in Ketley, 2001).

Rod *Campylobacter* sestavlja 14 vrst in 6 podvrst. *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* ter *C. upsaliensis* so najbolj znani povzročitelji bakterijskega gastroenteritisa pri ljudeh. *C. fetus* subsp. *fetus* pa lahko pri imunsko oslabljenih, starejših osebah povzroča sistemske okužbe (Andlovic, 2002).

2 Epidemiologija, patogeneza in zdravljenje bolezni

Kampilobakterji so znani povzročitelji črevesnih bolezni tako pri ljudeh, kot tudi pri živalih. Vir okužb so asimptomatični klicenosci različnih živalskih vrst, bolne živali in ljudje. *C. jejuni* najdemo v črevesju številnih živalskih vrst (perutnina, prašiči, govedo, ovce, ptice, zajci), medtem ko je *C. coli* razširjen predvsem pri prašičih. *C. fetus* subsp. *fetus* se nahaja pri ovcah in govedu. Zbolevnost in umrljivost živali je velika; večina okuženih živali trajno izloča kampilobakterje (Andlovic, 2002).

Najbolj pogost vzrok okužbe s kampilobakterji pri ljudeh je kontaminacija živil med prirejo živali ali klanjem, preko uporabljene kontaminirane opreme ali vode. Kontaminacija se tako iz gastrointestinalnega trakta gostiteljev prenaša in je vzrok pogosto okuženega svežega mesa in mesnih izdelkov (Mehle in sod., 1982).

Te patogene bakterije so povzročiteljice vodne diareje in kolitisa. Bolniki čutijo abdominalno bolečino in imajo povečano telesno temperaturo. Okužbe prebavil s tem mikroorganizmom potekajo kot vodena, v hujši obliki pa kot krvava diareja. Bolj so ogroženi posamezniki s pomanjkanjem želodčne kisline. Infekcija poteka kot kratkotrajna diareja in običajno mine v nekaj dneh (v hujših primerih traja dlje od enega tedna dni) (Andlovic, 2002). Vrsta *C. jejuni* je znana tudi kot potencialna povzročiteljica Guillain-Barrejevega, Miller-Fisherjevega in Reiterjevega sindroma (Ketley, 1997).

Prva faza bakterijske infekcije je naseljevanje mukoznega sloja, ki prekriva črevesne epitelne celice. Najpomembnejši virulentni dejavniki so: gibljivost zaradi eno ali bipolarnih bičkov, adhezivnost, invazivnost, sposobnost znotrajceličnega preživetja ter tvorba toksinov (toplotno občutljivega enterotoksina TL in citotoksina) (Ketley, 1997). Okužbe povzročajo le gibljivi sevi, ki so se sposobni pritrditi na črevesno sluznico (Andlovic, 2002). S hitrim gibanjem bakterijska celica predre mukozni sloj črevesnih celic ter tako poveča možnost vezave in invazivnost celic. Pri iskanju pritrdilnega mesta ter pri prehodu kampilobakterjev v gostiteljsko celico ima ključno vlogo gibljivost in spiralno-vijačna oblika celic (Szymanski in sod., 1995). Zaradi infekcije je površina sluznice v jejunumu, ileumu in kolonu uničena. Sluznica je vneta in infiltrirana z nevrofilci (Andlovic, 2002).

Pri večini bolnikov diareja mine sama po sebi in zadostuje le simptomatično zdravljenje z nadomeščanjem tekočine in elektrolitov. Pri hujši obliki, ki se kaže v povišani telesni temperaturi, krvavi diareji ter s številnimi iztrebljanji, je potrebno zdravljenje z antibiotiki (Andlovic, 2002). Zdravljenje z antibiotiki je potrebno tudi pri pacientih s šibkejšo imunsko odpornostjo. Okužba s kampilobakterji namreč lahko vodi do bakteriemije, ki ima visoko stopnjo smrtnosti (Mamelli in sod., 2003).

Najbolj uporabljene protimikrobne snovi za zdravljenje kampilobakterioz so makrolidi (eritromicin) in fluorokinoloni (ciprofloksacin). Kot alternativni antibiotiki so poznani tetraciklin, doksiciklin ter kloramfenikol. Za zdravljenje resnih sistemskih okužb pa zasledimo uporabo aminoglikozidov, predvsem gentamicina (Ge in sod., 2002).

2 ZDRAVLJENJE BOLEZNI S UPORABO ANTIBIOTIKOV

Antibiotiki so snovi, ki zavirajo razmnoževanje in rast mikroorganizmov in so proizvod živih celic (bakterij in gliv). Kemoterapevtiki so antimikrobna zdravila, ki so izdelana s sintezo ali s kemijsko modifikacijo naravnega antibiotika. Danes v skupino antibiotikov uvrščamo tako antibiotike, ki so naravnega izvora, kot tudi kemoterapevtike. Po učinkih na bakterije so baktericidni in bakteriostatični (Kotnik, 2002).

Glede na njihov mehanizem delovanja jih delimo v štiri skupine (Kotnik, 2002):

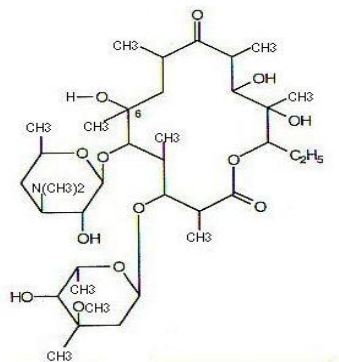
■ preprečujejo sintezo celične stene (penicilini, cefalosporini, glikopeptidi, bacitracin);

- delujejo na sintezo znotrajceličnih beljakovin (aminoglikozidi, tetraciklini, kloramfenikol, makrolidi, linkozamidi, fucidinska kislina);
- vplivajo na sintezo jedrnih kislin (kinoloni, sulfonamidi, trimetoprim, rifampicin, metronidazol);
- ovirajo dejavnosti, povezane s sintezo citoplazemske membrane (polimiksin, amfotericin, nistatin, imidazol)

Antibiotike po njihovem načinu delovanja delimo na koncentracijsko odvisne antibiotike (fluorokinoloni, aminoglikozidi), ter na časovno odvisne antibiotike (betalaktami, makrolidi). Poznamo več skupin antibiotikov. Za zdravljenje kampilobakterioz se uporabljajo: makrolidi, fluorokinoloni ter tetraciklini. Ampicilin in ostali β -laktami se ne priporočajo za zdravljenje infekcij, saj kampilobakterji sintetizirajo in izločajo encime β -laktamaze, ki zelo zmanjšajo bakterijsko občutljivost na to skupino antibiotikov (Corcoran in sod., 2005; Kurinčič in sod., 2005).

1 Makrolidi

Makrolide uvrščamo med zaviralce proteinske sinteze. Po kemijski strukturi so naravni poliketidni produkti sekundarnega metabolizma številnih aktinomicet. Zgrajeni so iz 14, 15 ali 16 členskega laktonskega obroča, na katerega je lahko vezanih tudi več aminosladkornih skupin (Vester in Douthwaite, 2001). V manjših koncentracijah so bakteriostatični, v večjih pa baktericidni (Kotnik, 2002).

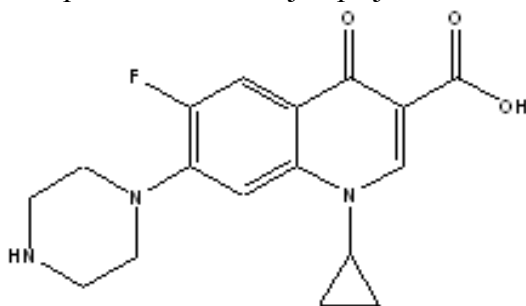


Slika 2: Kemijska struktura eritromicina (Varagić in Milošević, 1999)

Najbolj znana naravno sintetizirana makrolida sta eritromicin in tilosin. Poznamo pa tudi sintetične derivate eritromicina: klaritromicin (6-metoksi derivat eritromicina), telitromicin ter azitromicin. Pri zdravljenju okužb s kampilobakterji se najbolj pogosto uporablja eritromicin, ki se veže na 50S ribosomsko podenoto ter tako inhibira translokacijo v proteinski sintezi (povzroči disociacijo peptidil-tRNA iz ribosoma) (Vester in Douthwaite, 2001). Njegov vnos je peroralen in intravenozen. Po telesu se dobro razporeja in prodira v telesne celice, kjer uspešno ubija znotrajcelične mikrobo. Spekter delovanja eritromicina je zelo širok. Uporablja se tudi pri okužbah z bakterijami *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, klamidijami ter rikecijami (Kotnik, 2002).

2 Fluorokinoloni (kinoloni)

Kinoloni so danes eni najpomembnejših sintetično proizvedenih antibiotikov. Osnovna skupina je nalidiksična kislina (znana od leta 1960). Med ostale pomembnejše kinolone, uvrščamo še: pipemidinsko kislino, ciprofloksacin, ofloksacin, norfloksacin, enrofloksacin, moksifloksacin ter trovafloksacin. Večino kinolonskih derivatov lahko opišemo kot 4-okso-piridin karboksilne kisline z aromatskim ali heteroaromatskim obročem. Tarčni mesti fluorokinolonov sta dva encima. Pri po Gramu negativnih bakterijah je primarni cilj DNA giraza in sekundarni DNA topoizomeraza IV, pri po Gramu pozitivnih bakterijah pa je ravno obratno (Pidcock, 1998).



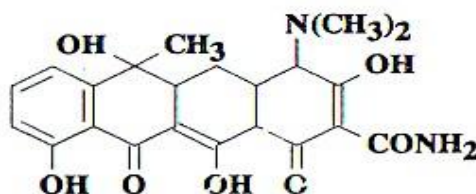
Slika 3: Kemijska struktura ciprofloksacina (Ciprofloksacin, 2007)

Karboksilna skupina na mestu 3 in karbonilna skupina na mestu 4 sta osnovi za protimikrobno delovanje, saj omogočata tvorbo vodikovih vezi z baznimi pari v molekuli DNA. Fluorov atom na mestu 6 kinolonskega skeleta zelo poveča njihov protimikrobni učinek, saj poveča penetracijo v celico kar za 2 do 70 krat (Lukančič in Šolmajer, 1998).

Kinoloni so znani kot zelo učinkoviti antibiotiki proti po Gramu negativnim bakterijam, ki so rezistentne na penicilin, cefalosporine in aminoglikozide. Uporabljajo se tudi pri okužbah z znotrajceličnimi bakterijami (*Chlamydia*, *Rickettsia*, *Mycoplasma*), pri okužbah urinarnega in prebavnega trakta, infekciji dihal, vnetju prostate ter pri antraksu. Imajo torej širok spekter delovanja, dobro absorpcijo in hitro razporeditev v tkivih (Kotnik, 2002).

3 Tetraciklini

Tetracikline poznamo kot široko-spektralne antibiotike, ki jih danes zaradi razširjene bakterijske odpornosti, uporabljamo le omejeno. Nekatere tetracikline (tetraciklin, oksitetraciklin, klortetraciklin) proizvajajo streptomicete, poznamo pa tudi tiste, ki so sintetizirani s pomočjo kemijske modifikacije naravnoproducentov tetraciklinov (demeklociklin, metaciklin, doksiciklin). Med seboj se razlikujejo po kemijski zgradbi (glede na vrsto radikalov, pripetih na 4 šestčlenske obročje). So amfoterne snovi, ki se v vodi slabo topijo (Kotnik, 2002; Varagić in Milošević, 1999).



Slika 4: Strukturna formula tetraciklina (Varagić in Milošević, 1999)

Tetraciklini delujejo bakteriostatično tako, da preprečijo vezavo aminoacil-t-RNA na akceptorsko mesto. Vežejo se na ribosomsko podenoto 30 S ter tako preprečijo beljakovinsko sintezo. Učinkujejo tako na po Gramu negativne in pozitivne bakterije kot tudi na rikecije, mikoplazme, klamidije, spirohete, leptospire in amebe (Varagić in Milošević, 1999).

3 RAZVOJ BAKTERIJSKE ODPORNOSTI NA ANTIBIOTIKE

Danes, po skoraj 60 letih uporabe antibiotikov, ugotavljajo, da nekatere njihove skupine niso več dovolj učinkovite oziroma celo niso več primerne za zdravljenje bakterijskih okužb. Zaradi izpostavljenosti bakterij naravnim in umetno sintetiziranim protimikrobnim substancam so le-te razvile mehanizme za izognitev njihovim inhibitornim učinkom (Schwarz in Chaslus-Dancla, 2001). Po mnenju nekaterih je glavni razlog za povečano odpornost bakterij uporaba antibiotikov v prireji živali, ki so namenjene za prehrano ljudi. Pri nekaterih patogenih mikroorganizmih, kamor spada tudi bakterija rodu *Campylobacter*, imajo pomembno vlogo tudi kemoterapevtiki, ki se uporabljajo v humani medicini (Threlfall in sod., 2000).

Bakterijsko odpornost opisujejo kot fenotipsko ali/in genotipsko značilnost bakterij. Razdelimo jo lahko glede na izvor (naravna ali pridobljena) ali pa glede na tip (enojna, večkratna, navzkrižna odpornost) (Davison in sod., 2000). O naravni (intrinzični) odpornosti bakterij proti antibiotikom govorimo, kadar je vsa bakterijska vrsta odporna na neko skupino antibiotikov. Pridobljeno odpornost bakterij proti antibiotikom imajo, v nasprotju, z naravno samo nekateri sevi neke bakterijske vrste ali rodu. Lahko je posledica mutacije kromosomskega ali plazmidnega gena posamezne bakterijske celice ali pridobitve nove genetske informacije z genskim prenosom (predvsem s konjugacijo ali transformacijo) (Seme, 2002).

Preglednica 1: Različni mehanizmi, ki vplivajo na povečano odpornost bakterij na specifične antibiotike (Varagić in sod., 1999; Seme, 2002)

VRSTA ANTIBIOTIKA	MEHANIZMI POVEČANE ODPORNOSTI
ERITROMICIN	■ aktivnost encima metilaze, ki povzroči konformacijsko spremembo ribosoma in tako zmanjšuje vezavo antibiotika na vezavno mesto ■ prisotnost membranskih proteinskih sistemov, ki izčrpavajo antibiotik iz celice ■ hidroliza antibiotika zaradi delovanja esteraze ■ mutacija na genih, ki kodirajo rRNA
CIPROFLOKSACIN	■ mutacija genov, ki kodirajo bakterijska encima DNA-girazo in topoizomerozo IV
TETRACIKLIN	■ prisotnost proteinskih črpalk, ki z aktivnim transportom izčrpavajo antibiotik iz celice

- sinteza proteina, ki onemogoča vezavo antibiotika na ribosome
- encimska inaktivacija tetraciklina

1 Prevalenca odpornih izolatov

Vrste *Campylobacter coli* in *C. jejuni* danes srečamo kot ene izmed najbolj pogostih povzročitelj črevesnih infekcij pri ljudeh. Število kampilobakterioz vseskozi narašča in v mnogih evropskih državah presega število salmoneloz. V Sloveniji sta prav tako salmoneloza in kampilobakterioza na prvem oziroma na drugem mestu po pogostosti okužb s kontaminirano hrano. Letno poročilo epidemiološkega spremljanja nalezljivih bolezni v Sloveniji navaja, da se je med letoma 1996 in 2000 število kampilobakterioz povečalo iz 53 na 67,3 na 100000 prebivalcev (Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2000). V številnih evropskih državah so okužbe s kampilobakteriji povezane s hrano, saj ocene kažejo, da je več kot 80% okužb ljudi povzročenih z uživanjem kontaminiranih ali premalo temperaturno obdelanih živil. Najpogostejši vzrok za infekcije, ki niso v korelaciji z uživanjem živil, je kontakt s hišnimi živalmi (Solomon in Hoover, 1999).

Kurinčič in sod. (2005) so opravili raziskavo, v kateri so ugotavljali, kako pogosto so kampilobakteriji prisotni v perutninskem mesu. V študijo so vključili 60 različnih vzorcev mesa osmih rejcev perutnine v Sloveniji. Prisotnost termotolerantnih kampilobakterjev so dokazali pri 54 vzorcih piščančjega mesa. Večje število kontaminiranih vzorcev je bilo opaziti zlasti v poletnih in v jesenskih mesecih, medtem ko je bilo spomladi in pozimi kontaminiranih vzorcev manj (Zorman in sod., 2002 in 2004). Podobno so poročali iz ZDA, Velike Britanije in Italije, medtem ko v skandinavskih državah v perutninskem mesu niso dokazali tako pogoste prisotnosti kampilobakterjev (Federighi in sod., 1999; Lilja in sod., 2001). Poleg ugotavljanja prisotnosti kampilobakterjev v vzorcih perutninskega mesa so Kurinčič in sod. (2005) opravili še fenotipsko in genotipsko identifikacijo termotolerantnih kampilobakterjev iz piščančjega mesa. Iz vzorcev mesa so po priporočilih standarda ISO 10272 izolirali preko 220 termotolerantnih sevov kampilobakterjev. V nadaljnjo identifikacijo in študijo odpornosti proti antibiotikom so uvrstili 55 izolatov, izmed katerih jih je bilo 29 identificiranih kot *C. coli*, 26 pa kot *C. jejuni*. Izolatoma so nato določili odpornost (občutljivost) na različne protimikrobne snovi. Na tetraciklin je bilo odpornih 7 izmed 55 analiziranih izolatov. Zanimiv je tudi podatek, da so bili na tetraciklin odporni predvsem sevi vrste *C. coli*. Izolati so bili v velikem odstotku odporni tudi na pefloksacin ter na ciprofloksacin. Izolati vrste *C. coli* so bili pogostejše odporni od vrste *C. jejuni*. To se je pokazalo predvsem pri ciprofloksacinu, pefloksacinu ter tetraciklinu. Od analiziranih izolatov ni bil noben izmed njih odporen na amoksiciklin ter na gentamicin, redkeje pa se je pokazala odpornost na ampicilin (odporen 1 od 55 testiranih izolatov) ter na eritromicin (8 od 55 izolatov).

Obsežno raziskavo so naredili tudi Gallay in sod. (2007), saj so na protimikrobne agense testirali humane, piščančje in prašičje izolate kampilobakterjev in dobljene rezultate primerjali z rezultati iz preteklih let. Tako so naredili primerjavo, ali se je občutljivost izolatov na izbran antibiotik s časom kaj bistveno spremenila. Testirali so več kot 5000 humanih izolatov, ki jih je med letoma 2002 in 2004 prispeval CNRCH. Izmed njih je bilo največ *C. jejuni* (77 %), *C. coli* je bilo 17 %, *C. fetus* 5 %, *C. lari* pa 1 %. Povprečna starost bolnikov, ki so zboleli za kampilobakteriozo je bila 29 let, med njimi je bilo več moških kakor pa žensk. Najbolj rizični skupini so bili otroci do 5 leta starosti (30 % izmed vseh bolnikov) in ljudje, starejši od 65 let (15 %). Avtorji študije ugotavljajo, da se je odpornost humanih kampilobakterjev na antibiotike od leta 1990 do leta 2004 spremenila. Odpornost na nalidiksično kislino se je povečala z 8 % na 26 %, pogostejše pa so bili odporni

izolati vrste *C. coli*. Prav tako se je povečal delež odpornih sevov na tetraciklin, delež odpornih na eritromicin je ostal nizek, na ampicilin pa se je celo znižal (z 49 % na 42 % testiranih izolatov). Avtorji so naredili analizo tudi za živilske in živalske izolate v Franciji med letoma 1999 in 2004. Prišli so do ugotovitve, da so kampilobakterji, katerih vir je bilo perutninsko in prašičje meso, ostali občutljivi na ampicilin. Omenjajo, da so bili na tetraciklin odporni izolati tako prašičjega, kot tudi piščančjega izvora. Vsi izolati so bili občutljivi na gentamicin, medtem ko so na eritromicin kazali odpornost samo izolati *C. coli* (21 % izmed testiranih piščančjih izolatov in 59 % izmed prašičjih izolatov). Pri izolatih, katerih vir so bili piščanci, so bile bakterije vrste *C. coli* pogostejše odporne na ciprofloksacin, kot pa bakterije *C. jejuni*. Pri prašičjih izolatih se je povečal delež odpornih sevov *C. coli* na ciprofloksacin. Občutljivost piščančjih izolatov na nalidiksično kislino in ciprofloksacin se ni spremenila niti pri izolatih *C. jejuni*, niti pri *C. coli*.

Payot in sod. (2004) so v letih 1998 in 1999 ugotavljali pogostost prisotnosti kampilobakterjev v prašičjem mesu. V raziskavo so vključili 240 vzorcev prašičjega mesa iz 24 različnih francoskih kmetij. Izkazalo se je, da kontaminacija s kampilobakterji ni bila prisotna le na štirih kmetijah. Izoliranim izolatom so določili odpornost na pet različnih antibiotikov. Največja odpornost izolatov je bila na tetraciklin in eritromicin, saj se bilo na njiju odpornih 79 oziroma 55 % izolatov. Pri odpornosti na eritromicin avtorji študije navajajo, da je imelo vrednost MIC večjo od koncentracije antibiotika 256 µg/ml manj kot 10 % izolatov. Večina izolatov je imela vrednost MIC določeno med koncentracijama 8 in 16 µg/ml. Nekoliko manjša odpornost je bila določena na nalidiksično kislino in ampicilin. Izolati pa so bili najmanj odporni na enrofloksacin, saj je bilo nanj odpornih 15 % izoliranih izolatov. MDR so raziskovalci določili pri več kot eni tretjini izmed vseh izolatov, ki so bili vključeni v raziskavo. Avtorji v svojem poročilu navajajo tudi, da so bili vsi izolirani izolati identificirani kot *Campylobacter coli*.

2 Mehanizmi odpornosti bakterije *Campylobacter* spp.

Na osnovi MIC, so Payot in sodelavci (2003) določili razrede občutljivosti za bakterije *Campylobacter* spp. Glede na njihovo odpornost, so jih razvrstili v tri skupine: S (vrednost MIC ≤ 1 do 4 mg/l), LLR (vrednost MIC = 4-16 mg/l) in HLR (vrednost MIC ≥ 16 mg/l). Canillac in Mourey (2001) sta vrednost MIC definirala kot najmanjšo koncentracijo snovi, ki popolnoma prepreči razmnoževanje izbranega mikroorganizma za vsaj 48 ur. V literaturi srečamo tudi izraz minimalna bakteriocidna koncentracija (MBC). To sta ista avtorja opisala kot koncentracijo izbrane snovi, ki ubije 99,9 % ali več začetnega števila mikrobnih celic v inokulumu. Raziskave zadnjih let kažejo, da je odpornost kampilobakterjev posledica točkovnih mutacij ter prisotnosti izlivnih membranskih črpalk (transportnih membranskih proteinov) (Mamelli in sod., 2005).

1 Povečana bakterijska odpornost zaradi mutacij

Mamelli in sod. (2005) so pri svoji raziskavi prišli do sklepa, da na povečano odpornost na makrolide in ketolide vpliva mutacija na genih, ki kodirajo rRNA. Pri visoko odpornih izolatih so ugotovili mutacijo na mestu 2075 gena *23S rRNA*. Določili so dve spremembi v položaju dušikovih baz (tranziciji), in sicer: A2075G in A2075T (ekvivalentno mestoma 2058 in 2059 v *E. coli*). Eden izmed analiziranih izolatov je bil celo dvojni mutant, saj je imel poleg spremembe na mestu 2075 tudi spremembo (mutacijo) na 2074. mestu (A2074C). Pri občutljivih izolatih (z nižjo vrednostjo MIC) ni bilo tranzicij na nobenem mestu. To dokazuje, da ta mutacija pomembno vpliva na povečano bakterijsko odpornost. Do podobnih zaključkov so prišli tudi Corcoran in sod. (2006) ter Payot in sod. (2004), saj so ugotovili, da je mutacija na genu *23S rRNA* prisotna le pri

izolatih z največjo vrednostjo MIC. Gibreel in sod. (2005) v poročilu svoje raziskave navajajo, da so podoben mehanizem določili tudi pri drugih bakterijskih vrstah, kot so: *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae* in *Helicobacter pylori*.

Podobno kaže študija, ki so jo objavili Payot in sodelavci (2004). Poleg mutacije, ki poveča odpornost proti makrolidom, so določili tudi mutacijo, zaradi katere se kampilobakterjem poveča odpornost proti fluorokinolonom. V svoj poizkus so vključili 38 izolatov *Campylobacter coli*. Za detekcijo mutacije na genih *23S rRNA* so uporabili metodi MAMA-PCR in PCR-RFLP. Ugotovili so, da na povečano odpornost proti fluorokinolonom vpliva mutacija na 256. mestu gena *GyrA*, kjer je bila dušikova baza citozin zamenjana s timinom (C256T). Zaradi tega je prišlo do aminokislinske modifikacije na girazi (Thr86Ile). To mutacijo so potrdili v 34 analiziranih vzorcih, tudi v tistih, ki so imeli nižjo vrednostjo MIC (med 4 in 32 mg/l). V svoji študiji omenjajo tudi mutacijo v genih *23S rRNA* (A2075G), ki so jo potrdili pri visoko odpornih izolatih. Izmed 38 analiziranih so jo dokazali pri 9 izolatih. Njihova odpornost proti makrolidom (eritromicin) je bila od 256 pa do 512 mg/l. Tako so dokazali, da je točkovna mutacija v genih *23S rRNA* bistven razlog za povečano odpornost proti makrolidom, saj pri izolatih S in pri LLR izolatih ni bila prisotna. Gibreel in sod. (2005) so ugotovili, da imajo bakterije, odporne na tetracikline, v svoj plazmid vključen gen *tet(O)*.

Corcoran in sod. (2005) so želeli ugotoviti, ali točkovna mutacija na proteinih L4 in L22, ki se nahajata na ribosomski podenoti 50 S, tudi prispeva k povečani odpornosti kampilobakterjev na makrolide (eritromicin). Ta mutacija namreč pri nekaterih ostalih bakterijskih vrstah, kot so *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* in *Streptococcus pyogenes* povzroči povečano odpornost na to skupino antibiotikov. V svojo raziskavo so vključili 18 izbranih izolatov *Campylobacter coli* in *C. jejuni* iz različnih virov. Ugotovili so prisotnost mutacij, tako pri HLR izolatih, kot tudi pri S izolatih. Zanimiva je bila tudi ugotovitev, da pri visoko odpornem izolatu *C. jejuni* (vrednost MIC večja od 256 µg/ml) te mutacije niso določili. Tako so dokazali, da ta vrsta mutacije ne prispeva k povečani rezistenci kampilobakterjev na makrolide, četudi je znano, da imajo nekatere ostale bakterijske vrste zaradi nje povečano odpornost.

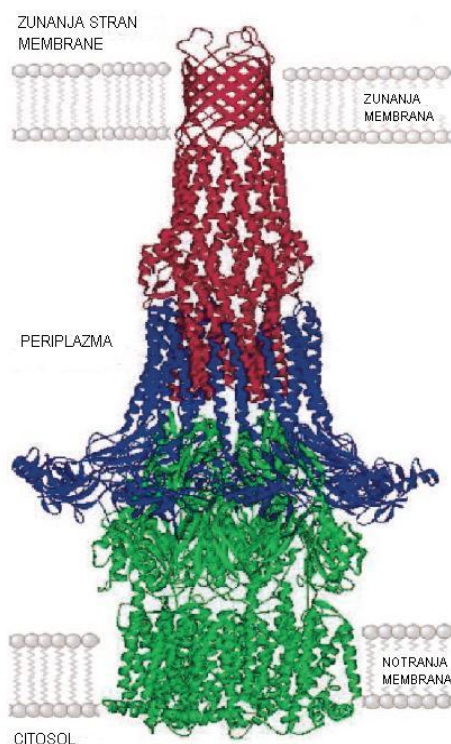
2 Povečana odpornost zaradi prisotnosti membranskih izlivnih črpalk

Prisotnost membranskega izlivnega sistema je dokazana v vseh oblikah živih celic. Zanj je značilno, da sodeluje pri različnih detoksifikacijskih procesih, saj bakterijam omogoča izločanje toksičnih snovi kot so antibiotiki, antiseptiki ter protimikrobni proteini. V literaturi za ta mehanizem pogosto srečamo še izraza »sistem transportnih proteinov« in »efluksne črpalke«. Membranske izlivne črpalke so ene izmed najpomembnejših komponent v bakterijski celični steni, saj na primer kar 15 do 20 % genoma *E. coli* kodira zapise za njihovo sintezo. Prepoznavanje in izločanje za celico strukturno nesorodnih snovi povzroči zmanjšano koncentracijo (in posredno tudi manjšo učinkovitost) snovi, ki zavirajo celično rast in njeno razmnoževanje (delitev). Danes je znano, da membranske izlivne črpalke igrajo pomembno vlogo tudi pri neučinkovitem zdravljenju rakavih obolenj, saj s svojim transportnim sistemom omogočajo rakavim celicam večjo odpornost pri kemoterapiji. Ta mehanizem je bil prvič pisno omenjen v začetku osemdesetih let 20. stoletja, ko se ga je povezovalo z neučinkovitim zdravljenjem s tetraciklini. Ugotovili so, da rezistenco na to skupino antibiotikov številnim (po Gramu negativnim) bakterijam omogoča transportni protein TetB, ki je kodiran na transpozonu *Tn10*. Aktivnost membranskih izlivnih črpalk so opisali pri številnih klinično pomembnih bakterijskih vrstah *Escherichia coli* (AcrAB, AcrB, EmrE), *Pseudomonas aeruginosa*

(MexAB-OprM), *Staphylococcus aureus* (QacA), *Vibrio parahaemolyticus* (NorM) ter tudi pri rodu *Campylobacter* (CmeABC) (Lin in sod., 2002; Zloh in sod., 2003; Pages in sod., 2005; Kaatz, 2006; Ge in sod., 2005).

Pri kampilobakterijih so vlogo membranskih izlivnih črpalk in efluksa kot mehanizma večkratne odpornosti leta 1995 prvič omenili Charvalos in sod. Pumbwe in Piddockova (2002) sta kot prvi identificirali in tudi molekularno okarakterizirali gen *cmeB* bakterijskega genoma *C. jejuni* in določili delovanje membransko-izlivnega proteina, ki izrazito pripomore k intrinzični odpornosti bakterij *C. jejuni* proti antibiotikom. Izražanje genov izlivnih membranskih črpalk je kontrolirano z regulatornim proteinom. Odpornost je povezana s povečanim izražanjem teh genov, ki izvira iz mutacij znotraj represijskih genov. Mehanizem izlivno-membranskih proteinov lahko učinkuje tudi sinergistično z ostalimi mehanizmi, ki povečajo odpornost (točkovne mutacije). Tako se zelo izrazi fenotip za odpornost na številne protimikrobne snovi (MDR) (Lin in sod., 2002). Prekomerno izražanje genov, ki kodirajo proteine membransko izlivnega sistema, pogosto ne da visoke stopnje klinično pomembne rezistence na antibiotike. Vseeno pa bakteriji omogoča, da tako lažje preživi učinkovanje protimikrobnih substanc in razvije nadaljnje mutacije v genih, ki so pomembni za tarčna mesta na antibiotikih (Webber in Piddock, 2003).

Ge in sod. (2005) so pri kampilobakterijih identificirali 10 različnih genov, ki kodirajo informacije za sintezo membranskih izlivnih črpalk. Membransko izlivni sistem (CmeABC) je glavni (največji) membransko izlivni sistem pri kampilobakterijih. Sestavljen iz treh glavnih komponent, ki se med seboj razlikujejo tako po velikosti, kot tudi po funkcijah, ki jih opravljajo. Največji izmed njih je notranjo-membranski transportni protein (CmeB), gen, ki ga kodira *Cj0366c* je velik 3123 bp. Drugi po velikosti je protein na zunanji membrani (CmeC), katerega kodira gen *Cj0365c*, ki obsega 1479 bp. Najmanjši je periplazemski fuzijski protein (CmeA), kodiran je na genu *Cj0367c* velikosti 1104 bp, ki za svoje delovanje potrebuje energijo iz ATP.



Slika 5: Model tridelne membranske izlivne črpalke, kjer rdeča barva označuje protein na zunanji membrani (CmeC), zelena notranje-membranski transportni, modra periplazemski fuzijski protein (CmeA).

protein (CmeB), modra pa periplazemski fuzijski protein (CmeA) (Piddock, 2006)

Lin in Martinez (2006) sta z analizo celotnega genoma *C. jejuni* ugotovila, da ima ta bakterijska vrsta 13 različnih membranskih sistemov, ki bi jih lahko uvrstili v skupino membransko izlivnih črpalk. Ti sistemi bakterijam omogočajo izločanje raznolikih kemijskih snovi. Poleg črpalke CmeABC avtorja omenjata podobno črpalko CmeDEF, za katero pa sta nista ugotovila ali ta črpalka poveča bakterijsko odpornost na protimikrobne snovi.

1 Vpliv inhibicije membranskih izlivnih črpalk na odpornost sevov (MIC)

Mamelli in sod. (2003) so prvi ugotavljali, koliko prisotnost membranskih izlivnih črpalk pri različnih izolatih *Campylobacter coli* in *C. jejuni* (z rezistenčnim fenotipom) poveča bakterijsko odpornost. MIC so določili z dilucijsko metodo v agarju, kot inhibitor črpalk pa so uporabili PAβN. Inhibitor membranskih izlivnih črpalk so dodali zato, da bi ugotovili, koliko se zaradi njegove prisotnosti poveča občutljivost bakterij na antibiotike. Pri vseh izolatih so vrednosti MIC določili dvakrat - brez in z dodatkom PAβN. Rezultati so pokazali, da se je vrednost MIC ob dodatku inhibitorja zmanjšala predvsem pri dodatku makrolidov (eritromicin in klaritromicin), pri dodatku fluorokinolonov pa se ni občutno zmanjšala. Tako so prišli do sklepa, da uporabljeni inhibitor vpliva na inhibicijo membranskih izlivnih črpalk, ki so zadolžene za črpanje makrolidov iz celice.

Podobno raziskavo so opravili tudi Payot in sod. (2004). V analizi so uporabili 38 izolatov *C. coli* različnih odpornosti na makrolide (uporabili so eritromicin). Vrednost MIC so določali brez in z dodatkom inhibitorja PAβN. Učinek inhibitorja se je pokazal tako pri občutljivih, kot tudi pri odpornih izolatih. Največji učinek je inhibitor povzročil pri S (MIC ≤ 4 mg/l) in LLR (MIC med 4 in 16 mg/l). Pri njih se je vrednost MIC zmanjšala za 16 do 32-krat. Pri izolatih, ki so imeli vrednost MIC večjo od 256, inhibitor ni bil tako učinkovit. Vrednost MIC se je namreč zmanjšala le za 2 do 4-krat. Istim izolatom (uporabili so tudi PAβN) so določili vrednost MIC tudi za fluorokinolone (enrofloksacin). Pri učinkovanju na fluorokinolone je inhibitor deloval na vse tipe izolatov. Vrednost MIC je bil tu precej nižji, kar kaže na to, da so bili analizirani izolati precej manj odporni na fluorokinolone (maksimalna MIC je bila 32 mg/l). Ob dodatku PAβN pa se je vrednost MIC zmanjšala za faktorja 2 in 4. Zaključki avtorjev so bili, da imajo analizirani izolati precej večjo odpornost na makrolide kot pa na fluorokinolone. Uporabljeni inhibitor (ki poveča občutljivost številnim po Gramu negativnim bakterijam), ima precej večji učinek pri uporabi makrolidov, kar nam pove, da inhibira delovanje membranskih izlivnih črpalk, namenjene za črpanje makrolidov iz celice. Do enakih zaključkov so prišli tudi Corcoran in sod. (2006), ki so inhibitor PAβN testirali pri vrstah *Campylobacter coli* in *C. jejuni*.

Ge in sod., 2005 pa so za razliko od prejšnjih avtorjev za inhibicijo membranskih izlivnih črpalk uporabili insercijsko inaktivacijo in mutagenozo genov, ki nosijo informacije za sintezo membranskih izlivnih črpalk. Po inaktivaciji gena, ki je kodiral sintezo proteina CmeB, se je občutljivost bakterijskih celic na različne antibiotike (kloramfenikol, ciprofloksacin, eritromicin, tetraciklin) povečala od 4 do 256-krat. Najbolj se je občutljivost povečala na eritromicin, kar pomeni, da je ta protein v največji meri omogočal celici izčrpavanje tega antibiotika.

2 Inhibitorji membransko izlivnih črpalk

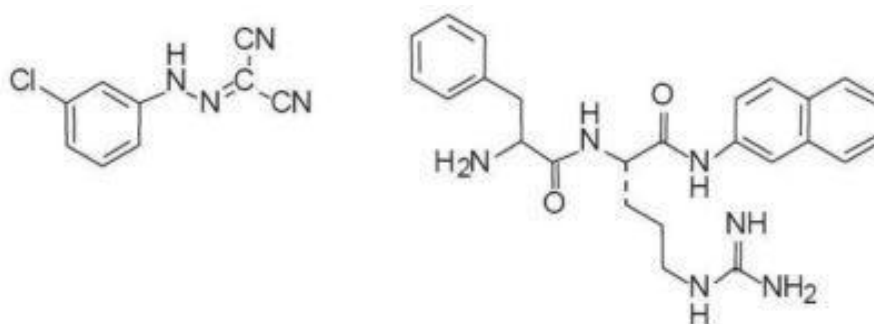
Pagès in sod. (2005) v svoji študiji objavljajo, da nekatere kemijske snovi inhibirajo delovanje membransko izlivnih črpalk številnih bakterijskih vrst. Kot najbolj učinkovite inhibitorje navajajo:

- Fenilalanilarginin β -naftilamid (PA β N);
- Karbonil cianid m-klorofenilhidrazon (CCCP);
- 1-(1-naftilmetil)-piperazin (NMP);
- Različne derivate kinolonov.

Te snovi na različne načine blokirajo delovanje in aktivnost membransko izlivnih črpalk. Na črpalke vplivajo na tri načine (Pagès in sod., 2005):

- Mehansko poškodujejo membranski (beljakovinski) kanal;
- Tekmujejo za vezavno mesto na zunanjem delu membranske črpalke in tako omogočajo prehod antimikrobnih snovi v celico;
- Onemogočajo delovanje energijskega sistema, ki zagotavlja membranskim črpalkam energijo za svoje delovanje.

Inhibicija delovanja bakterijskih izlivnih črpalk je zelo pomemben dejavnik za zmanjšanje bakterijske odpornosti na protimikrobne snovi. Te molekule občutno povečajo znotrajcelično akumulacijo različnih snovi (kinolonov, kloramfenikola, makrolidov), ki so sicer na ta transportni mehanizem občutljivi.



Slika 6: Kemijski strukturni formuli inhibitorjev membranskih izlivnih črpalk CCCP (levo) in PA β N (desno) (Pagès, 2005)

Inhibitor PA β N je bil prvič testiran na bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*, podoben učinek pa ima tudi na ostale po Gramu negativne bakterije, tudi na rod *Campylobacter*. Payot in sod. (2004) so testirali različne koncentracije (10, 20, 40, 60 ter 120 mg/l) inhibitorja PA β N. Ugotovili so, da je najbolj optimalna koncentracija za povečanje občutljivosti 40 mg/l.

Zaradi delovanja PA β N, postanejo bakterijske membranske črpalke neaktivne in tako bakterije dovezetnejše za protimikrobne snovi v svoji okolici.

Quinn in sod. (2006) navajajo, da danes v humani in veterinarski medicini še ni dovoljena uporaba zdravil, ki bi vsebovala inhibitorje membranskih črpalk. Njihovi stranski učinki namreč še niso povsem pojasnjeni. Vendar pa avtorji ugotavljajo, da bo verjetno kmalu prišlo do razvoja kemijskih učinkovin, ki bi imele dodane inhibitorje membranskih črpalk. Ti bi verjetno pripeljali do učinkovitejšega zdravljenja bakterijskih okužb (tudi kampilobakterioz) z makrolidi, tetraciklini in fluorokinoloni.

4 METODE UGOTAVLJANJA ODPORNOSTI BAKTERIJ RODU *CAMPYLOBACTER* NA ANTIBIOTIKE

1 Klasične fenotipske metode ugotavljanja občutljivosti na antibiotike

Luber in sod. (2003) navajajo, da trenutno še ni standardiziranih kriterijev, po katerih bi ugotavljali občutljivost bakterij rodu *Campylobacter* na različne protimikrobne snovi. Tako se uporabljajo različne razredčevalne metode v bujonu in agarju, metoda difuzije v agarju z diski ter E-test.

Izbira metode je odvisna od njene občutljivosti, enostavnosti, fleksibilnosti ter ponovljivosti. Najbolj pogosto zasledimo uporabo dilucijskih metod v agarju in bujonu. Ge in sod. (2002) so opravili primerjavo rezultatov E-testa in dilucijske metode v agarju za različne izolate rodu *Campylobacter*. Rezultati so pokazali, da je prišlo z uporabo E-testa do manjših vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij tudi za 2-krat.

2 Dilucijske metode

Znotraj teh metod razlikujemo dilucijsko metodo v agarju (protimikrobno snov razredčimo na trdnem gojišču) ter dilucijsko metodo v bujonu (razredčitev opravimo v tekočem gojišču). Dilucijska metoda v agarju je standardizirana in zanesljiva tehnika, ki se velikokrat uporablja kot referenčna metoda. Njena največja slabost je velika poraba materiala in časa (Woods in Washington, 1999). Metodo se izvaja tako, da se v agar vključi različne razredčitve protimikrobne snovi in nanese kapljico bakterijske suspenzije na površino agarja. Testiranje bakterij rodu *Campylobacter* poteka v mikroaerofilnih pogojih na trdnem krvnem gojišču (najpogosteje se uporablja gojišče Mueller-Hinton agar z dodatkom 5 % konjske ali ovčje krvi). Prednosti te metode so: sočasno testiranje velikega števila izolatov in pridobitev rezultatov za bakterije, ki ne rastejo dobro v tekočem gojišču (Woods in Washington, 1999; Jorgensen in Ferraro, 1998).

Ko govorimo o dilucijski metodi v bujonu, mislimo bodisi na makrodilucijsko, bodisi na mikrodilucijsko metodo. Makrodilucijska metoda (metoda razredčevanja v epruvetah) vključuje pripravo serijskih razredčitev protimikrobne snovi v tekočem mediju (končni volumen znaša 1-2 ml na epruveto). Prva faza je inokulacija medija s standardizirano bakterijsko suspenzijo. Sledi inkubacija, ki poteka v mikroaerofilnih pogojih. Po inkubaciji se kvantitativno določi koncentracijo protimikrobne snovi, ki še inhibira rast mikroorganizmov - MIC. Negativne strani te metode so v dolgotrajni ročni pripravi protimikrobne snovi za vsak test posebej, v porabi velike količine reagentov ter v veliki verjetnosti, da bi pri pripravi medija in ustreznih koncentracij protimikrobnih snovi prišlo do napak (Jorgensen in Ferraro, 1998).

Luber in sod. (2003) se v literaturi pojavljajo kot prvi, ki so za ugotavljanje občutljivosti bakterij *Campylobacter coli* in *C. jejuni* standardizirali mikrodilucijsko metodo. Tudi pri tej metodi se naredi ustrezne razredčitve protimikrobne snovi v gojišče, le da se namesto epruvet uporabljajo mikrotiterske plošče. Razlika z makrodilucijsko metodo se kaže tudi v uporabi manjšega volumna, tako gojišča, kot tudi reagentov (maksimalen volumen je do nekaj sto μ l). Po končani inkubaciji se učinek protimikrobnega agensa ugotavlja posredno, preko merjenja fizikalno-kemijskih lastnosti, kot so: absorbanca oziroma optična gostota, ki temelji na merjenju motnosti, fluorescenca ali luminiscenca. Prednosti te metode so boljša ekonomičnost (manjša poraba reagentov, gojišč), manjša poraba časa (oziroma večje število opravljenih analiz v primerjavi z makrodilucijsko metodo), dobra ponovljivost ter možnost avtomatizacije metode (Luber in sod., 2003).



Slika 7: Mikrotiterska ploščica

Mikrotiterska ploščica ima 96 luknjic, v katere se dodajajo posamezni reagenti in bakterijska kultura. Omogočajo, da pri posameznem poizkusu testiramo večje število različnih koncentracij protimikrobnih snovi.

3 Genetske metode za ugotavljanje povečane odpornosti na antibiotike

Vacher in sod. (2002) navajajo, da se za določanje rezistentnega fenotipa pri kampilobakterijah najpogosteje uporablja pomnoževanje tarčnih sekvenc DNA z metodo PCR. Poleg te metode se za odkrivanje odpornosti na protimikrobne snovi uporabljajo tudi: sekveniranje tarčnih genov, hibridizacija s sekvenčno specifičnimi oligonukleotidnimi sondami, PCR-SSCP ter PCR-RFLP. Za odkrivanje mutacij na kodonu 86 gena giraze, ki je vzrok bakterijske odpornosti na fluorokinolone, pa so v zadnjem času vpeljali metodo MAMA-PCR in PCR v realnem času (Zirnstein in sod., 1999; Cockerill, 1999; Aarts in sod., 2001; Fluit in sod., 2001).

1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je metoda, s katero je mogoče v nekaj urah *in vitro* pomnožiti fragment DNA do 10^6 in tako na enostaven način pridobiti dovolj veliko število molekul DNA s prilagojenimi konci za subkloniranje v pravilnem bralnem okvirju določenega ekspresijskega vektorja, za sekvenčno analizo in tudi za neposredno določanje mutacij. To je elegantna metoda za odkrivanje neizražene heterologne genetske informacije tako v prokariontskih kot tudi v

evkariontskih celicah. Poznati moramo začetno in končno sekvenco kloniranega fragmenta, da lahko sintetiziramo dva oligonukleotidna začetnika, ki se bosta prilegala nasprotnima koncema 3' dvojne vijačnice (Gasparič in Komel, 1996).

Osnovne stopnje, ki so vključene v preiskavo vzorca s PCR so: priprava DNA, priprava in izvedba PCR ter ugotavljanje (detekcija) pomnožkov. Za *in vitro* pomnožitev dela tarčne molekule DNA se uporablja encim DNA-polimeraza, ki ima optimalno temperaturo 72°C. Encim ohranja svojo aktivnost tudi, če je krajši čas izpostavljen višjim temperaturam, ki so potrebne za denaturacijo dvoverižne molekule DNA. Pomemben je tudi termostaat, ki zagotavlja zvezno spreminjanje temperature v ciklu, ki zajema tri faze (Smole Možina in sod., 2002):

- denaturacija (razdvajanje) dvoverižne DNA (95 °C, 30 s)
- prileganje oligonukleotidnih začetnikov (55-72 °C, 5-60 s)
- podaljševanje (72 °C, 60 s)

V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji. Tako v 30-40 ciklih lahko na ta način iz ene same molekule v nekaj urah namnožimo dovolj DNA, da jo po gelski elektroforezi in ustreznem obarvanju opazimo. Velikost pomnožkov PCR ugotovimo tako, da njihovo velikost (po obarvanju) primerjamo z molekularnim označevalcem z znanimi velikostmi fragmentov (Gasparič in Komel, 1996).

Prednosti ugotavljanja in identifikacije mikroorganizmov s PCR v primerjavi s klasičnimi mikrobiološkimi (gojitvenimi) so boljša specifičnost in občutljivost. Glavne omejitve pri ugotavljanju mikroorganizmov s PCR so (Smole Možina in sod., 2002):

- občutljivost metode PCR: za samo encimsko reakcijo pomnožitve dela DNA je teoretično dovolj ena bakterijska celica oziroma ena molekula DNA, praktično pa precej večja koncentracija, zato je ugotavljanje, brez posebne priprave vzorca nemogoče. Tako se uporabljajo različne obogatitve vzorca ali različne tehnike koncentriranja celic iz vzorcev (na primer: imunomagnetna ločitev bakterijskih celic);
- inhibicija PCR: zaradi nje lahko pride do lažno negativnih rezultatov, ki je posledica neustreznih razmer pomnoževanja oziroma inhibicije polimerazne reakcije. V primeru kontaminacije s tujo DNA pa lahko pride do lažno pozitivnih rezultatov;
- problem mrtvih in živih celic: v PCR se pomnoži specifičen del DNA, neodvisno od tega ali je bila DNA pripravljena iz živih ali iz mrtvih bakterijskih celic (obstaja torej možnost lažno pozitivnih rezultatov). Temu se lahko izognemo z obogatitvijo vzorca pred pripravo DNA ali pa z izolacijo mRNA.

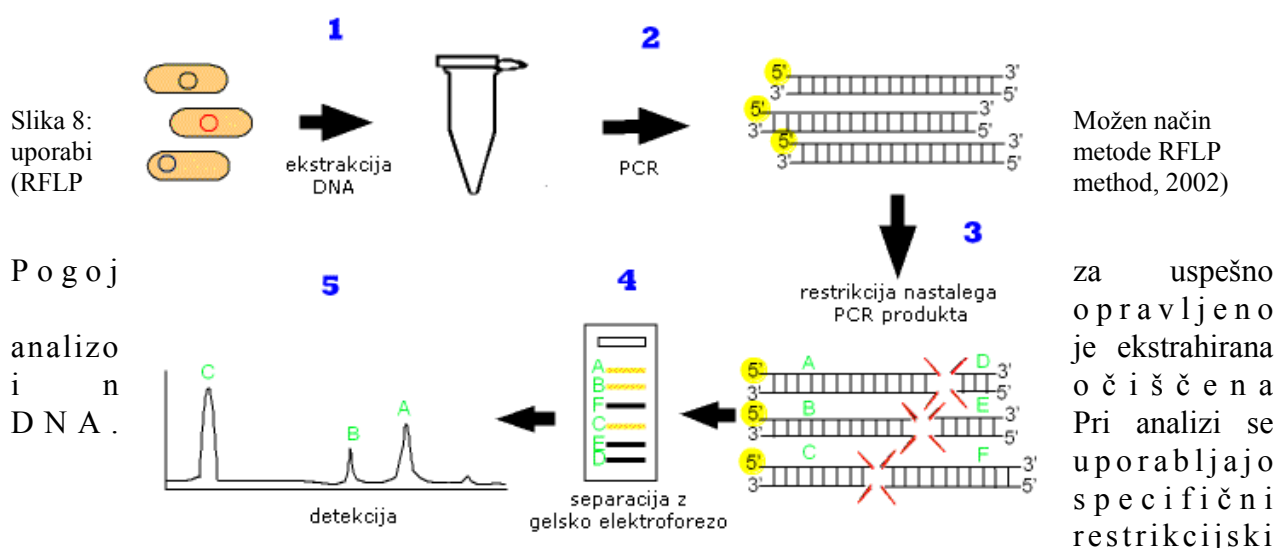
Obsežno raziskavo so naredili Vacher in sod. (2002), ki so z metodo PCR analizirali prisotnost točkovnih mutacij pri različnih izolatih kampilobakterjev, ki so bili odporni na makrolide. Za poizkus so pripravili dvojne vrste različnih oligonukleotidnih začetnikov (primerjev). Reakcijska mešanica je vsebovala še dNTP, MgCl₂, polimerazo ter izolirane molekule DNA. Poizkus so vodili pri pogojih:

- 1. faza: 94 °C, 5 minut – inkubacija (1 cikel)
- 2. faza: 94 °C, 30 s – denaturacija; 55 °C, 30 s - prileganje in 72 °C, 30 s – podaljševanje (35 ciklov)
- 3. faza: 72 °C, 7 minut – podaljševanje verige (1 cikel)

Rezultati so pokazali prisotnost mutacij na mestih 2074 in 2075 genov *23S rRNA*. Dokazali so tudi specifičnost začetnih oligonukleotidov, saj so iste uporabili tudi pri drugih bakterijskih vrstah (*E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Helicobacter felis*, *H. hepaticus*, *H. muridarum* ter *H. pullorum*), kjer pa do pomnoževanja ni prišlo.

2 Restriksijska analiza in študij polimorfizma restriksijskih fragmentov (RFLP)

V molekularni biologiji in mikrobiologiji izraz RFLP srečamo v dveh kontekstih. In sicer: za karakterizacijo molekul DNA in kot laboratorijsko tehniko, ki omogoča medsebojno primerjavo molekul DNA.



encimi, ki tarčno molekulo razrežejo na specifičnih zaporedjih in omogočijo nastanek restriksijskih fragmentov. Mesta, ki jih prepoznavajo encimi, lahko obsegajo štiri, šest, osem, deset ali dvanajst baznih parov. V genski tehnologiji se uporabljajo številni restriksijski encimi (RFLP method..., 2007; Gasparič in Komel, 1996). V našem primeru smo uporabili encim BsmAI, ker ima v pomnožku mutiranega gena dve restriksijski mesti, v pomnožku nemutiranega pa le enega.

Restriksijski fragmenti so na koncu ločeni glede na njihovo velikost z uporabo agarozne gelske elektroforeze. Fragmente lahko napravimo vidne tako, da jih obarvamo v raztopini etidijevega bromida in agarozni gel nato slikamo pod UV-svetlobo (RFLP method..., 2007).

2.4.3.3 Gelska elektroforeza

Uvrščamo jo med separacijske tehnike, kjer se električno nabite molekule ločujejo po hitrosti potovanja v električnem polju. Glavna sila, ki deluje na električno nabite delce (anione, katione) je sila trenja. Pojavljajo pa se še drugi zaviralni elektrostatični učinki medija v katerem elektroforeza poteka. Pomembno vlogo ima raztopina pufra, v kateri je vzorec raztopljen in s katero je nasičen tudi nosilni medij, da drži vzorec v konstantnem ionizacijskem stanju. Puffer služi za raztapljanje vzorca in ne sme reagirati s komponentami, ki jih ločujemo. Najpogosteje se uporabljajo formatni, acetatni, citratni, fosfatni in barbituratni pufri. Poleg pufra na hitrost potovanja molekul vplivajo še velikost naboja molekul, električno polje (hitrost, s katero se ion giblje, je sorazmerna napetosti med elektrodama in obratno sorazmerna z razdaljo med njima) ter nosilec (najpogosteje se uporabljajo škrobni, agarozni ter poliakrilamidni geli). Velikost por v agaroznem gelu

spreminjamo s koncentracijo agarja, v poliakrilamidnem gelu pa s spreminjanjem razmerja med akrilamidnim monomerom in reagentom za zamreženje (Kregar, 1996).

Aparatura, ki se uporablja pri gelski elektroforezi, je sestavljena iz dveh osnovnih enot: usmernika (daje stabiliziran istosmerni tok določene napetosti) ter elektroforezne enote (posoda, v kateri so elektrode, rezervoar za pufer in podlaga za nosilni medij). Po končani separaciji gel obarvamo (etidijev bromid), presvetlimo z UV-svetlobo in dokumentiramo s fotografiranjem (Kregar, 1996; Smole Možina in sod., 2002).

4 Izolacija molekul bakterijske DNA

Prvi korak v fazi izolacije DNA je liza bakterijskih celic. Bakterijske celice se z dodatkom ustreznih reagentov razbijejo. Uporabljajo se anionski detergenti in encimi, ki vplivajo na lizo celičnih membran in membran celičnih jeder.

Pomembna faza v postopku izolacije bakterijske DNA je ohranitev stabilnosti molekul DNA. Z namenom, da preprečimo encimsko in mehansko razgradnjo DNA, dodamo TE pufer, katerega namen je ohranjati stabilnosti molekul DNA in onemogočanje njihove degradacije. Glavni sestavini TE pufra sta Tris baza in EDTA. Vloga Tris baze je zlasti preprečitev deprotonizacije molekul DNA in ohranjanje njihove boljše topljivosti. EDTA pa z dvovalentnimi ioni (kot je Mg^{2+}) tvori kelatne komplekse. Tako se inhibira intracelularnih DNA-az, ki za svoje delovanje potrebujejo Mg^{2+} ione kot kofaktor (TE buffer..., 2007).

Naslednji fazi vključujeta večkratno centrifugiranje in ekstrakcijo s fenolom. Pomemben je tudi dodatek encima proteinaze K, ki cepi peptidne vezi in omogoča odstranitev molekul beljakovin. Odstranjene beljakovinske molekule se ekstrahirajo v fenol. Za separacijo polisaharidov od DNA se dodata Na-acetat in absolutni etanol. Ob ustreznem vmesnem centrifugiranju v zaključni fazi dobimo oborino DNA, katero moramo nato dobro posušiti ter raztopiti v ustreznem volumnu dH_2O (Izolacija DNA in RNA..., 2007).

Spektrofotometrična določitev koncentracije DNA nam pove stopnjo kontaminacije molekul DNA. Tako uporabimo razmerje med absorbancama pri 260 nm in 280 nm. Velja, da je pri čisti DNA A_{260}/A_{280} enak 1,8, če je razmerje A_{260}/A_{280} večje od 1,8 pa nam pove, da je DNA kontaminirana s fenoli in proteini (Izolacija DNA in RNA..., 2007).

5 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE DIPLOMSKE NALOGE

1 Cilji diplomske naloge

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo si zadali naslednje cilje:

- Ugotoviti, ali je mikrodilucijska metoda v našem primeru primerna za ugotavljanje odpornosti kampilobakterjev proti antibiotikom;
- Izbranim sevom kampilobakterjev določiti vrednosti MIC za antibiotike eritromicin, ciprofloksacin in tetraciklin;
- Izbranim izolatom ugotoviti vzrok povečane bakterijske odpornosti na antibiotike;

- Izoliranim izolatom kampilobakterjev določiti vrednosti MIC ob prisotnosti/odsotnosti subinhibitorne koncentracije inhibitorja membranskih izlivnih črpalk PAβN;
- Izoliranim izolatom določiti prisotnost točkovnih mutacij na tarčnih genih 23S *rRNA*;
- Ugotoviti, v kolikšni meri v našem primeru mehanizma efluksa in mutacij pripomoreta k povečani odpornosti kampilobakterjev na eritromicin in ali sta med seboj povezana.

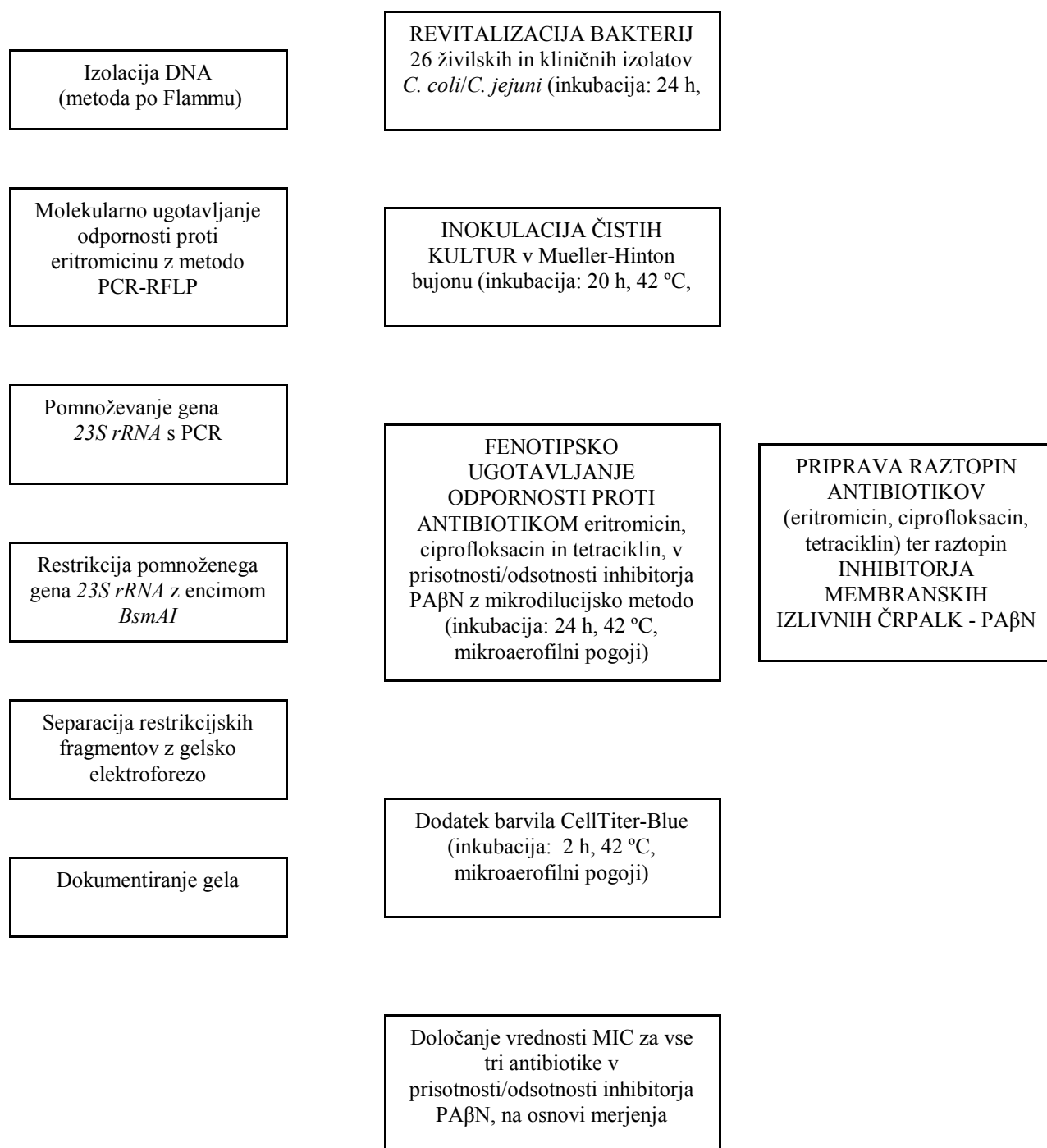
2 Delovne hipoteze

Predpostavili smo:

- Pri izolatih *Campylobacter coli* in *C. jejuni* se pogosto pojavlja odpornost proti klinično uporabnim antibiotikom;
- Dodatek inhibitorja membranskih izlivnih črpalk PAβN vpliva na občutljivost bakterij *Campylobacter coli* in *C. jejuni* proti izbranim antibiotikom;
- V bakterijsko odpornost proti eritromicinu sta vključena dva mehanizma: mutacija na genih 23S *rRNA* in aktivno izčrpavanje snovi iz celice.

3 MATERIAL IN METODE

1 POTEK DELA



Slika 9: Shema poskusa diplomskega dela

2 MATERIAL

1 Mikroorganizmi

Za proučevanje bakterijske odpornosti na izbrane antibiotike smo uporabili 26 različnih izolatov *C. jejuni* in *C. coli* iz zbirke Katedre za živilsko mikrobiologijo. Izolirani so bili iz piščančjega, puranjega ter svinjskega mesa, med analiziranimi izolati pa so bili uporabljeni tudi humani

(klinični) sevi. Iz zbirke smo jih zbrali na osnovi predhodno zbranih podatkov o odpornosti proti vsaj enemu od izbranih antibiotikov, pri čemer so imeli prednost sevi, ki so bili odporni proti eritromicinu. Kulture so bile shranjene v tekočem gojišču BHI z dodatkom glicerola in defibrilirane konjske krvi pri temperaturi -80 °C. Namnožene so bile na selektivnem krvnem agarju Columbia. Ker bakterije rodu *Campylobacter* uvrščamo med mikroaerofilne mikroorganizme, je inkubacija potekala v kontrolirani atmosferi (3 % O₂, 10 % CO₂, 87 % N₂) pri temperaturi 42 °C.

2 Mikrobiološka gojišča

1 Krvni agar Columbia

Sestava:

- 19,5 g osnovnega medija Columbia Agar Base (Oxoid, CM 331);
- 500 ml dH₂O;
- 25 ml sterilne defibrilirane konjske krvi (Oxoid, SR048C);
- 1 steklenička dodatka za rast *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, SR232E);
- 1 steklenička dodatka za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid, SR069E).

Preglednica 2: Sestava osnovnega medija za krvni agar Columbia

SESTAVINE	KOLIČINA (g/l)
pepton	23,0
škrob	1,0
natrijev klorid	5,0
agar	8,0-18,0

Preglednica 3: Sestava dodatka za selektivnost *Campylobacter* Growth Supplement

SESTAVINE	KOLIČINA
vankomicin	10 mg/l
polimiskin B	2500 I.U./l
trimetoprim	5 mg/l

PRIPRAVA:

19,5 g osnovnega medija raztopimo v 500 ml dH₂O in ga steriliziramo 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Medij ohladimo na 45 °C, dodamo 25 ml sterilne defibrilirane konjske krvi, raztopino dodatka za rast ter raztopino dodatka za selektivnost. Z namenom, da preprečimo penjenje, gojišče previdno premešamo in ga razlijemo v petrijevke. Ohlajenega do uporabe hranimo pri temperaturi 4 °C.

2 Agar CCDA

Sestava:

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

Preglednica 4: Sestava osnovnega medija za agar CCDA

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

Preglednica 5: Sestava dodatka za selektivnost CCDA Selective Supplement

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

PRIPRAVA:

22,75 g osnovnega medija za agar CCDA raztopimo v 500 ml dH₂O ter ga steriliziramo 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Medij nato ohladimo na 45 °C, dodamo raztopino CCDA dodatka za selektivnost CCDA Selective Supplement (Oxoid, SR155E), ga premešamo ter razlijemo v petrijevke.

3 Tekoče gojišče Muller Hinton (Mueller Hinton bujon – MHB)

Sestava:

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

Preglednica 6: Sestava osnovnega medija za MHB

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

PRIPRAVA:

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

3 Priprava raztopin antibiotikov

1 ERITROMICIN (SIGMA-ALDRICH CO.)

0,0256 g zatehte smo raztopili v 5 ml absolutnega etanola in jo prefiltrirali. 0,4 ml prefiltrirane raztopine smo nato dodali 1,6 ml gojišča MHB. Po dodatku 50 µl bakterijske kulture, je končna koncentracija antibiotika je tako znašala 512 µg/ml.

2 CIPROFLOKSACIN (FLUKA BIOCHEMIKA), TETRACIKLIN (SIGMA-ALDRICH CO.)

Pri obeh antibiotikih smo postopali enako. 0,0256 g zatehte smo dodali 4,5 ml dH₂O in 0,5 ml NaOH (c = 1 M). Raztopino smo nato premešali z vrtničnim mešalnikom in jo prefiltrirali. Nato smo vzeli 0,4 ml prefiltrirane raztopine in jo zmešali z 1,6 ml gojišča MHB. Na koncu je sledil še dodatek 50 µl bakterijske kulture in koncentracija antibiotika je tako znašala 512 µg/ml.

4 Priprava reagentov, raztopin in ostalih dodatkov

1 Fiziološka raztopina

Sestavine za pripravo KH₂PO₄:

- 3,4 g KH_2PO_4 (Kemika)
- 1100 ml dH_2O

PRIPRAVA:

3,4 g KH_2PO_4 smo raztopili v 100 ml dH_2O in uravnali pH na 7,2. Nato smo 1,25 ml pripravljene osnovne raztopine razredčili v 1000 ml dH_2O , premešali in sterilizirali v avtoklavu (15 minut, $T = 121^\circ\text{C}$).

2 Inhibitor $\text{PA}\beta\text{N}$ (SIGMA-ALDRICH CO.)

Zatehtali smo 0,0010 g $\text{PA}\beta\text{N}$ in ga raztopili v 2 ml ddH_2O vodi ter dobljeno raztopino prefiltrirali. Koncentracija topljenca je znašala 500 $\mu\text{g/ml}$.

3 Reagenti za PCR

- 2,5 μl PCR pufra (100 mM Tris HCl pH 8,3; 500 mM KCl, GebeAmp®);
- 1,5 μl MgCl_2 (25 mM);
- 1,25 μl dNTP (20 mM);
- 0,2 μl AmplyTaq® Polimeraze (5 U/ μl);
- 1 μl DNA (25 ng/ μl);
- 18,05 μl ddH_2O ;
- začetni oligonukleotidi
0,25 μl Ery23S For (100 pmol/ μl): GTA-AAC-GGC-GGC-CGT-AAC-TA
0,25 μl Ery23S Rev (100 pmol/ μl): GAC-CGA-ACT-GTC-TCA-CGA-CG.

4 Reagenti za gelsko elektroforezo

- Pufer TAE 10x;
48,11 g Tris baza (H 5131, Promega)
12 ml očetne kisline (1.0063.100, Chemicals)
7,44 g Na_2EDTA (E 5134, Sigma)
 ddH_2O ;
- Pufer TAE 0,5x
50 ml pufra TAE 10x
950 ml destilirane vode;
- Agaroz (Seakem ME agarose);
- Nanašalni pufer (10x DNA Loading Buffer, 0032 006.850, Chemicals);
- Molekulski označevalec dolžin fragmentov DNA (100 bp DNA ladder, G210A Promega, Gibco BRL 15628-019);
- Raztopina ($c = 10$ mg/ml) etidijevega bromida (E8751, Sigma).

5 Ostali dodatki

- Barvilo resazurin CellTiter-Blue™ (Promega Corporation);
- Tween 80.

5 Laboratorijska oprema

- splošni mikrobiološki material: petrijeve plošče (Labortechnika, Golias), cepilne zanke, avtomatske pipete in nastavki za pipete (Gilson, Eppendorf), merilni valji (Plastibrand), epice (Eppendorf), laboratorijske steklenice (Duran), plastični lončki (Labortechnika Golias), baterijski pipetor (Eppendorf easypet);
- zaščitna mikrobiološka komora SMBC 122AV (Iskra PIO);
- digestorij (TIP382, Elektromedicina);
- tehtnici (Sartorius Analytic in Mettler Toledo);
- inkubator (Kambič SP190);
- mikrovalovna pečica (Cook n'grill 1300, Sanyo);
- zmrzovalnik (LTH);
- zmrzovalna omara (Heto Ultra Freeze);
- hladilnik (Bosch);
- vrtnično mešalo (Yellowline, IKA);
- plinski gorilnik;
- plinska bomba z mešanico plina: 3 % O₂, 10 % CO₂, 87 % N₂ (Istragas);
- anaerobni lonci (Anaerojal 2,5l, Oxoid Ago 25A);
- injekcijske brizgalke (PB Plastik);
- filtrirni papir (Millipore; Isopore membrane filters 0,2 µm, GTBP);
- programska oprema: Microsoft Office, programski paket Magellan;
- centrifuga (5415C, Eppendorf Centrifuge);
- vodna kopel (Serija 11757, Sutjeska);
- komora za PCR (Holten, Lamin Air);
- aparatura za PCR (Gene AMP DNA Thermal Cyclers 2400, Perkin Elmer);
- komplet za elektroforezo (MUPID-2, Cosmo Bio CO., LTD);
- čitalec mikrotiterskih plošč (Tecan Safire 2);
- črne mikrotiterske plošče z ravnim dnom (Nunc);
- 12 – kanalna pipeta (Eppendorf);
- kad za tekoče gojišče (Eppendorf);
- spektrofotometer, MA 950 (Iskra);
- sterilizator-avtoklav, V= 40 dm³ (Sutjeska);
- PCR – Gene Amp DNA Thermal Cyclers (Perkin-Elmer 2400).

3 METODE DELA

1 Revitalizacija bakterij

Posamezne izolate bakterij, ki so bili shranjeni v krioepurvetkah (z dodatkom BHI, glicerola, defibrilirane konjske krvi) pri -80 °C, smo s cepilno zanko aseptično prenesli na trdno gojišče Columbia. Petrijeve plošče, na katerih so bile nacepljene kulture kampilobakterjev, smo inkubirali

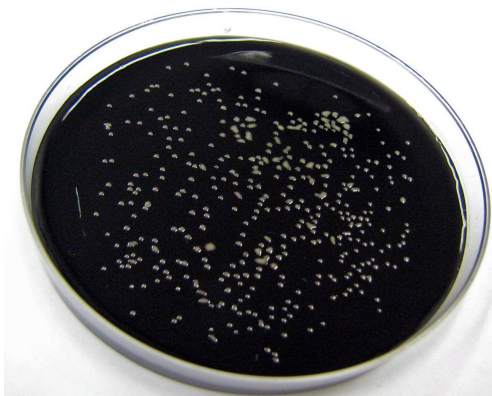
v mikroaerofilnih pogojih (3 % O₂, 10 % CO₂, 87 % N₂) za 48 ur pri 42 °C, oziroma do pojava tipičnih kolonij.

2 Priprava inokuluma

Po končani inkubaciji so bile na selektivnem gojišču Columbia opazne sive kolonije kampilobakterjev. S cepilno zanko smo jih za vsak izolat posebej dodali v tekoče gojišče MHB (4 ml), kateremu je bila dodana sterilna defibrilirana konjska kri (0,2 ml). Da smo zagotovili dobro disperzijo mikrobnih celic v gojišču, smo raztopino v epruvetah z vrtnčnim mešalom dobro premešali. Ta postopek je potekal v mikrobiološki komori, ki nam je pri delu zagotavljala aseptične pogoje. Nato smo epruvete, v katerih so bila gojišča s posameznimi izolati, inkubirali v mikroaerofilnih pogojih za 15 ur pri 42 °C.

3 Določanje koncentracije celic v inokulumu

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



Slika 10: Rast kolonij bakterij *Campylobacter* na selektivnem gojišču CCDA

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

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

N CFU/mL

$\sum c$ vsota kolonij na vseh ploščah

a število plošč prve števné razredčitve

b število plošč druge števné razredčitve

d razredčitveni faktor (prve števné razredčitve)

4 Mikrodilucijska metoda v bujonu

1 Priprava koncentracij antibiotikov

Odpornost kampilobakterjev smo preizkušali z uporabo antibiotikov: eritromicin, ciprofloksacin ter tetraciklin. Koncentracijski razmik je bil za vse antibiotike enak. Najvišja uporabljena koncentracija je bila 512 µg/ml, najnižja pa 0,016 µg/ml. Da so imeli antibiotiki na bakterije ustrezen učinek, smo jih morali po zatehti ($m = 0,00256$ g) raztopiti v topilih (volumen 5 ml), ki so zagotovili njihovo najboljšo topnost. Za raztapljanje eritomicina smo uporabili absolutni etanol, pri raztapljanju ciprofloksacina ter tetraciklina pa smo uporabili destilirano vodo in NaOH. Po dodatku topila smo raztopine dobro premešali (ni bilo vidnih delcev topljenca) ter prefiltrirali. Epruvete, v katerih so bile prefiltrirane raztopine antibiotikov, smo nato ovili s celofanom in jih shranili v hladilniku za maksimalno pet dni. (sveže raztopine antibiotikov smo tako pripravljali vsak teden sproti). Na dan, ko smo na mikrotitersko ploščo dodajali reagente, smo prefiltrirano raztopino antibiotikov dodatno razredčili z gojiščem (MHB). In sicer: 1,6 ml gojišča MHB smo dodali 0,4 ml prefiltrirane raztopine posameznega antibiotika. Začetna koncentracija antibiotikov je tako znašala:

začetna koncentracija v topilu: $c = 0,0256 \times 10^6 \text{ µg} / 5 \text{ ml} = 5120 \text{ µg/ml}$

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

koncentracija antibiotika po dodatku gojišča MHB: $2048 \text{ µg} / (0,4 + 1,6) \text{ ml} = 1024 \text{ µg/ml}$

Ker smo po dodatku raztopine antibiotika s koncentracijo 1024 µg/ml v luknjico na mikrotiterski plošči dodali še kulturo v razmerju 1:1, je začetna koncentracija znašala **512 µg/ml**.

2 Priprava kulture

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

3 Princip ter izvedba metode

Mikrotiterska ploščica je imela 96 luknjic. Vrstice so bile označene z črkami (A, B, C, D, E, F, G, H), kolone pa s številkami (od 1 do 12). Ploščo smo razdelili tako, da smo na njej lahko opravili analizo za 1 izolat. Ker smo v analizo vključili 3 različne antibiotike, smo jo razdelili na tri dele. Zaradi primerjave vrednosti MIC, dobljene ob prisotnosti in odsotnosti inhibitorja PAβN, smo pri vsaki raztopini antibiotika in gojišča dodali še ta inhibitor ($V = 4,17 \mu\text{l}$, $c = 500 \mu\text{g/ml}$).

Na vsaki plošči smo izvedli še merjenje fluorescence za samo gojišče (»blank«). Tako smo videli, koliko samo gojišče dejansko vpliva na izmerjeno vrednost. Dobljeno vrednost smo nato odšteli od izmerjene vrednosti za posamezno koncentracijo antibiotika. Naredili smo še test »pozitivne kontrole«, in sicer tako, da smo v luknjico dodali samo gojišče in kulturo. Antibiotika in inhibitorja v to luknjico nismo dodali. Izmerjena vrednost (fluorescenca) v tej luknjici nam je povedala, ali so bile mikrobne celice metabolično aktivne, torej so se uspešno delile ob odsotnosti kakega protimikrobnega agensa. Podobno smo naredili tudi v luknjici, v katero smo poleg gojišča in kulture dodali še inhibitor. Sam inhibitor, ob odsotnosti antibiotikov, ne bi smel imeti učinka. S tem poizkusom smo testirali, če je imel dodatek inhibitorja kaj vpliva na rast bakterij (možnost kontaminacije inhibitorja).

V luknjico, v kateri je bila največja koncentracija antibiotika, smo najprej z avtomatsko pipeto dodali $100 \mu\text{l}$ že prej pripravljene raztopine antibiotika s koncentracijo $1024 \mu\text{g/ml}$. V ostale luknjice smo dodali po $50 \mu\text{l}$ gojišča MHB. Nato smo iz luknjice, v katero smo dodali raztopino antibiotika, prenesli $50 \mu\text{l}$ raztopine v naslednjo luknjico (gledano v vertikalni smeri) in dobro premešali. Nato smo iz te luknjice prenesli $50 \mu\text{l}$ raztopine v naslednjo, ter dobro premešali. Tak postopek smo ponavljali do luknjice, kjer je bila najmanjša koncentracija antibiotika ($0,016 \mu\text{g/ml}$). Tak način priprave razredčitev nam je zagotovil, da se je koncentracija zmanjševala za polovico. Ker smo raztopine prenašali iz luknjice, kjer je bila večja koncentracija v naslednjo, je končni volumen v vseh luknjicah znašal $50 \mu\text{l}$ (iz zadnje luknjice smo $50 \mu\text{l}$ raztopine zavrgli). Pri vsakem antibiotiku smo opravili dve seriji razredčitev, saj je bila prva serija brez dodanega inhibitorja ($V = 4,17 \mu\text{l}$), drugi seriji razredčitev pa je bil dodan.

Pri vseh treh antibiotikih smo postopali enako. Ko smo napravili ustrezne razredčitve, smo v vse luknjice (razen v »blank«) dodali po $50 \mu\text{l}$ standardizirane čiste kulture. Po njenem dodatku, smo vsebino v luknjici dobro premešali. Tako so bile končne delovne koncentracije testiranega agensa polovične vrednosti začetnih. Po končanem postopku smo mikrotitersko ploščo pokrili s pokrovom, jo dali v posodo, ki je dobro tesnila in jo prepihali z mešanico plina (3 % O_2 , 10 % CO_2 , 87 % N_2). Nato smo posodo, v kateri je bila mikrotiterska ploščica, dobro zaprli ter jo inkubirali 24 ur pri 42°C .

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

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

Preglednica 7: Oznaka luknjic v mikrotiterski ploščici in njihova vsebina

OZNAKA LUKNJICE	REAGENTI V POSAMEZNI LUKNJICI
BL (1 A)	Blank: $100 \mu\text{l}$ MHB

PC S1 (1 B)	Pozitivna kontrola: 50 µl MHB + 50 µl kulture
1R (1x razredčitev)	100 µl ant. (c=512 µg/ml) + 50 µl kulture
2R (2x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=256 µg/ml) + 50 µl kulture
3R (3x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=128 µg/ml) + 50 µl kulture
4R (4x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=64 µg/ml) + 50 µl kulture
5R (5x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=32 µg/ml) + 50 µl kulture
6R (6x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=16 µg/ml) + 50 µl kulture
7R (7x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=8 µg/ml) + 50 µl kulture
8R (8x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=4 µg/ml) + 50 µl kulture
9R (9x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=2 µg/ml) + 50 µl kulture
10R (10x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=1 µg/ml) + 50 µl kulture
11R (11x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=0,5 µg/ml) + 50 µl kulture
12R (12x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=0,250 µg/ml) + 50 µl kulture
13R (13x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=0,125 µg/ml) + 50 µl kulture
14R (14x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=0,063 µg/ml) + 50 µl kulture
15R (15x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=0,032 µg/ml) + 50 µl kulture
16R (16x razredčitev)	50 µl raztopine MHB in ant. (c=0,016 µg/ml) + 50 µl kulture
PC S1 + I (5 A)	50 µl MHB + 50 µl kulture + 4,17 µl inh. (c=500 µg/ml)

Preglednica 8: Prikaz mikrotiterske plošče po končanem dodajanju reagentov in kulture

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	7R	1R	9R	PC S 1 + I	8R	1R	9R	PC S 1	8R	1R	9R
		ERI	ERI + I	ERI + I		CIP	CIP + I	CIP + I		TET	TET + I	TET + I
B	PC S1	8R	2R	10R	1R	9R	2R	10R	1R	9R	2R	10R
		ERI	ERI + I	ERI + I	CIP	CIP	CIP + I	CIP + I	TET	TET	TET + I	TET + I
C	1R	9R	3R	11R	2R	10R	3R	11R	2R	10R	3R	11R
	ERI	ERI	ERI + I	ERI + I	CIP	CIP	CIP + I	CIP + I	TET	TET	TET + I	TET + I
D	2R	10R	4R	12R	3R	11R	4R	12R	3R	11R	4R	12R
	ERI	ERI	ERI + I	ERI + I	CIP	CIP	CIP+ I	CIP + I	TET	TET	TET + I	TET + I
E	3R	11R	5R	13R	4R	12R	5R	13R	4R	12R	5R	13R
	ERI	ERI	ERI + I	ERI + I	CIP	CIP	CIP + I	CIP + I	TET	TET	TET + I	TET + I
F	4R	12R	6R	14R	5R	13R	6R	14R	5R	13R	6R	14R
	ERI	ERI	ERI + I	ERI + I	CIP	CIP	CIP + I	CIP + I	TET	TET	TET + I	TET + I

G	5R	13R	7R	15R	6R	14R	7R	15R	6R	14R	7R	15R
	ERI	ERI	ERI + I	ERI + I	CIP	CIP	CIP + I	CIP + I	TET	TET	TET + I	TET + I
H	6R	14R	8R	16R	7R	15R	8R	16R	7R	15R	8R	16R
	ERI	ERI	ERI + I	ERI + I	CIP	CIP	CIP + I	CIP + I	TET	TET	TET + I	TET + I

ERI = ERITROMICIN; ERI + I = ERITROMICIN + INHIBITOR (PAβN)

CIP = CIPROFLOKSACIN; CIP + I = CIPROFLOKSACIN + INHIBITOR (PAβN)

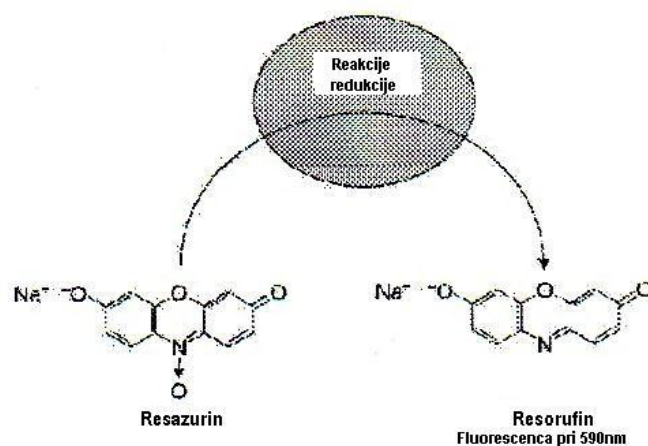
TET = TETRACIKLIN; TET + I = TETRACIKLIN + INHIBITOR (PAβN)

BL = BLANK; PCS1 = POZITIVNA KONTROLA

4 Določitev živosti bakterijskih celic

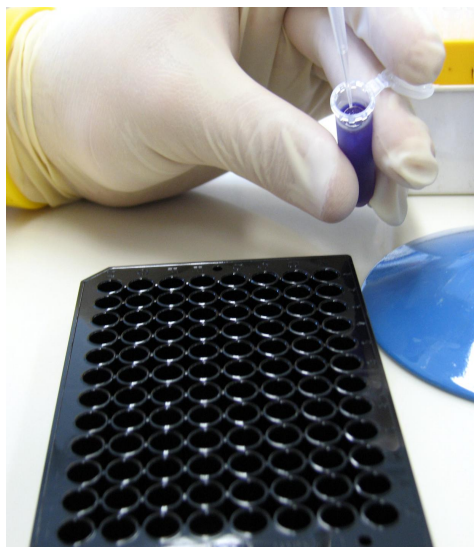
Po končani inkubaciji smo v vse luknjice dodali 15 µl reagenta CellTiter-Blue™, ki vsebuje barvilo resazurin. Sledila je inkubacija mikrotiterske plošče za 1 uro pri 42 °C v mikroaerofilnih pogojih in v temi.

Resazurin ima vlogo kolorimetričnega in/ali fluorometričnega indikatorja in se uporablja za določanje živih celic na mikrotiterskih ploščah. Barvilo resazurin (modre barve) meri metabolično kapaciteto celic (je indikator živosti). Žive celice ohranijo sposobnost redukcije resazurina v resorufin (rožnate barve), ki močno fluorescira. Nežive celice pa zaradi izgube metabolične kapacitete ne reducirajo indikatorskega barvila in tako ne proizvajajo fluorescentnega signala (Riss in Moravec, 2003).

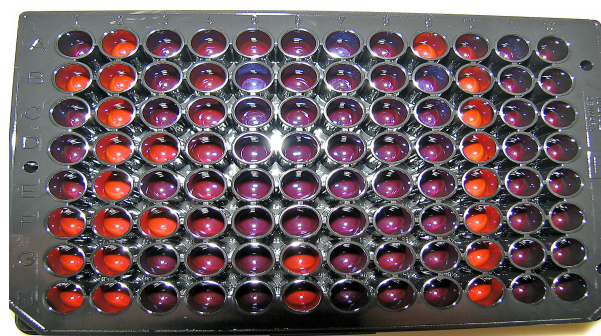


Slika 11: Redukcija resazurina (Riss in Moravec, 2003)

Spremembo barve lahko spremljamo brez dodatne opreme, fluorescenco pa s pomočjo spektrofotometra. Rezultat smo izrazili kot relativno fluorescentno enoto (RFU). Goranovič (2005) navaja, da je optimalna valovna dolžina za vzbujanje pri 550 nm in za merjenje fluorescence resazurina pri 595 nm. Količina proizvedene fluorescence je sorazmerna številu živih celic.



Slika 12: Dodajanje barvila CellTiter-Blue™ v luknjice na mikrotiterski plošči



Slika 13: Prikaz mikrotiterske plošče po končani analizi. Rdečkasto-roza obarvane luknjice kažejo, da so v njih nahajajo mikrobne celice, ki so metabolično aktivne (žive), saj so bile sposobne reducirati resazurin v resorufin. Nežive mikrobne celice se nahajajo v luknjicah, ki so temnejše. V teh luknjicah barvilo ostane modre barve. MIC predstavlja zadnja luknjico v koloni, ki ni spremenila barve. Dodane reagentne in koncentracije antibiotikov prikazujeta preglednici 7 in 8.

Za merjenje fluorescence smo uporabili čitalec mikrotiterskih plošč. Uporabili smo naslednje pogoje:

- valovna dolžina vzbujanja: 550 nm
- valovna dolžina merjenja emitirane fluorescence: 595 nm
- razmik med valovnimi dolžinami: 20 nm
- z – pozicija: 6619 μ m
- »gain«: 38

5 Izolacija kromosomske bakterijske DNA

DNA smo izolirali iz bakterijskih kolonij, ki so zrasle na gojišču CCDA. Za izolacijo smo uporabili metodo, ki jo je leta 1984 opisal Flamm s sod.:

1 Uporabljeni reagenti:

- TE pufer: naredili smo 250 ml raztopine in sicer tako, da smo v ddH₂O raztopili 1,514 g Tris baze in 1,86 g EDTA
- sarkozol: 5 g sarkozola smo raztopili v 100 ml TE pufra
- Na-acetat: 12,3 g topljenca smo raztopili v 50 ml ddH₂O
- Na-fosfat-saharoza: najprej smo v 100 ml ddH₂O raztopili 20 g saharoze, nato smo odtehtali 0,138 g Na-fosfata in ga raztopili v 100 ml raztopine saharoze
- lizocim: odtehtali smo 8 mg encima in ga raztopili v 200 ml raztopine Na-fosfat-saharoza
- proteinaza K
- raztopina fenola
- raztopina kloroforma
- absolutni etanol
- 80 % etanol: 80 ml absolutnega alkohola smo dodali 20 ml ddH₂O

2 Izvedba postopka

V 2 ml epico smo odpipetirali 100 µl lizocima in vanjo nanesli kulturo *Campylobacter* iz gojišča CCDA, ter vse skupaj dobro premešali. Sledila je 45-minutna inkubacija pri temperaturi 37 °C.

Nato smo pripravili raztopino, ki je vsebovala 100 µl sarkozola, 200 µl TE pufra in 100 µl proteinaze K. Po končani inkubaciji smo to raztopino dodali v vzorec. Vzorec smo nato ponovno inkubirali 1 uro pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo vzorcu dodali raztopino, ki je vsebovala 250 µl fenola ter 250 µl kloroforma.

Sledilo je centrifugiranje pri pogojih 5 minut/14000 g. Nato smo dodali 500 µl kloroforma ter ponovno centrifugirali pri 5 minut/14000 g. Po končanem centrifugiranju smo odstranili vodno fazo ter ji dodali 50 µl raztopine Na-acetata, 1000 µl 100 % etanola ter vse skupaj dobro premešali. Sledila je 30-minutna inkubacija pri -20 °C ter nato ponovno centrifugiranje pri 10 minut/14000 g. Supernatant smo nato odstranili ter nastalo oborino raztopili v 200 µl 80 % etanola (etanol je bil ohlajen na -20 °C).

Dobljeno raztopino smo nato premešali ter jo centrifugirali pri 10 minut/14000 g. Nato smo supernatant odstranili, oborino pa posušili ter jo raztopili v 100 µl dH₂O. Raztopino z izolirano DNA smo zaradi boljšega raztapljanja pustili čez noč v hladilniku ter shranili pri temperaturi -20 °C.

6 Spektrofotometrično določanje koncentracije DNA

Spektrofotometrično določitev koncentracije DNA smo opravili zato, da smo lahko pripravili raztopino DNA s koncentracijo 25 ng/µl. Merjenje je potekalo pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm.

3.2.6.1 Izvedba postopka

Razredčeno raztopino DNA smo pripravili tako, da smo 495 µl sterilne ddH₂O dodali 5 µl izolirane DNA. Nato smo preiskovanim vzorcem izmerili absorbanco.

7 Pomnoževanje in restrikcija pomnožka gena *23S rRNA*

Za pomnoževanje gena *23S rRNA* smo uporabili metodo PCR. Naredili smo reakcijsko mešanico, ki je med drugim vsebovala tudi specifična oligonukleotidna začetnika Ery23S For in Ery23S Rev.

Za vsak izolat smo analizirali molekule DNA, ki smo jih predhodno izolirali z metodo po Flammu. V analizi smo uporabili tako izolate, ki so pokazali odpornost na eritromicin, kot tudi tiste, ki so bili nanj občutljivi.

Namen pomnoževanja in restrikcije je bil ugotavljanje prisotnosti točkovne mutacije na genu *23S rRNA*, ki zmanjša občutljivost kampilobakterjev na makrolide. Po koncu pomnoževanja tega gena smo dobili 714 bp velik pomnožek, na katerem smo nato s pomočjo specifičnega encima naredili restrikcijo.

Prvi korak pri delu s PCR je bila priprava mešanice reagentov. Mešanica enega vzorca (V = 25 µl) je vsebovala:

- 2,5 µl 10 x buffer (100 mM Tris HCl (pH = 8,3); 500 mM KCl)
- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1,25 µl dNTP (20 mM)
- 0,25 µl Ery23S For primer (100 pmol/µl)
- 0,25 µl Ery23S Rev primer (100 pmol/µl)
- 18,05 µl PCR (HPLC) H₂O
- 0,2 µl polimerase (5 U/µl)
- 1 µl izolirane DNA (25 ng/µl)

Reakcijsko mešanico smo pripravili za vse vzorce skupaj. Naredili smo tudi negativno kontrolo, pri kateri smo namesto 1 µl izolirane DNA uporabili 1 µl ddH₂O. Epice z reakcijskimi mešanicami smo nato vstavili v PCR aparaturu, kjer smo izvedli verižno reakcijo s polimerazo po programu, ki ga prikazuje preglednica 9:

Preglednica 9: Program PCR za ugotavljanje točkovne mutacije

POSTOPEK		TEMPERATURA (°C)	ČAS (s)
ZAČETNA INKUBACIJA		94	180
POMNOŽEVANJE FRAGMENTOV DNA V 30 CIKLIH	DENATURACIJA	94	15
	PRILEGANJE	60	15
	PODALJŠEVANJE	72	30
KONČNA INKUBACIJA		72	240
OHLAJEVANJE		4 ali 15	neomejeno

Po končanem pomnoževanju gena *23S rRNA* smo z restrikcijskim encimom *BsmAI* (5000 U/ml) naredili restrikcijo. Raztopini 20 µl pomnožka smo dodali 0,7 µl raztopine encima *BsmAI* ter inkubirali 3 ure pri 55 °C.

Sledila je ločba restrikcijskih fragmentov z gelsko elektroforezo. Predhodno smo pripravili:

- agarozni gel (0,56 g agaroze smo raztopili v 35 ml 1xTAE)
- mešanice (2 µl loading pufra + 2 µl označevalca dolžin 1 kbp, 2 µl loading pufra + 8 µl restrikcijskega produkta) smo odpipetirali na gel in izvedli gelsko elektroforezo pri pogojih: 100 V, 30 min. Po končani ločbi smo gel barvali v raztopini etidijevega bromida (15 min) ter ga slikali pod UV-svetlobo.

Pri občutljivih sevih smo pričakovali štiri fragmente (102 bp, 368 bp, 226 bp in 18 bp). Odporni sevi pa imajo mutacijo na *23S rRNA*, katere posledica je dodatno restrikcijsko mesto, ki jo restrikcijski encim (*BsmAI*) lahko razgradi. Pri odpornih sevih smo tako pričakovali pet fragmentov, in sicer: 102 bp, 311 bp, 226 bp, 57 bp ter 18 bp. Restrikcijski encim v tem primeru razgradi 368 bp velik fragment v dva manjša fragmenta – 311 bp in 57 bp.

4 REZULTATI

V eksperimentalni del diplomskega dela smo vključili 20 živilskih in 6 humanih izolatov *Campylobacter coli* in *Campylobacter jejuni*. Za ugotavljanje bakterijske občutljivosti na tri različne antibiotike (eritromicin, ciprofloksacin in tetraciklin) smo uporabljali mikrodilucijsko metodo v bujonu. Merilo za občutljivost bakterij na antibiotike je predstavljala minimalna inhibitorna koncentracija antibiotika, ki je še inhibirala njihovo rast. Skladno s postavljenimi hipotezami smo ugotavljali razloge za povečano bakterijsko odpornost na izbrane antibiotike. Tako smo vlogo membranskih izlivnih črpalk ugotavljali z dodatkom inhibitorja PAβN, prisotnost točkovnih mutacij na *23S rRNA* pa z metodo PCR in restrikcijsko analizo pomnožkov.

1 UGOTAVLJANJE VLOGE MEMBRANSKIH IZLIVNIH ČRPALK PRI POVEČANI BAKTERIJSKI ODPORNOSTI PROTI ANTIBIOTIKOM

1 Določitev števila celic v inokulumu

Pred pričetkom eksperimentalnega dela smo preverili, ali so bile bakterije v inokulumu žive. Koncentracijo celic v inokulumu smo določili s serijskimi razredčitvami (metoda po Kochu). Kulturo smo razredčili (največja razredčitev je bila -7) in jo odpipetirali na gojišče CCDA. Po 24-urni inkubaciji (mikroaerofilni pogoji, 42 °C) smo kolonije prešteli in rezultat izrazili v CFU/ml.

Preglednica 10: Koncentracija celic v inokulumu

OZNAKA IZOLATA	CFU/ml	OZNAKA IZOLATA	CFU/ml
<i>C. coli</i> 137	2*10 ⁹	<i>C. coli</i> CV 110722	2*10 ⁹
<i>C. coli</i> 140	4*10 ⁸	<i>C. coli</i> CV 110725	7*10 ⁸
<i>C. coli</i> M 37	4*10 ⁷	<i>C. coli</i> CV 7114	1*10 ⁸
<i>C. coli</i> 171	6*10 ⁸	<i>C. coli</i> GC 154	5*10 ⁸
<i>C. coli</i> FC 8	9*10 ⁸	<i>C. jejuni</i> VC 81	7*10 ⁸
<i>C. coli</i> FC 10	4*10 ⁷	<i>C. coli</i> GC 190	9*10 ⁸
<i>C. coli</i> 229	6*10 ⁸	<i>C. coli</i> GC 182	7*10 ⁸

<i>C. coli</i> 44/3	7*10 ⁸	<i>C. coli</i> 2235	7*10 ⁸
<i>C. coli</i> 51/1	7*10 ⁸	<i>C. jejuni</i> 3552	2*10 ⁸
<i>C. coli</i> FC 41	2*10 ⁸	<i>C. jejuni</i> 3755	10 ⁹
<i>C. coli</i> WC 35	5*10 ⁸	<i>C. jejuni</i> 413	10 ⁹
<i>C. coli</i> FC 80	2*10 ⁸	<i>C. jejuni</i> 03/573	6*10 ⁸
<i>C. coli</i> CV 11076	6*10 ⁸	<i>C. spp.</i> 111	10 ⁹

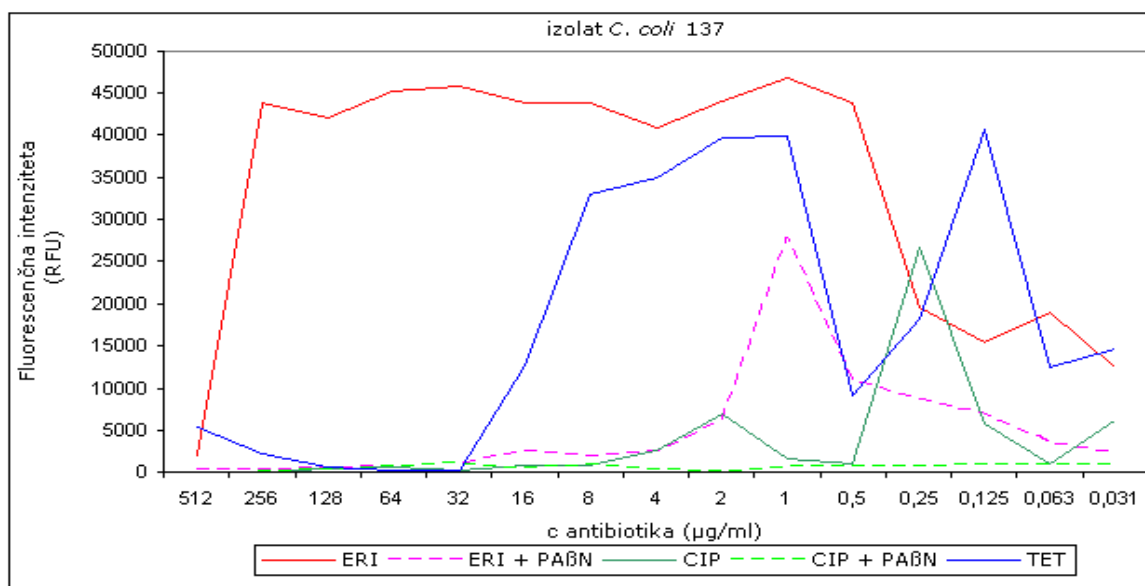
Ustrezno število prešteti kolonij je bilo bistveno za določitev vrednosti MIC z mikrodilucijsko metodo. Premajhna vrednost CFU/ml bi pomenila, da rezultati, dobljeni z mikrodilucijsko metodo ne bi bili verodostojni. Koncentracija celic v inokulumu se je gibala med 10⁷ in 10⁹ CFU/ml. Če bi bilo število manjše, bi bil vzrok v neustreznih pogojih hranjenja kultur ali pa v neustreznih pogojih inkubacije. V takem primeru smo poskus ponovno pripravili. Iz oblik in barv bakterijskih kolonij je bilo razvidno tudi, če je bila prisotna kontaminacija.

2 Rezultati mikrodilucijske metode v bujonu – vrednosti MIC za vse tri antibiotike z ali brez inhibitorja PAβN

V analizo je bilo vključenih 26 bakterijskih izolatov. Od tega jih je bilo 5 identificiranih kot *C. jejuni*, 20 kot *C. coli* eden pa kot *C. spp.* Največ izmed njih je bilo izolatov iz piščančjega mesa (12), iz svinjine in puranjega mesa so bili po 4 izolati, humanega izvora pa je bilo 6 izolatov.

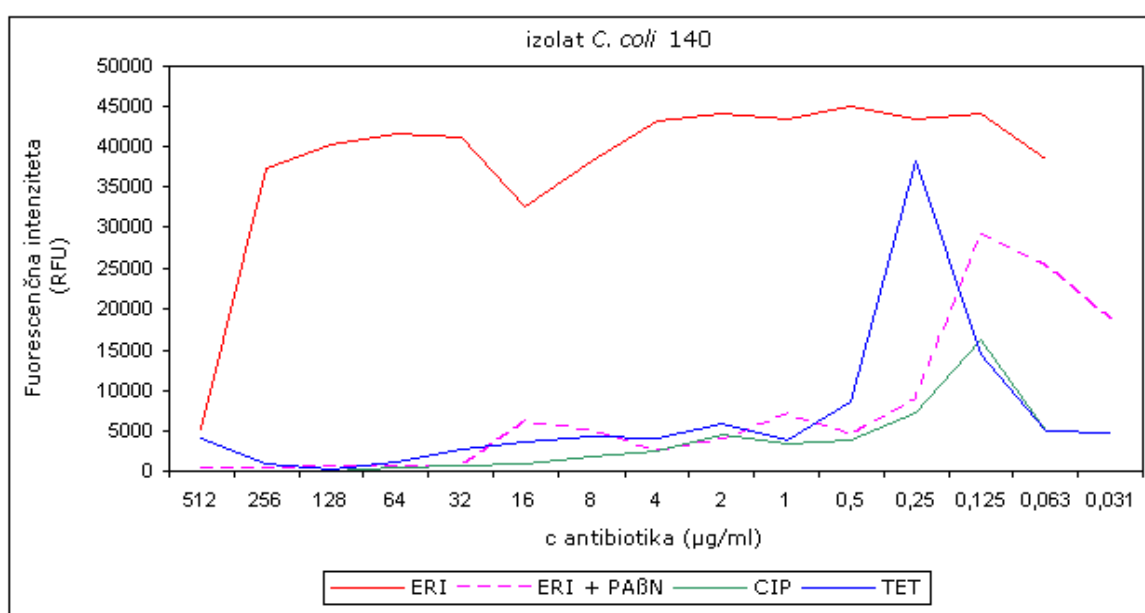
Prvi korak pri določitvi bakterijske odpornosti na posamezen antibiotik je bila določitev koncentracije antibiotika, ki je še inhibirala rast bakterij. S pomočjo mikrodilucijske metode smo določili vrednost MIC za posamezen izolat ob dodatku inhibitorja PAβN ter vrednost MIC ob odsotnosti inhibitorja PAβN. Razmerje obeh vrednosti je pokazalo, koliko membranske izlivne črpalke dejansko vplivajo na povečano bakterijsko odpornost na posamezen antibiotik.

Določitev vrednosti MIC je za vse izolate potekala na enak način. Testiranje je potekalo s tremi različnimi antibiotiki v enakih koncentracijskih območjih (od 512 µg/ml do 0,031 oz. do 0,016 µg/ml). Učinkovitost inhibitorja membranskih izlivnih črpalk je bila izračunana iz razmerja med vrednostma MIC (brez dodatka inhibitorja) ter MIC (ob dodatku inhibitorja). Večja učinkovitost inhibitorja je pomenila, da imajo membransko izlivne črpalke večjo vlogo pri bakterijski odpornosti na določen antibiotik. Zmanjšanje minimalne inhibitorne koncentracije zaradi dodanega antibiotika in inhibitorja membranskih izlivnih črpalk je pomenila, da obe učinkovini delujeta sinergistično na zmanjšanje bakterijske odpornosti, saj inhibitor onemogoča, da molekule antibiotika iz celice izhajajo in tako pripomorejo k večji destrukciji bakterijskih celic.



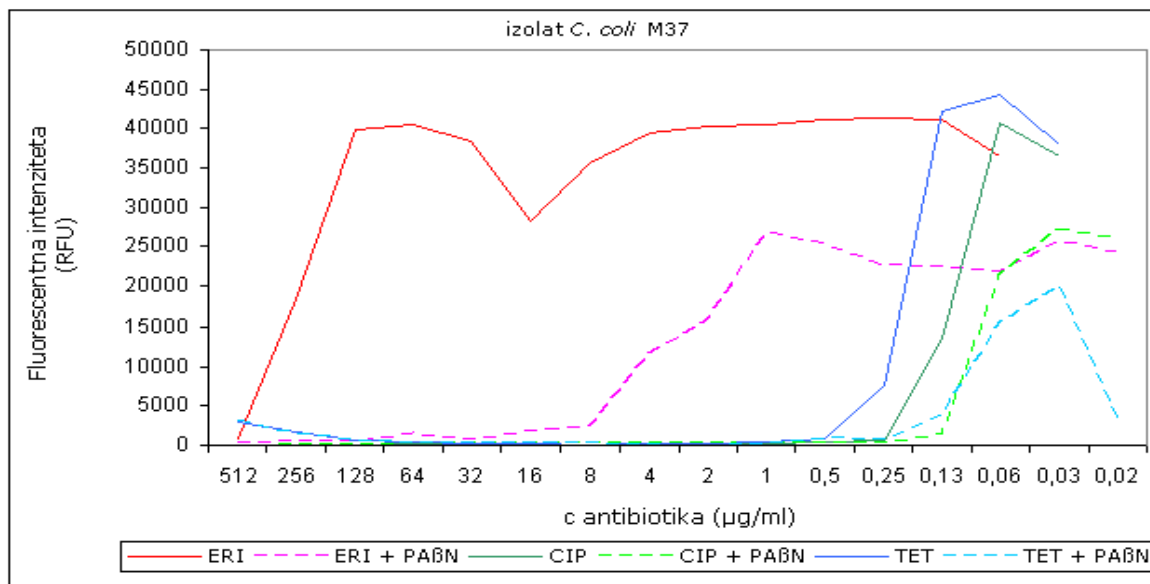
Slika 14: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. coli* 137; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. coli* 137 je bil zelo odporen na eritromicin (slika 14), saj je bila MIC večja od 512 µg/ml. Dodatek inhibitorja je njegovo občutljivost povečal. Odpornost na tetraciklin je bila prav tako visoka, saj je bila vrednost MIC 32 µg/ml, najmanjšo odpornost pa je izolat kazal na ciprofloksacin, saj ga je inhibirala že koncentracija 0,5 µg/ml.



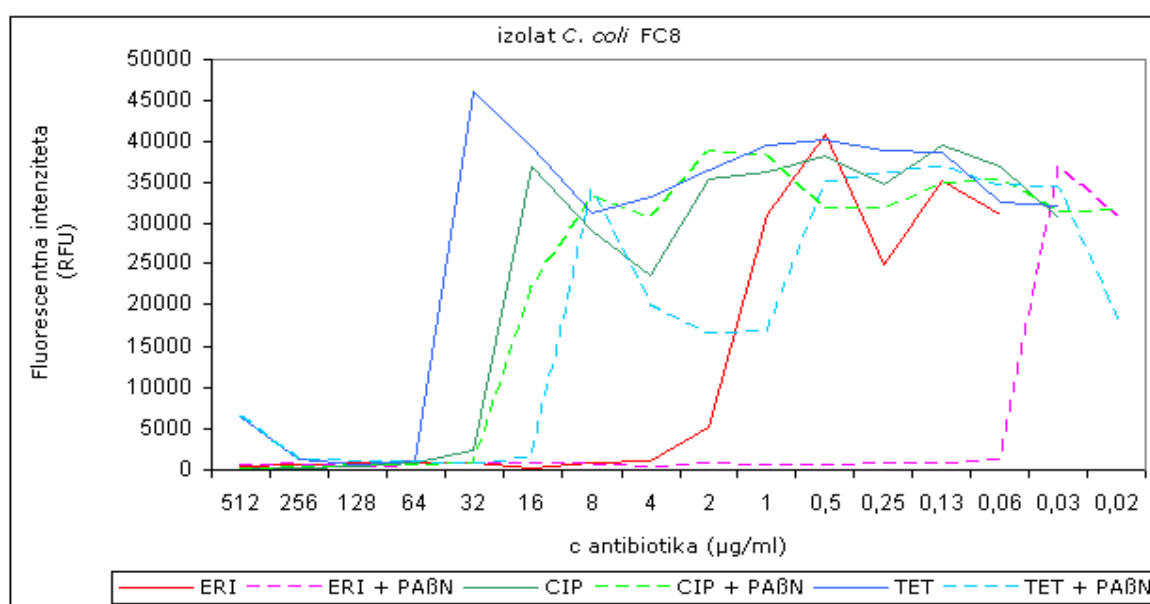
Slika 15: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. coli* 140; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Vrednost MIC za eritromicin je bila pri izolatu *C. coli* 140 večja od 512 $\mu\text{g/ml}$ (slika 15). Učinkovitost inhibitorja je bila najmanj 16, saj je po njegovem dodatku vrednost MIC padla na 32 $\mu\text{g/ml}$. Analizirani izolat je bil na ciprofloksacin in tetraciklin visoko odporen.



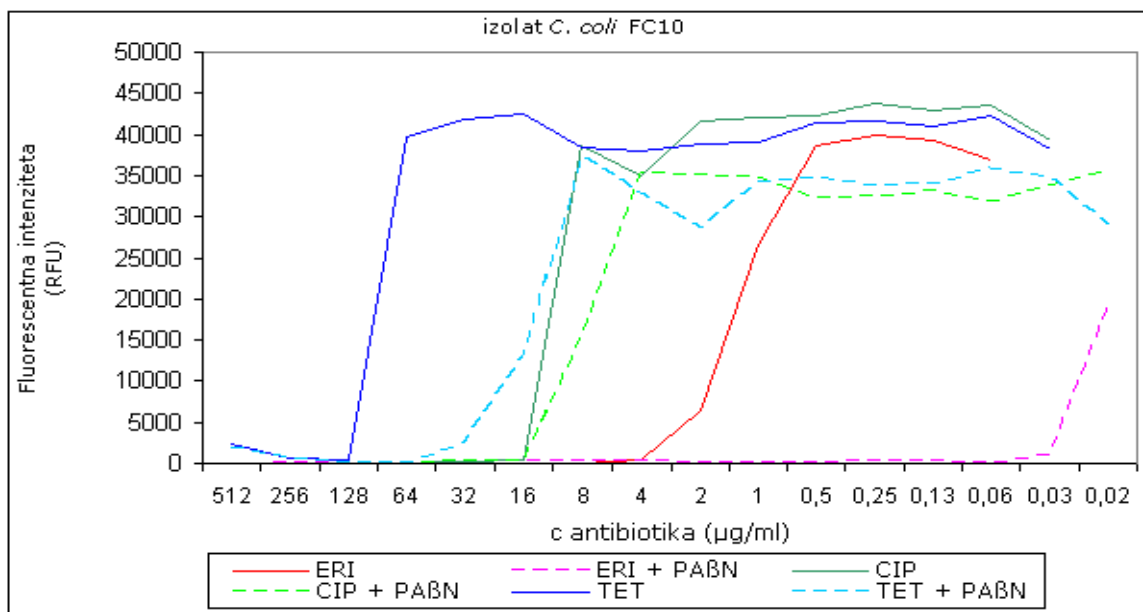
Slika 16: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. coli* M37; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. coli* M37 (slika 16) je bil na dodatek eritromicina dobro odporen, dodatek PAβN pa je odpornost močno zmanjšal (MIC = 81 $\mu\text{g/ml}$). Nizka pa je bila njegova odpornost tako na ciprofloksacin kot tudi na tetraciklin.



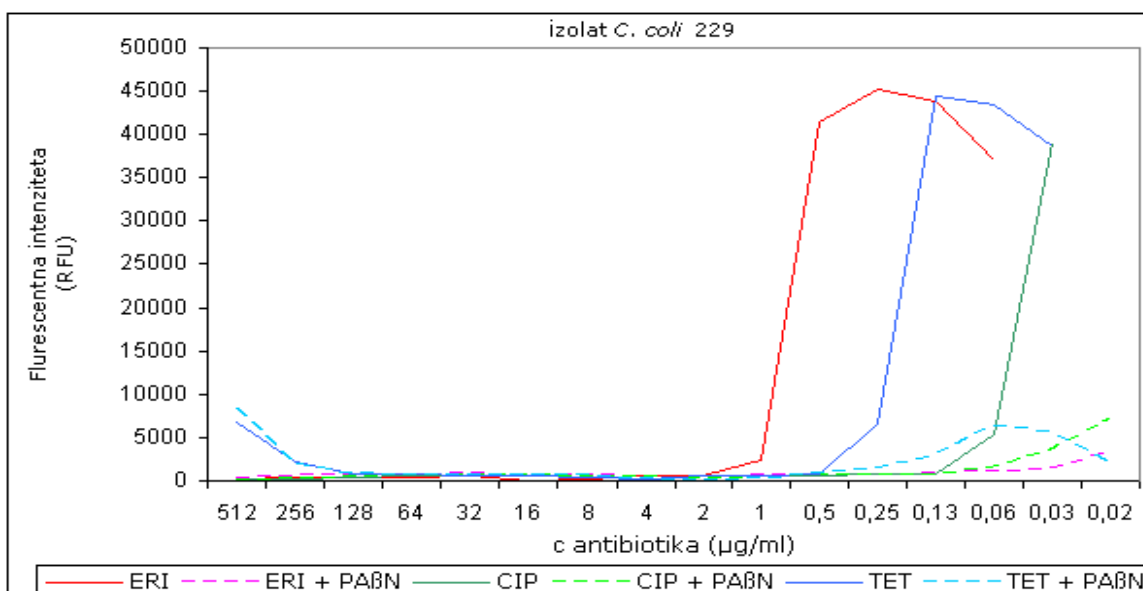
Slika 17: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. coli* FC8; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. coli* FC8 je bil visoko odporen na ciprofloksacin in na tetraciklin (slika 17). Dodatek inhibitorja je občutljivost na oba omenjena antibiotika povečal. Največji učinek inhibitorja (64-krat) je bil ob dodatku eritromicina, saj se je vrednost MIC zmanjšala s 4 $\mu\text{g/ml}$ na 0,063 $\mu\text{g/ml}$.



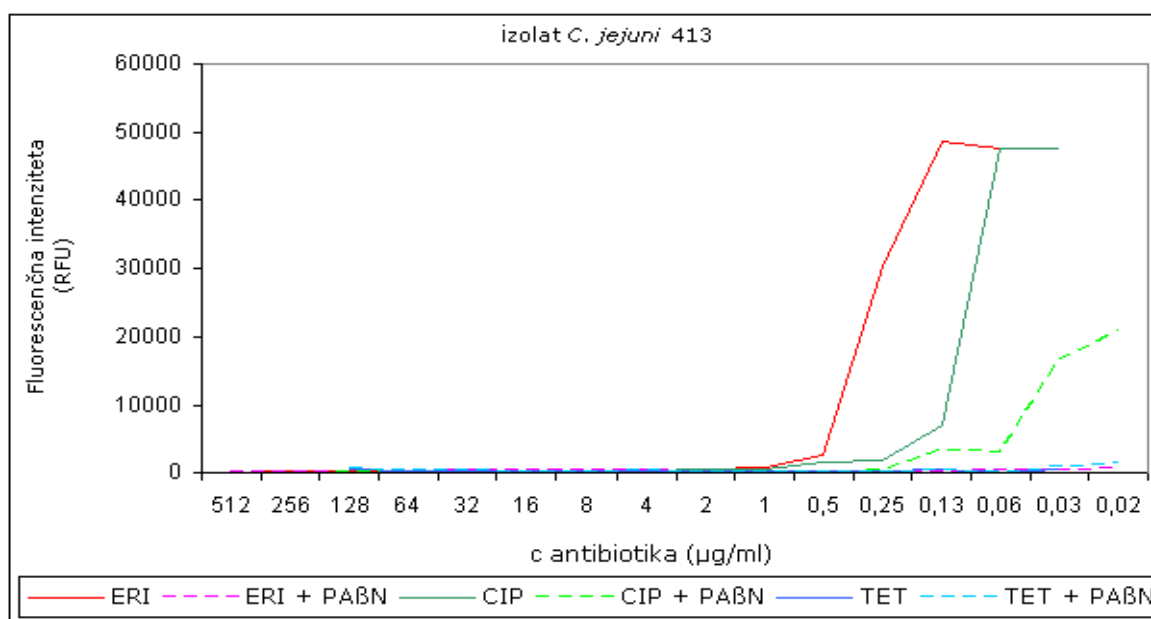
Slika 18: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) ciprofloksacin (CIP), tetraciklin (TET) pri izolat *C. coli* FC10; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Na sliki 18 je videti, da je imel pri izolat *C. coli* FC10 inhibitor največji učinek ob dodatku eritromicina. Dodatek PAβN je razpolovil vrednost MIC pri tetraciklinu. Rezultati so pokazali visoko odpornost na ciprofloksacin, a inhibitor ob dodatku tega antibiotika ni imel nikakršnega učinka.



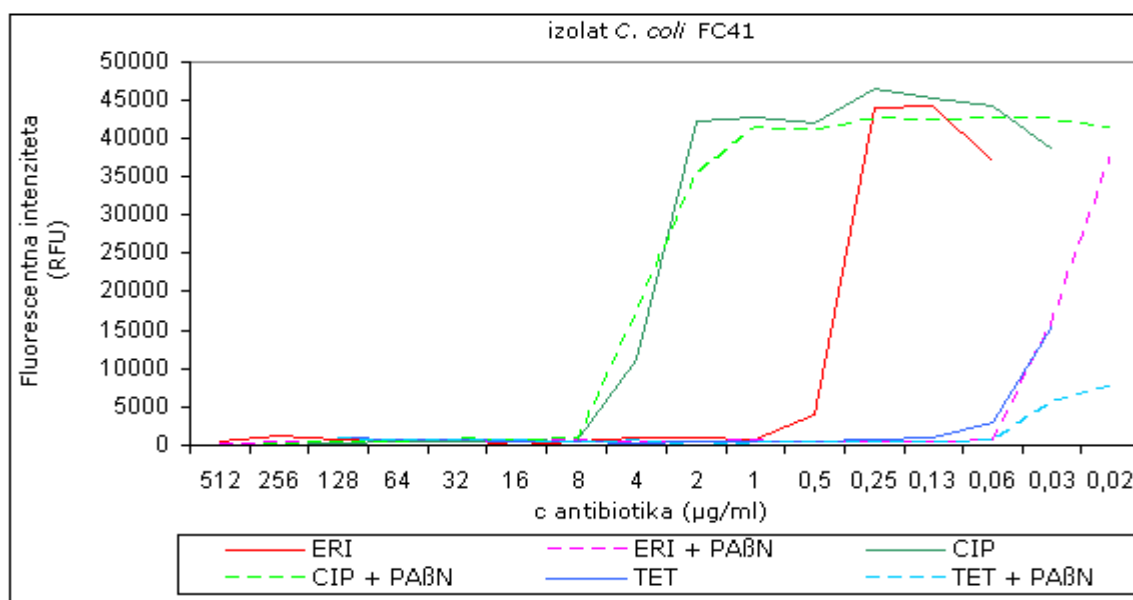
Slika 19: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolat *C. coli* 229; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

PAβN je imel največji učinek ob dodatku eritromicina (slika 19). Izolat ni bil odporen na ciprofloksacin in tetraciklin. Inhibitor ob dodatku obeh antibiotikov ni učinkoval in tako ni pripomogel k povečanju občutljivosti.



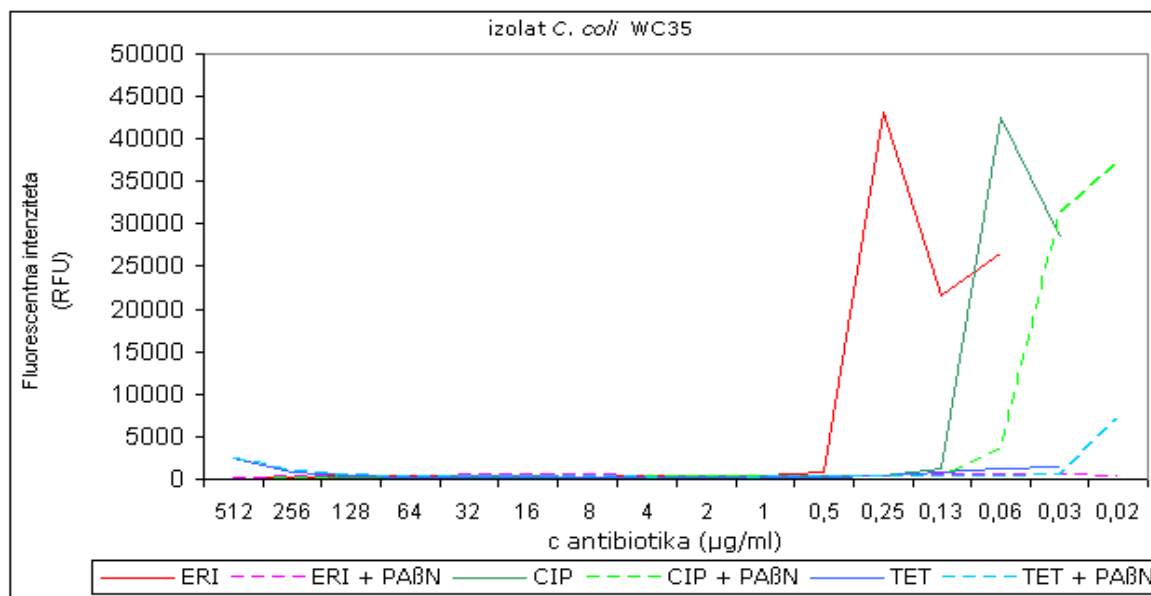
Slika 20: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. jejuni* 413; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. jejuni* 413 ni bil odporen na nobenega izmed dodanih antibiotikov (slika 20). Učinkovitost inhibitorja je bila največja ob dodatku eritromicina. Zaradi dodatka inhibitorja se je vrednost MIC pri ciprofloksacinu zmanjšala za polovico.



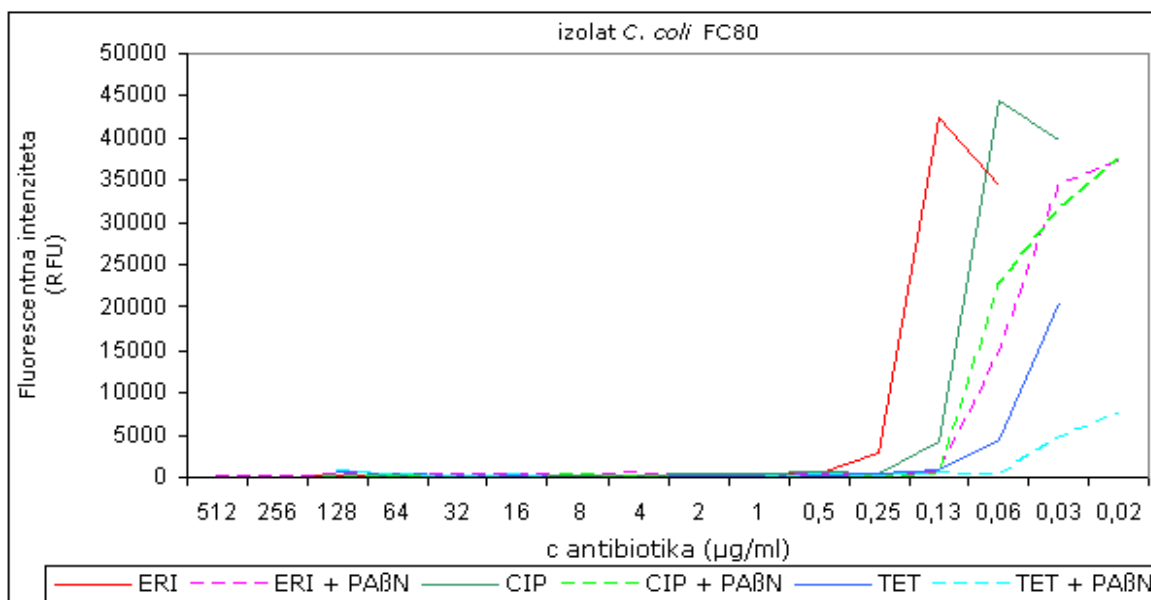
Slika 21: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. coli* FC41; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Iz slike 21 lahko vidimo, da je imel pri izolatu *C. coli* FC41 PAβN največji učinek ob dodatku eritromicina. Dodatek inhibitorja je najbolj povečal občutljivost na eritromicin, nekoliko manj pa na tetraciklin. Analiziran izolat je največjo odpornost kazal na ciprofloksacin, medtem ko je bila odpornost na eritromicin in tetraciklin manjša.



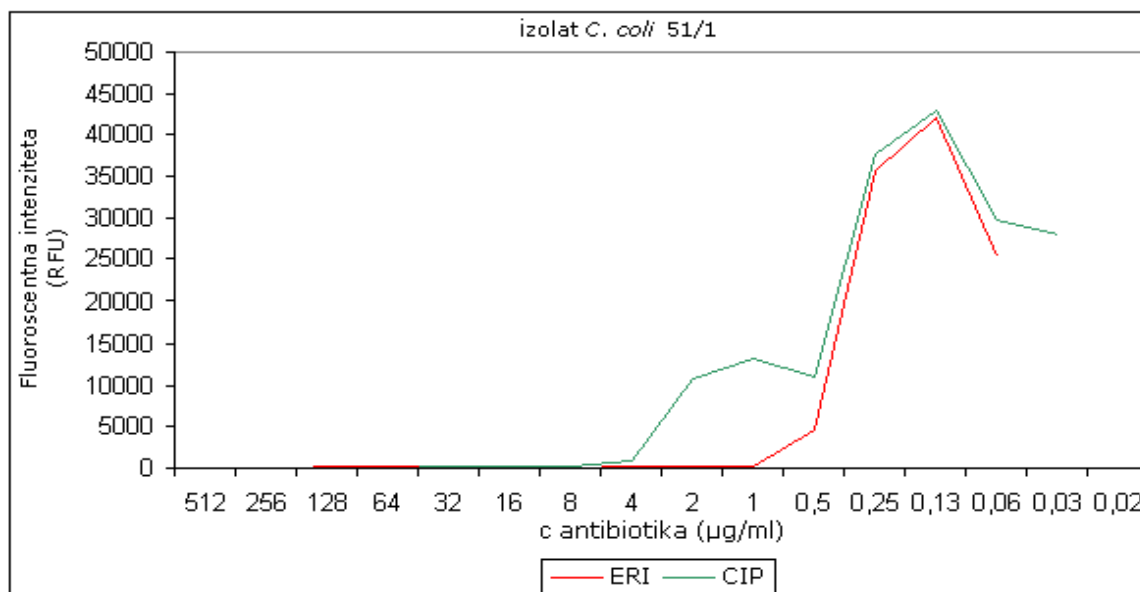
Slika 22: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. coli* WC35; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. coli* WC 35 ni bil odporen na nobenega izmed dodanih antibiotikov (slika 22). Vrednost MIC se je ob dodatku eritromicina in tetraciklina zaradi dodanega inhibitorja zmanjšala za 8-krat, pri dodatku ciprofloksacina pa se je razpolovila.



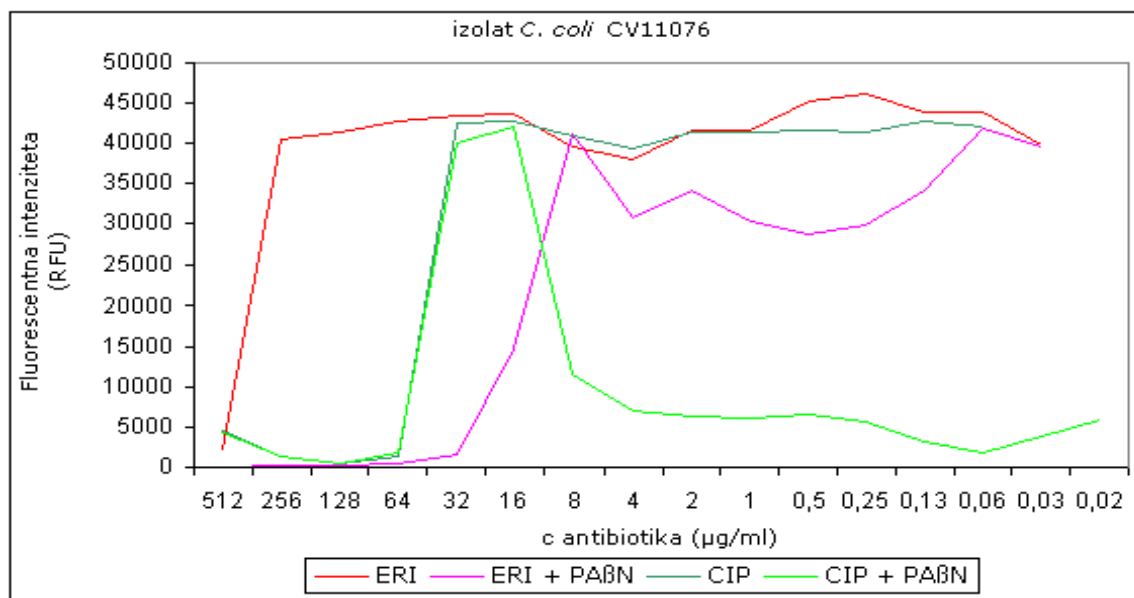
Slika 23: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. coli* FC80; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. coli* FC80 je bil slabo odporen na vse izmed v analizo vključene antibiotike (slika 23). PAβN je imel ob dodatku eritromicina in tetraciklina enak učinek, medtem ko se je zaradi njegovega učinkovanja ob dodanem ciprofloksacinu vrednost MIC razpolovila.



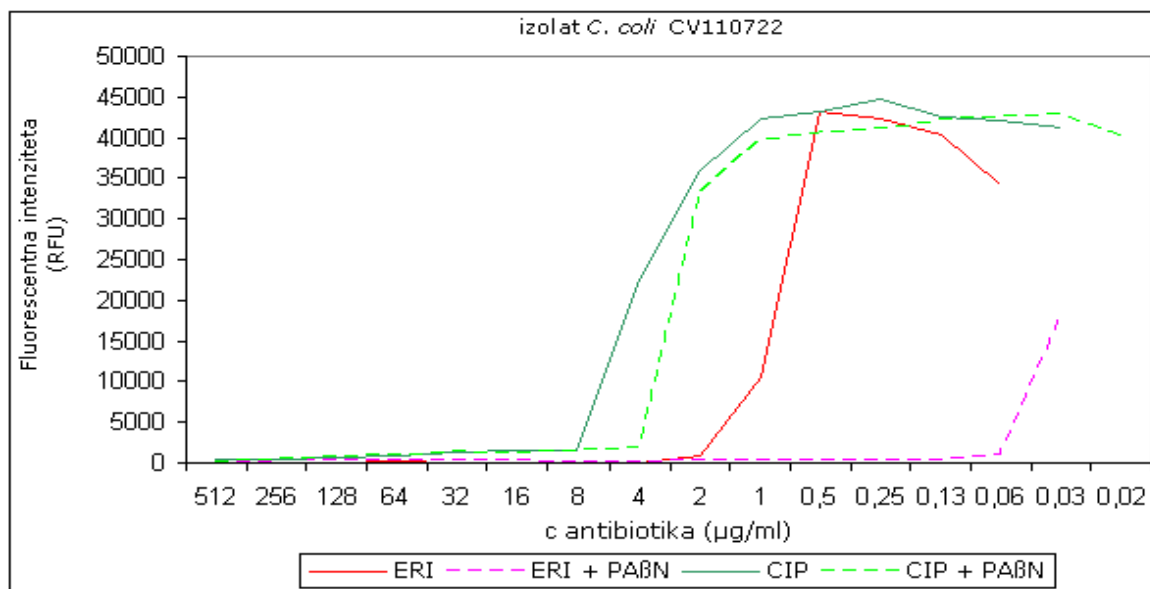
Slika 24: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolat *C. coli* 51/1

Izolat *C. coli* 51/1 je bil občutljiv tako na eritromicin, kot tudi na ciprofloksacin (slika 24). Iz dobljenih rezultatov se ni dalo določiti vrednosti MIC ob dodatku tetraciklina. Prav tako se iz dobljenih rezultatov ni dalo določiti učinkovitosti inhibitorja PAβN.



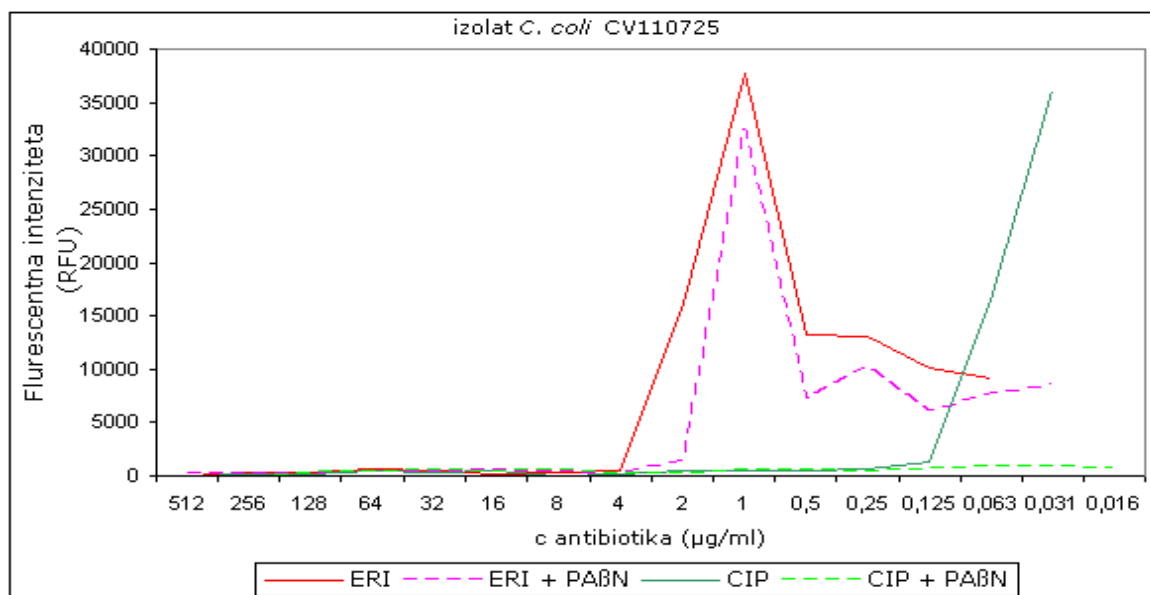
Slika 25: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolat *C. coli* CV11076; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Rezultati so pokazali, da je bil izolat *C. coli* CV11076 dobro odporen na eritromicin in na ciprofloksacin (slika 25). Učinkovitost PAβN je bila največja ob dodatku eritromicina, medtem ko se vrednost MIC ob dodatku ciprofloksacina zaradi prisotnosti PAβN ni zmanjšala.



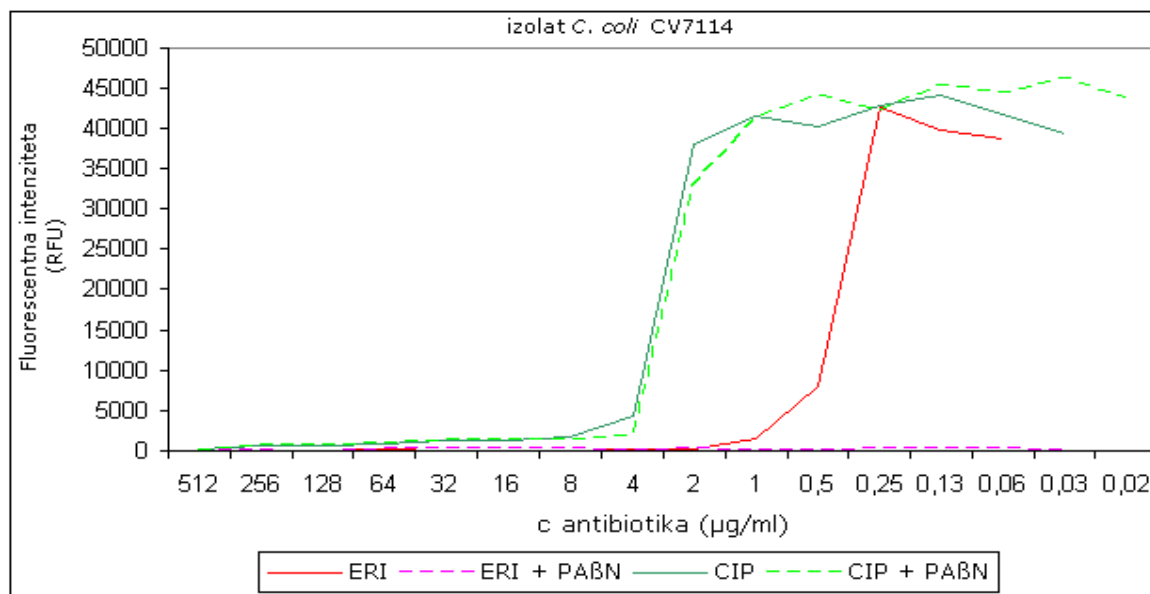
Slika 26: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolatu *C. coli* CV110722; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Pri izolatu *C. coli* CV110722 je imel PAβN največji učinek ob dodatku eritromicina (slika 26). Največja odpornost se je pokazala ob dodatku ciprofloksacina, medtem ko iz dobljenih rezultatov nismo mogli določiti vrednosti MIC pri učinkovanju tetraciklina.



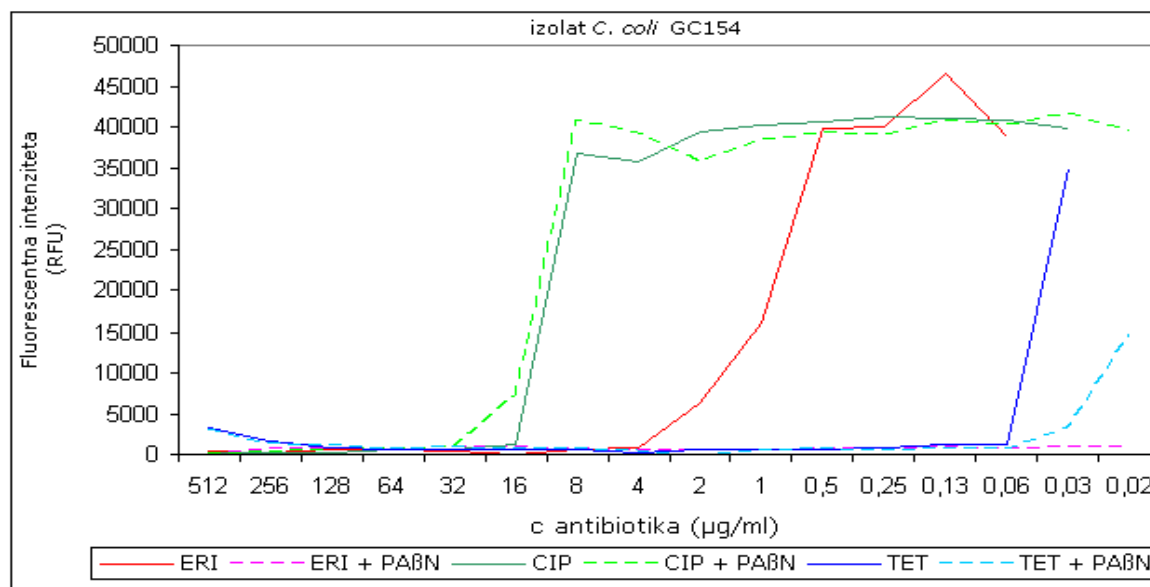
Slika 27: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolatu *C. coli* CV110725; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Pri izolatu *C. coli* CV110725 je imel dodatek PAβN največji učinek ob dodatku ciprofloksacina (slika 27). Inhibitor PAβN je imel učinek tudi ob dodatku eritromicina. Iz dobljenih rezultatov vrednosti MIC pri učinkovanju tetraciklina nismo mogli določiti.



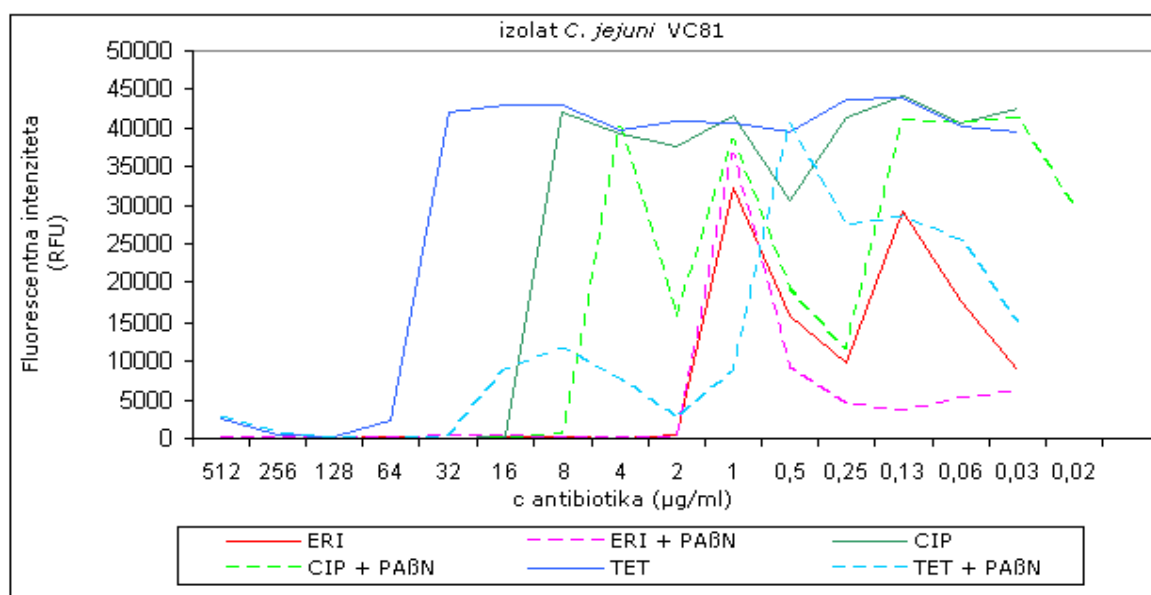
Slika 28: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolatu *C. coli* CV7114; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. coli* CV7114 je imel največjo odpornost na ciprofloksacin, zaradi dodatka PAβN pa se bakterijska občutljivost ni povečala (slika 28). Dodatek PAβN je imel učinek le ob dodatku eritromicina. Iz dobljenih rezultatov vrednosti MIC za tetraciklin nismo mogli določiti.



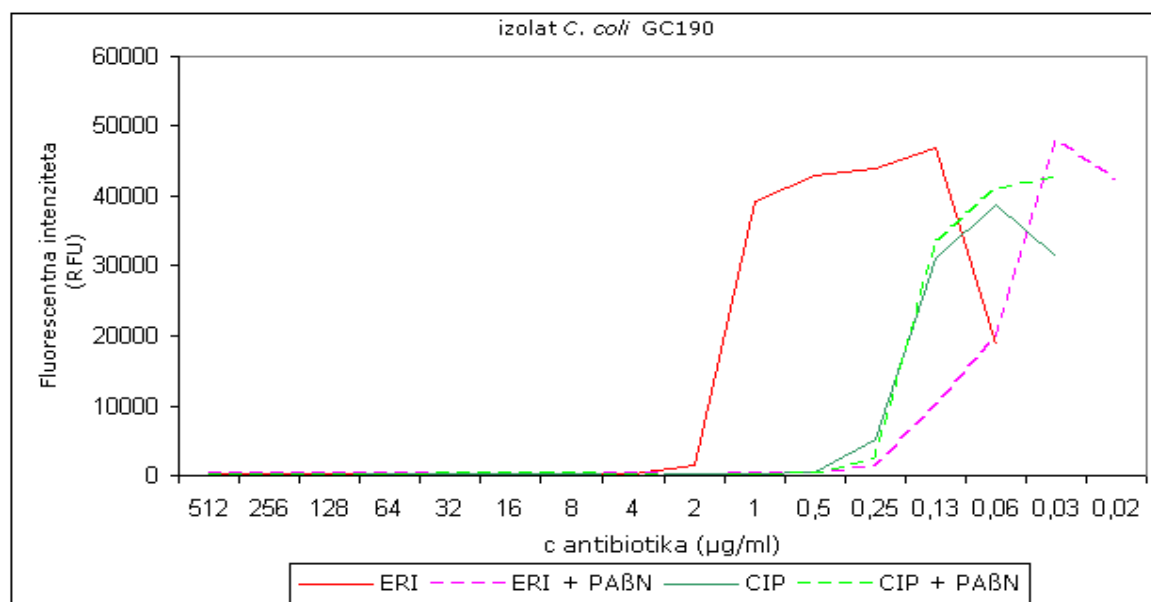
Slika 29: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. coli* GC154; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. coli* GC154 je bil izmed treh testiranih antibiotikov visoko odporen le na ciprofloksacin, medtem ko je bil na eritromicin in tetraciklin občutljiv (slika 29). PAβN je imel učinek le ob dodatku eritromicina pri ostalih dveh antibiotikih pa inhibitor ni imel učinka.



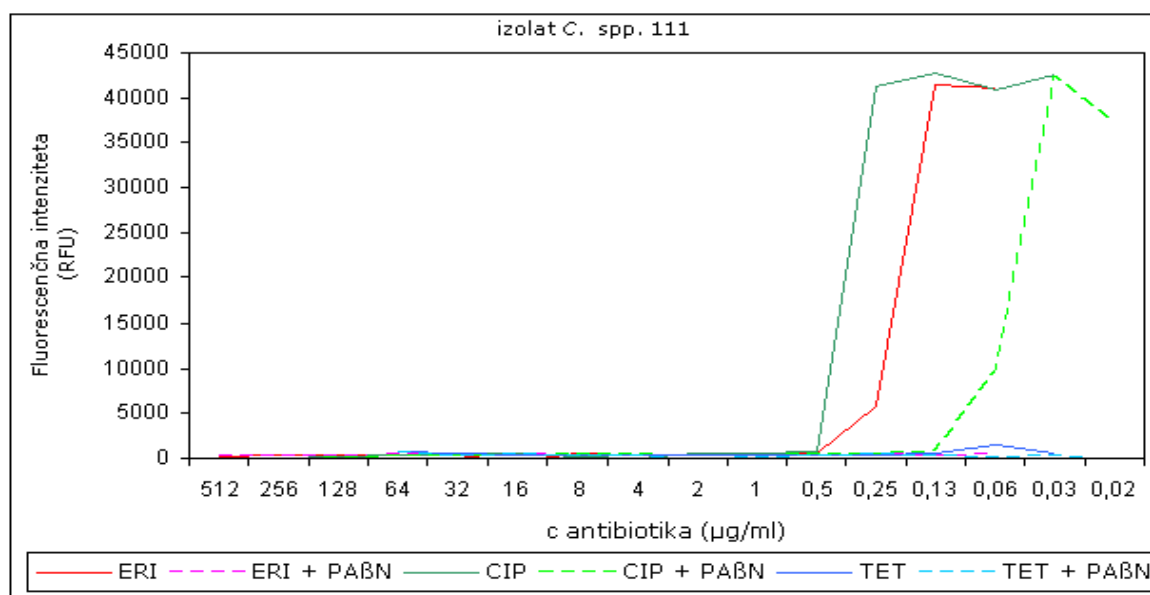
Slika 30: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. jejuni* VC81; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Iz rezultatov je razvidno, da je bil izolat *C. jejuni* VC81 dobro odporen na tetraciklin in na ciprofloksacin, na eritromicin pa je bil občutljiv (slika 30). Inhibitor PAβN je učinkoval le ob dodatku ciprofloksacina in tetraciklina, ob dodatku eritromicina pa njegovega učinka nismo zaznali.



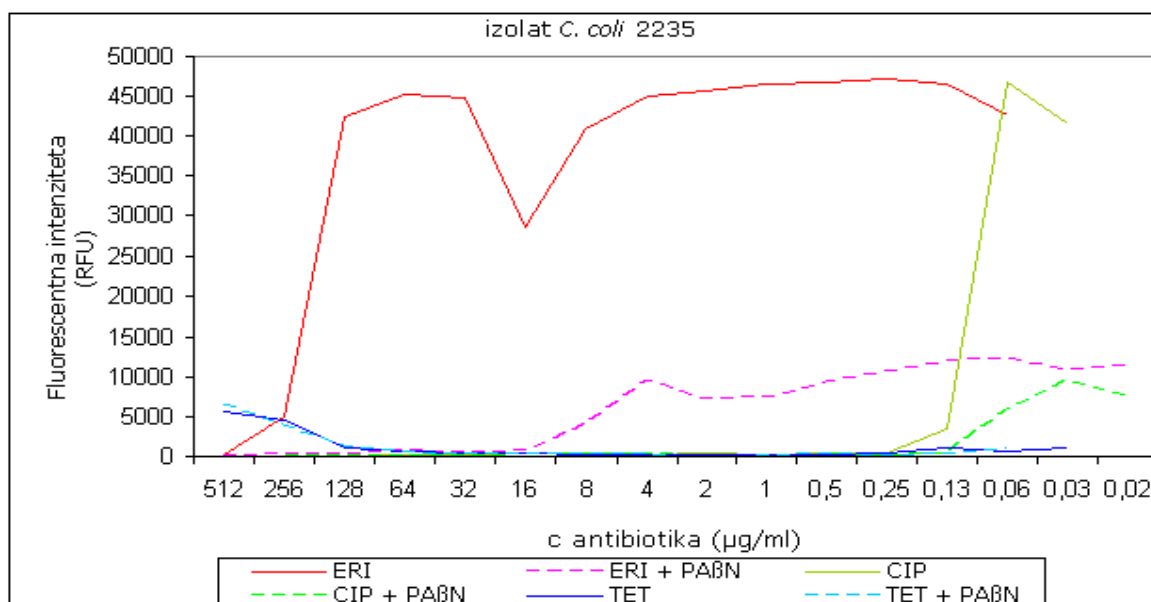
Slika 31: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolatu *C. coli* GC190; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Iz rezultatov, dobljenih za izolat *C. coli* GC190, nismo mogli določiti vrednosti MIC za tetraciklin (slika 31). Na ostala antibiotika je bil izolat občutljiv. Dodatek inhibitorja PAβN je občutljivost povečal le pri eritromicinu, saj se je vrednost MIC znižala za 8-krat.



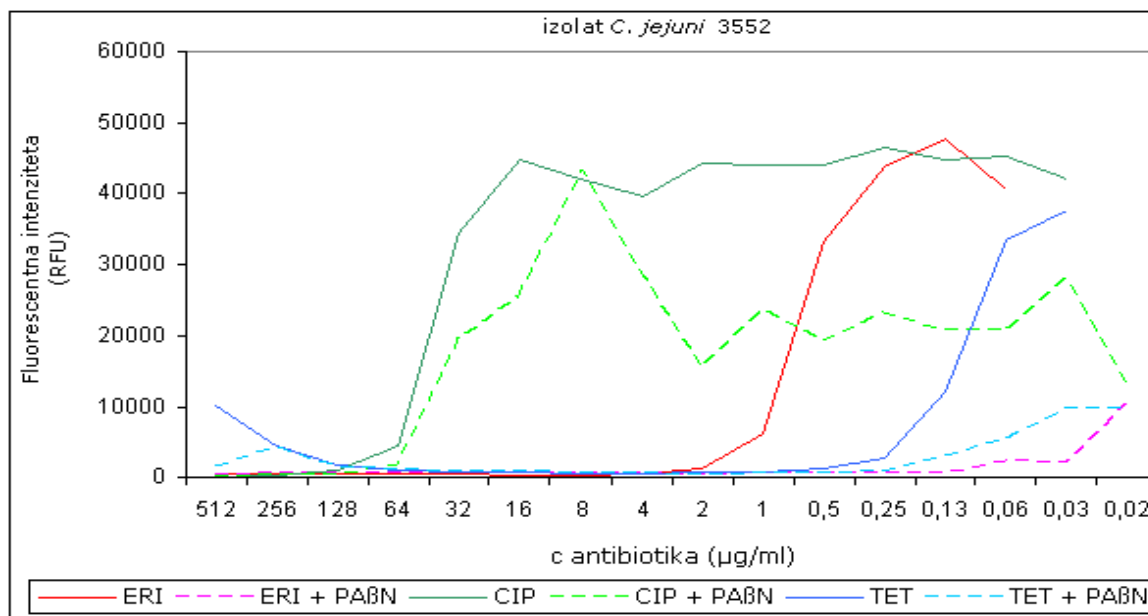
Slika 32: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. spp.* 111; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. spp.* 111 je kazal majhno odpornost na vse tri dodane antibiotike (slika 32). Ob dodatku PAβN, je prišlo do največjega učinka pri eritromicinu ter pri ciprofloksacinu. Občutljivost na tetraciklin se zaradi dodatka inhibitorja ni povečala.



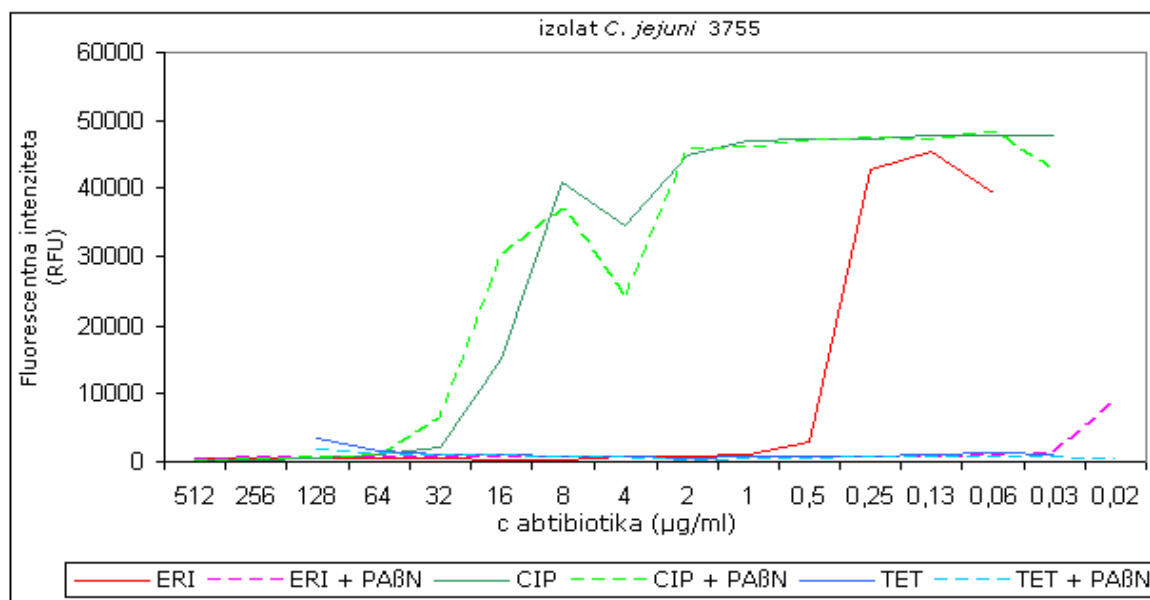
Slika 33: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. coli* 2235; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Največja odpornost se je pokazala pri učinkovanju eritromicina (slika 33). Po dodatku inhibitorja se je občutljivost bakterijskih celic na ta antibiotik povečala za 32-krat. Učinek dodatka PAβN je bil opazen tudi pri učinkovanju ciprofloksacina.



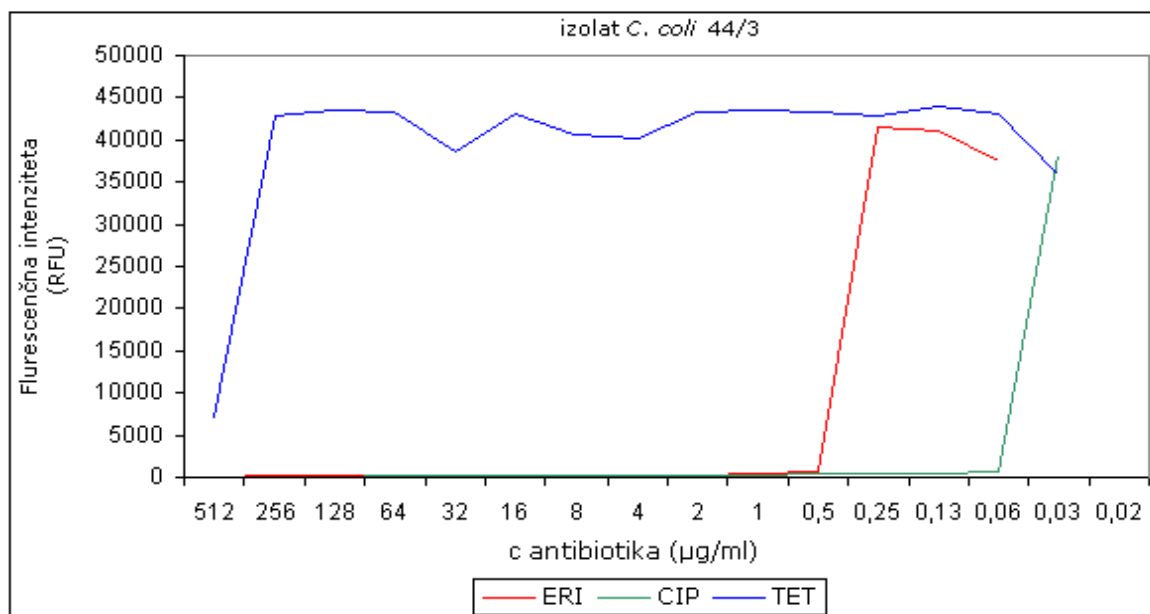
Slika 34: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. jejuni* 3552; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. jejuni* 3552 je pokazal največjo odpornost na ciprofloksacin (slika 34). Dodatek PAβN pri tem antibiotiku ni prispeval k zmanjšanju vrednosti MIC. Manjša odpornost se je pokazala pri učinkovanju eritromicina in tetraciklina.



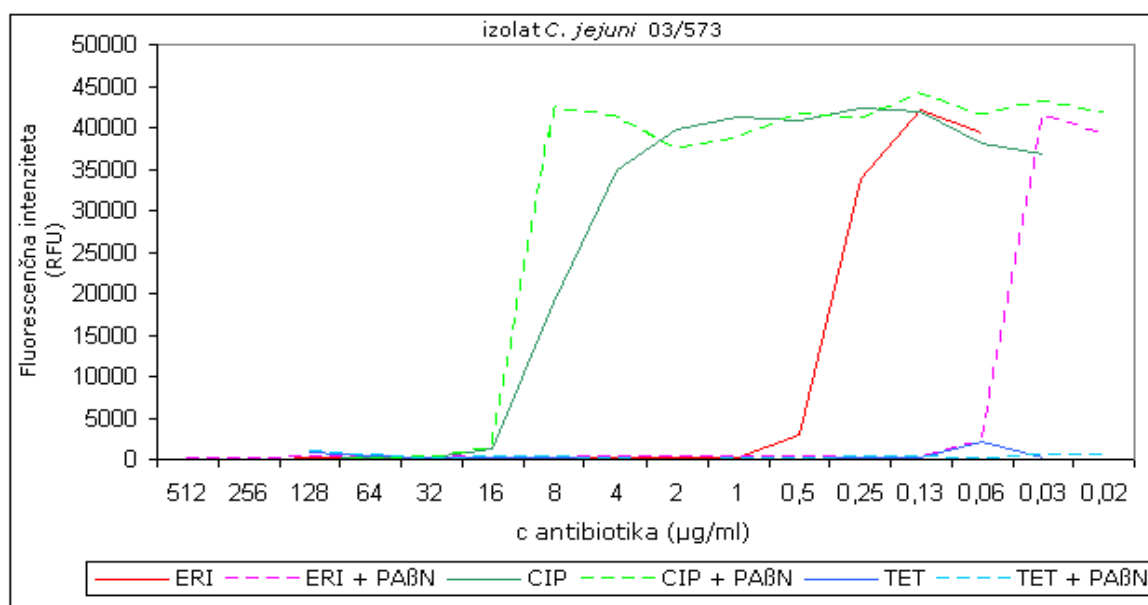
Slika 35: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. jejuni* 3755; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Rezultati so pokazali dobro bakterijsko odpornost na ciprofloksacin, vendar se vrednost MIC po dodatku inhibitorja PAβN ni zmanjšala (slika 35). Izolat *C. jejuni* 3755 pa je bil občutljiv tako na eritromicin, kot tudi na tetraciklin. PAβN je imel učinek le ob dodatku eritromicina.



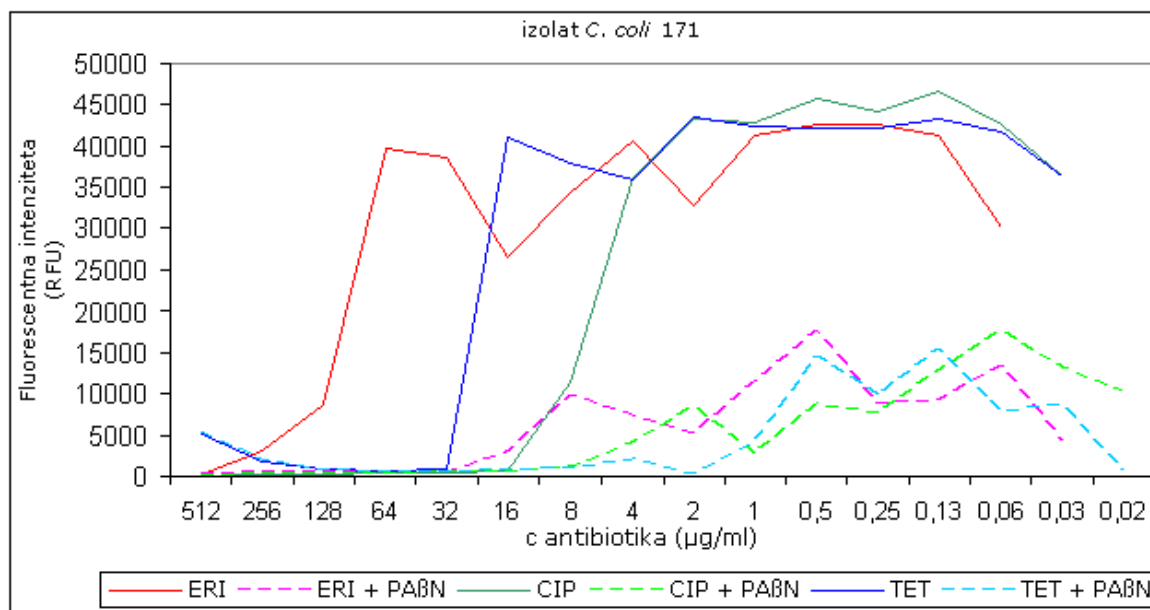
Slika 36: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI), ciprofloksacin (CIP) in tetraciklin (TET) pri izolatu *C. coli* 44/3; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. coli* 44/3 je bil dobro odporen le na tetraciklin, saj je njegovo rast in razmnoževanje inhibirala koncentracija antibiotika 512 µg/ml. Slabo pa je bil odporen na eritromicin in ciprofloksacin (slika 36).



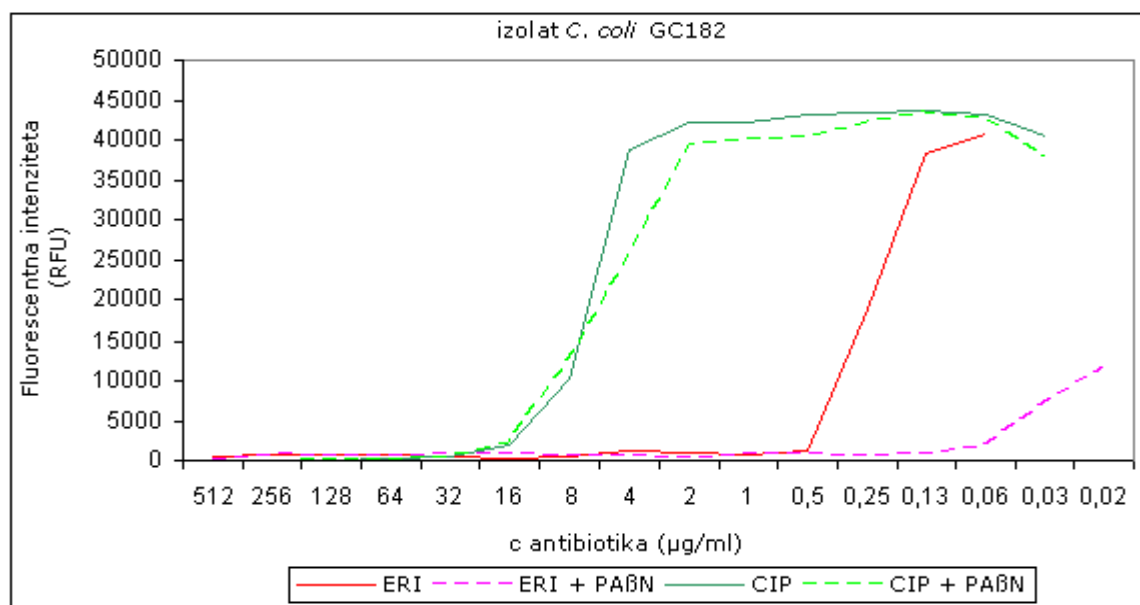
Slika 37: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) ciprofloksacin (CIP), tetraciklin (TET) pri izolatu *C. jejuni* 03/573; PAßN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Inhibitor PAßN je prispeval k zmanjšanju vrednosti MIC le ob dodatku eritromicina. Ob dodatku ciprofloksacina in tetraciklina, inhibitor ni učinkoval. Izolat *C. jejuni* 03/573 je bil odporen le na ciprofloksacin, saj je MIC znašal 32 µg/ml (slika 37).



Slika 38: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) ciprofloksacin (CIP), tetraciklin (TET) pri izolatu *C. coli* 171; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. coli* 171 je bil odporen na vse tri antibiotike (slika 38). PAβN je imel največji učinek ob dodatku eritromicina, nekoliko manjšega pa ob dodatku tetraciklina. Ob dodatku ciprofloksacina PAβN ni imel učinka.



Slika 39: Določitev minimalne inhibitorne koncentracije za eritromicin (ERI) in ciprofloksacin (CIP) pri izolatu *C. coli* GC182; PAβN = inhibitor membranskih izlivnih črpalk

Izolat *C. coli* GC182 je bil odporen na ciprofloksacin, na eritromicin pa je bil občutljiv, saj je vrednost MIC znašala 0,5 µg/ml. (slika 39). Učinek dodatka PAβN je bil opazen le pri eritromicinu, saj se je odpornost zmanjšala (MIC = 0,125 µg/ml).

Preglednica 11: Zbirna preglednica rezultatov, prikazanih na slikah 14 do 39

IZOLATI PO IZVORU	VRSTA	UČINKOVANJE ERITROMICINA			UČINKOVANJE CIPROFLOKSACINA			UČINKOVANJE TETRACIKLINA		
		MIC (µg/ml)	MIC+ PAβN (µg/ml)	U	MIC (µg/ml)	MIC+ PAβN (µg/ml)	U	MIC (µg/ml)	MIC+ PAβN (µg/ml)	U
PIŠČANČJE MESO										
137	<i>C. coli</i>	>512	32	>16	0,5	0,25	2	32	NP	
140	<i>C. coli</i>	>512	32	>16	32	NP		64	NP	
M 37	<i>C. coli</i>	512	16	32	0,5	0,250	2	1	0,250	4
171	<i>C. coli</i>	512	32	16	16	16	1	32	8	4
FC 8	<i>C. coli</i>	4	0,125	32	64	32	2	64	16	4
FC 10	<i>C. coli</i>	4	0,063	64	16	16	1	128	64	2
229	<i>C. coli</i>	2	0,031	64	0,125	0,125	1	0,5	0,5	1
44/3	<i>C. coli</i>	1	0,063	16	0,063	NP		512	NP	
FC 41	<i>C. coli</i>	1	0,063	16	8	8	1	0,125	0,063	2
WC 35	<i>C. coli</i>	0,5	<0,063	>8	0,125	0,063	2	0,25	0,031	8
FC 80	<i>C. coli</i>	0,5	0,125	4	0,25	0,125	2	0,250	0,063	4
51/1	<i>C. coli</i>	1	0,063	16	4	NP		NP	NP	
SVINJINA										
CV 11076	<i>C. coli</i>	>512	32	16	64	64	1	NP	NP	
CV 110722	<i>C. coli</i>	4	0,063	64	64	16	4	NP	NP	
CV 110725	<i>C. coli</i>	4	2	2	0,25	<0,016	>16	64	NP	
CV 7114	<i>C. coli</i>	2	<0,063	>32	64	64	1	NP	NP	
PURANJE MESO										
GC 154	<i>C. coli</i>	4	<0,063	>64	16	16	1	0,063	0,063	1
VC 81	<i>C. jejuni</i>	2	2	1	16	8	2	128	32	4
GC 182	<i>C. coli</i>	0,5	0,125	4	32	32	1	NP	NP	
GC 190	<i>C. coli</i>	2	0,25	8	0,5	0,5	1	NP	NP	
HUMANI IZVOR										
111	<i>C. spp.</i>	0,5	<0,063	>8	0,5	0,125	4	<0,031	<0,016	2
2235	<i>C. coli</i>	512	16	32	0,25	0,125	2	<0,031	<0,031	1
3552	<i>C. jejuni</i>	2	0,125	16	128	128	1	0,5	0,250	2
3755	<i>C. jejuni</i>	1	0,031	32	32	32	1	<0,031	<0,016	2
413	<i>C. jejuni</i>	1	<0,063	>16	0,5	0,250	2	<0,031	<0,016	2
03/573	<i>C. jejuni</i>	1	0,125	8	32	32	1	<0,031	<0,016	2

LEGENDA: NP = ni podatka
 U = merilo učinkovitosti inhibitorja PAβN

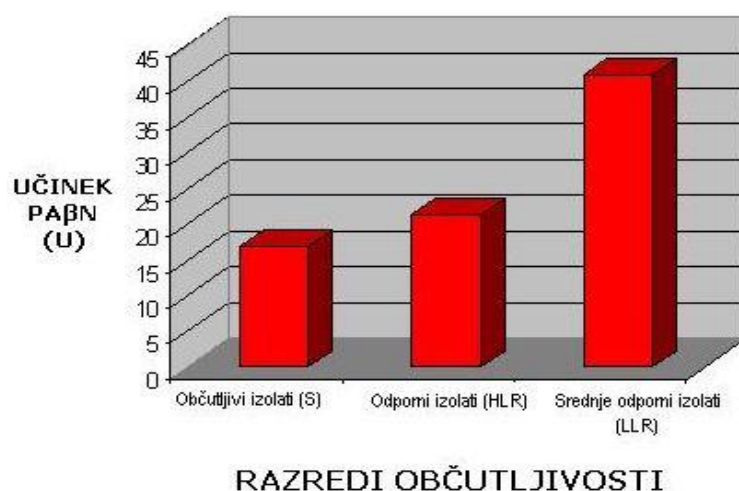
2 Učinek inhibitorja glede na občutljivost sevov za eritromicin

Glede odpornosti na antibiotik eritromicin smo izolate kampilobakterjev razdelili na tri razrede: odporni izolati (vrednost MIC večja ali enaka 16 µg/ml), srednje odporni izolati ($4 \mu\text{g/ml} \leq \text{MIC} < 16 \mu\text{g/ml}$) ter občutljivi izolati ($\text{MIC} \leq 4 \mu\text{g/ml}$). Izmed analiziranih izolatov je bilo na eritromicin odpornih (HLR) 6, 5 jih je bilo srednje odpornih (LLR), 15 pa občutljivih (S). Glede na izvor sevov smo HLR in LLR izolate našli v vseh skupinah, največ pa jih je bilo med izolati, katerih izvor je bilo piščančje in svinjsko meso (preglednica 11).

Preglednica 12: Učinek inhibitorja membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov za eritromicin

RAZREDI OBČUTLJIVOSTI VRSTA ANTIBIOTIKA	UČINEK INHIBITORJA (U)			Povprečni U
	Odporni izolati (HLR) ($\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g/ml}$)	Srednje odporni izolati (LLR) ($4 \mu\text{g/ml} \leq \text{MIC} < 16 \mu\text{g/ml}$)	Občutljivi izolati (S) ($\text{MIC} < 4 \mu\text{g/ml}$)	
Eritromicin	21	41	17	28

Preglednica 12 prikazuje vrednosti U za posamezne izolate, preglednica 13 pa povprečne vrednosti U pri delovanju PAβN v posameznih skupinah sevov, glede na njihove odpornosti proti eritromicinu. Vrednost U je bila najvišja pri LLR izolatih, saj se je vrednost MIC pri njih v povprečju zmanjšala za 41-krat. LLR izolati so torej imeli najbolj aktiven mehanizem membranskih izlivnih črpalk, saj so jim le-te omogočile bistveno večjo odpornost na ta antibiotik. Inhibitor PAβN je imel najmanjši učinek pri S izolatih, malenkostno večjega pa je imel pri HLR izolatih. Tako lahko trdimo, da prisotnost membranskih izlivnih črpalk ni bil edini mehanizem, ki je vplival na povečano odpornost HLR izolatov na eritromicin. Rezultati so pokazali, da so imeli tudi S izolati aktiven mehanizem membranskih izlivnih črpalk, saj se je vrednost MIC pri omenjenem antibiotiku zaradi dodatka PAβN zmanjšala v povprečju za 17-krat.



Slika 40: Učinek inhibitorja (PAβN) na zmanjšanje vrednosti MIC za eritromicin

3 Učinek inhibitorja glede na občutljivost sevov za ciprofloksacin in tetraciklin

Med 23 analiziranimi sevi, za katere samo uspeli zbrati popolne rezultate odpornosti in učinku inhibitorja, je bilo na ciprofloksacin odpornih 13 sevov, na tetraciklin pa 8. Največji delež HLR izolatov je bil piščančjega izvora.

Če primerjamo te rezultate s tistimi ki so bili dobljeni pri učinkovanju eritromicina, lahko vidimo, da je imel inhibitor PAβN pri dodatku teh dveh antibiotikov precej manjši učinek (U). Njegov učinek je bil nekajkrat manjši, saj v nobenem primeru ni večji od vrednosti 4, kar je razvidno iz preglednice 13. Vzrok različnega učinka inhibitorja na občutljivost izolatov za eritromicin, ciprofloksacin in tetraciklin bi lahko bil pojasnen z različno aktivnostjo inhibitorja do dveh ali več membranskih izivnih sistemov.

Preglednica 13: Delež odpornih sevov na eritromicin in učinek inhibitorja membranskih izlivnih črpalk glede na občutljivost izolatov za ciprofloksacin in tetraciklin

RAZREDI OBČUTLJIVOSTI VRSTA ANTIBIOTIKA	ŠTEVILO IZOLATOV			Povprečni U
	Odporni izolati (HLR) (MIC ≥ 16 μg/ml)	Srednje odporni izolati (LLR) (4 μg/ml ≤ MIC < 16 μg/ml)	Občutljivi izolati (S) (MIC < 4 μg/ml)	
Ciprofloksacin	13	1	9	2
Tetraciklin	8	0	12	4

4 Večkratna odpornost izolatov proti antibiotikom (MDR)

Kot MDR izolat smo označili izolat, ki je bil odporen na vsaj dva od treh antibiotikov. Za spodnjo vrednost MIC, ki je še pomenila odpornost izolata na antibiotik smo glede na večino literaturnih virov izbrali koncentracijo 4 μg/ml. Dobljeni rezultati so podani v preglednici 14.

Preglednica 14: Večkratno odporni izolati glede na njihov izvor

IZVOR IZOLATOV	ŠTEVILO IZOLATOV	ŠTEVILO MDR IZOLATOV	MDR (%)
Piščančje meso	12	5	42
Svinjina	4	3	75
Puranje meso	4	2	50
Humani izvor	6	0	0
Skupno število izolatov	26	10	38

Izmed 26 izolatov, ki smo jih vključili v eksperimentalni del, smo fenotip MDR določili pri 10 izolatih. Rezultati so pokazali, da je bil MDR prisoten le pri izolatih živilskega izvora, medtem ko ga pri izolatih kliničnega izvora nismo določili. Število preizkovanih sevov je bilo sicer za taka opažanja zelo majhno, vendar je vseeno zanimivo, da smo največji delež določili pri izolatih, ki so bili izolirani iz svinjine in puranjega mesa. Malenkostno nižji je bil delež izolatov fenotipa MDR pri izolatih, ki so bili piščančjega izvora.

Pri izolatih piščančjega izvora so bili na vse tri antibiotike odporni štirje izolati, eden pa na dva (preglednica 11). Izolat, ki so bili izolirani iz svinjine, smo določili odpornost na tetraciklin le pri enem izolatu. Podobni so rezultati pri izolatih, ki so bili izolirani iz puranjega mesa. Fenotip MDR je bil prisoten pri dveh, pri ostalih dveh pa fenotipa MDR nismo določili.

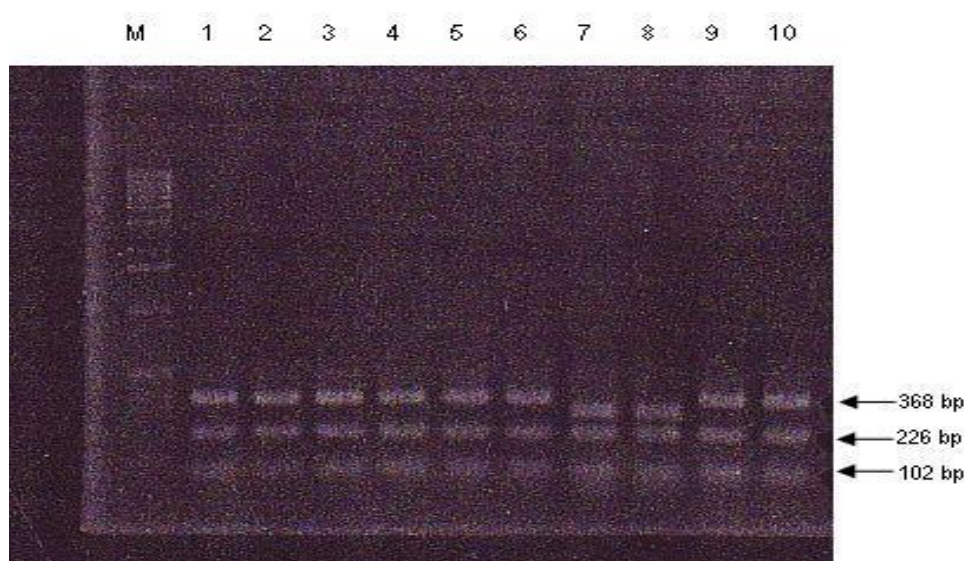
5 Določanje točkovne mutacije na 23S rRNA z metodo PCR-RFLP

V analizo smo vključili predvsem tiste izolate, pri katerih smo z mikrodilucijsko metodo določili vrednosti MIC za eritromicin večje od 2 µg/ml. Koncentracija molekul DNA je bila pri vseh izolatih enaka in je znašala 25 ng/µl. Določili smo jo tako, da smo izolirani DNA (za vsak izolat posebej) izmerili absorbance pri valovnih dolžinah 260nm in 280nm. Iz razmerja A (260/280) smo določili potreben volumen raztopine DNA za analizo. Rezultati so prikazani v preglednici 12.

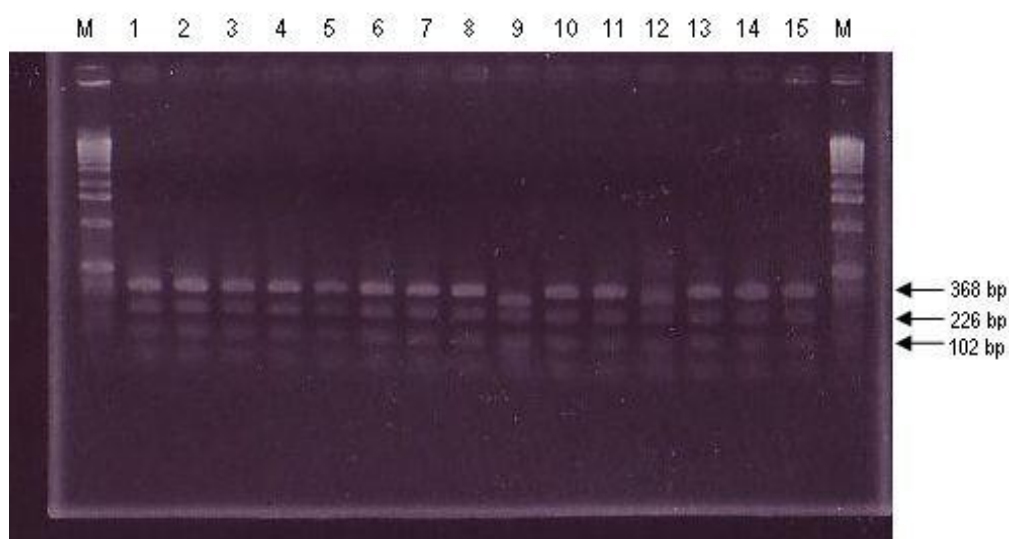
Preglednica 15: Postopek priprave koncentracije DNA 25 ng/µl

IZOLAT	A (260/280)	c DNA (ng/µl)	µl dodane DNA	µl dodane dH ₂ O
<i>C. coli</i> GC154	2,0537975	3245	0,7704	99,2296
<i>C. coli</i> GC182	1,8918919	700,0	3,5714	96,4286
<i>C. coli</i> GC190	2,0268456	3020	0,8278	99,1722
<i>C. coli</i> FC8	2,0693069	2090	1,1962	98,8038
<i>C. coli</i> FC10	1,9101124	1700	1,4706	98,5294
<i>C. coli</i> FC41	1,9293478	1775	1,4085	98,5915
<i>C. coli</i> FC80	1,9288889	2170	1,1521	98,8479
<i>C. jejuni</i> VC81	1,9682540	2480	1,0081	98,9919
<i>C. coli</i> WC35	1,8630137	2040	1,2255	98,7745
<i>C. coli</i> CV7114	1,7857143	1125	2,2222	97,7778
<i>C. coli</i> CV11076	1,7944664	2270	1,1013	98,8987
<i>C. coli</i> CV110722	1,9433962	1545	1,6181	98,3819
<i>C. coli</i> CV110725	1,8798587	2660	0,9398	99,0602
<i>C. coli</i> M37	1,9827586	1150	2,1739	97,8261

Prisotnost točkovne mutacije na *23S rRNA* bi pomenila, da ta prispeva k povečani odpornosti analiziranih izolatov kampilobakterjev na eritromicin. Po postopku izolacije DNA smo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) pomnoževali fragment gena *23S rRNA*. Po pričakovanju smo dobili pomnožek dolžine 714 bp. Restriksijske analize 714 bp velikega pomnožka je z encimom *BsmAI* omogočila detekcijo točkovne mutacije (slika 41 in 42). Občutljivi izolati na eritromicin so imeli 4 fragmente DNA različnih velikosti (102 bp, 368 bp, 226 bp ter 18 bp). Pri odpornih izolatih, ki so imeli mutacijo (A→G), je le-ta za uporabljeni encim ustvarila dodatno restriksijsko mesto. V tem primeru smo dobili 5 fragmentov, in sicer: 102 bp, 311 bp, 226 bp, 57 bp in 18 bp. Ker je imel fragment velikosti 368 bp dodatno restriksijsko mesto, ga je restriksijski encim razgradil v dva fragmenta: 311 bp in 57 bp.



Slika 41: Restriksijski vzorci pomnoženega gena *23S rRNA* po restrikciji z restriksijskim encimom *BsmAI* izolatov vrst *C. coli* in *C. jejuni*. M: molekularni označevalec dolžin 1 kbp. Na progah 7 in 8 je pri izolatih *C. coli* 137 in *C. coli* 140 5 fragmentov, kar potrjuje odpornost na eritromicin. Ostale proge (1-6 in 9-10) imajo 4 fragmente, kar dokazuje, da mutacija ni bila prisotna.



Slika 42: Restriksijski vzorci pomnoženega gena *23S rRNA* po restrikciji z restriksijskim encimom *BsmAI* izolatov vrst *C. coli*. M: molekularni označevalec dolžin 1 kbp. Na progah 9 in 12 je pri izolatih *C. coli* M37 in *C.*

coli CV 11076 5 fragmentov, kar potrjuje odpornost na eritromicin. Ostale proge imajo 4 fragmente, kar dokazuje, da mutacija ni bila prisotna.

Preglednica 16: Rezultati ugotavljanja prisotnosti točkovne mutacije na pomnoženi sekvenci *23S rRNA*

Prisotnost (+) / odsotnost (-) točkovne mutacije na sekvenci <i>23S rRNA</i>	OZNAKA IZOLATOV
+ prisotnost mutacije (A2075G)	<i>C. coli</i> 137, <i>C. coli</i> 140, <i>C. coli</i> CV11076, <i>C. coli</i> M37
- odsotnost mutacije (A2075G)	<i>C. coli</i> GC154, <i>C. coli</i> GC182, <i>C. coli</i> FC8, <i>C. coli</i> FC10, <i>C. coli</i> FC41, <i>C. coli</i> FC80, <i>C. coli</i> FC 41, <i>C. jejuni</i> VC81, <i>C. coli</i> WC35, <i>C. coli</i> CV7114, <i>C. coli</i> CV11076, <i>C. coli</i> CV110722, <i>C. coli</i> CV110725, <i>C. jejuni</i> 3755*, <i>C. jejuni</i> 413*, <i>C. jejuni</i> 03/573*, <i>C. coli</i> 44/3*, <i>C. coli</i> 51/1*, <i>C. coli</i> FC41*, <i>C. coli</i> spp. 111*, <i>C. jejuni</i> 03/573*

* izolati, kateri so imeli vrednost MIC manjšo od 2 µg/ml in jim zato ni bil opravljen poizkus ugotavljanja prisotnosti točkovne mutacije na sekvenci *23S rRNA*

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

1 RAZPRAVA

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

V številnih zahodnoevropskih državah so v zadnjih dvajsetih letih opazili povečano odpornost kampilobakterjev na različne antibiotike. Uporaba protimikrobnih sredstev v veterinarski in humani medicini pa tudi kot pospeševalcev rasti v moderni, intenzivni reji živali, namenjenih za prehrano ljudi, je vplivala na povečanje bakterijske odpornosti proti različnim antibiotikom (Quinn in sod., 2006).

Engberg in sod. (2001) ugotavljajo, da gre razloge za naraščajočo prevalenco odpornih izolatov proti fluorokinolonom iskati v 90-letih prejšnjega stoletja, ko so v številnih državah uvedli uporabo tega antibiotika v veterinarski medicini in v prireji perutnine. Zaradi tega je ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) v letu 2004 umaknila dovoljenje za uporabo enrofloksacina kot rastnega promotorja in za zaščito pred bakterijskimi okužbami s perutninskim mesom. Podoben ukrep je sprejela tudi EU, saj je po odobritvi uporabe enrofloksacina v letu 1991, osem let kasneje predlagala njegovo omejitev (Gallay in sod., 2007).

Kljub naraščanju odpornosti kampilobakterjev na fluorokinolone in makrolide se te vrste antibiotikov najpogosteje uporablja pri zdravljenju kampilobakterioz. Uporabo antibiotikov zasledimo zlasti pri hujših primerih infekcije (pri dolgotrajnejši bolezni), ki je posledica okužbe s kampilobakterji, ki so na antibiotike odporni. Neučinkovito zdravljenje lahko pripelje do resnejših zdravstvenih težav, lahko tudi do večjega tveganja za smrt bolnika (Quinn in sod., 2006).

Kurinčič in sod. (2005) v svoji študiji, ki so jo opravili s testiranjem izolatov kampilobakterjev, izoliranih iz piščančjega mesa v slovenskem prostoru, poročajo o visoki odpornosti testiranih bakterij na fluorokinolone. Izmed 55 izolatov jih je bilo na ciprofloksacin odpornih 32. Njihovi rezultati kažejo, da je bila odpornost na omenjeno skupino antibiotikov najvišja, saj je bila odpornost tako na tetraciklin kot tudi na makrolide ugotovljena pri manjšem številu izolatov. Do podobnih zaključkov so prišli tudi van Looveren in sod. (2001), ki so testirali odpornost kampilobakterjev v belgijskem prostoru ter Pezzotti in sod. (2003), ki so odpornost na fluorokinolone proučevali v Italiji.

Izmed 26 izolatov kampilobakterjev, ki smo jih vključili v eksperimentalni del te naloge, je bilo na ciprofloksacin odpornih 54 %, na tetraciklin 38 % na eritromicin pa 23 % testiranih izolatov. Čeprav je bilo število izolatov, vključenih v eksperimentalni del diplomske naloge relativno majhno, smo torej prišli do podobnih deležev odpornih sevov, kot jih navaja literatura. Večji je bil le delež sevov, odpornih na eritromicin. Vendar pa ga ne moremo primerjati z literaturnimi

podatki, ker smo pri izboru sevov prednost namenili tistim, ki so se v predhodnih poskusih izkazali kot odporni proti eritromicinu.

V naslednjih korakih smo želeli ugotoviti, kateri obrambni mehanizem pri bakterijah prevladuje oziroma kateri je najučinkovitejši. Naši rezultati so potrdili ugotovitve, da sta v povečano bakterijsko odpornost vključena tako sistem membranskih izlivnih črpalk, kot tudi točkovne mutacije na genu *23S rRNA*.

2 Večkratna odpornost proti antibiotikom

Največjo skrb pri zdravljenju infekcij s kampilobakterji zbuja zlasti njihova odpornost na makrolide in fluorokinolone. Veliko tveganje za zdravje ljudi predstavlja zlasti dolgo trajanje bolezni, saj lahko privede do številnih zapletov pri nadaljnem zdravljenju. Vsak izolat, ki je odporen na nek antibiotik, predstavlja tveganje za zdravljenje in tveganje za prenos odpornosti na druge izolate (Quinn in sod., 2006).

Senok in sod. (2007) so v svojem delu določevali odpornost 117 humanih in 33 piščančjih sevov kampilobakterjev na Arabskem polotoku. Na eritromicin sta bila odporna le dva humana izolata, medtem ko avtorji ugotavljajo, da je bilo na ciprofloksacin odpornih več kot 80 % humanih ter tudi piščančjih izolatov. Rezultati odpornosti sevov na tetraciklin pa kažejo, da je bilo na ta antibiotik odpornih več izolatov, ki so bili piščančjega izvora. Obsežnejšo raziskavo so napravili tudi Parisi in sod. (2007), ki so ugotavljali odpornost 79 izolatov kampilobakterjev na antibiotike v jugovzhodnem delu Italije. Izolati so bili najbolj odporni na cefalotin (100 %), nekoliko manj pa na ampicilin (94 %) in amoksiciklin (94 %). Na enrofloksacin je bilo odpornih 34 % izolatov, na tetraciklin 22 % na eritromicin pa 10 % izolatov.

Zanimivi so rezultati, ki smo jih dobili iz našega eksperimentalnega dela. MDR fenotip je bil določen pri 38 % izolatov. Največji delež MDR izolatov je bil določen pri svinjini, določili smo ga tudi pri izolatih, ki so bili izolirani iz puranjega in piščančjega mesa. Zanimiv je tudi podatek, da pri izolatih humanega izvora MDR fenotipa nismo določili. Iz tega bi lahko sklepali, da so izolati živilskega izvora razvili bolj učinkovite mehanizme za povečano odpornost na antibiotike. Vzroke za razvoj mehanizmov, ki bakterijam omogočajo večjo odpornost na antibiotike gre tako lahko iskati tudi v njihovi uporabi v veterinarski medicini in v prireji živali.

3 Metodika ugotavljanja odpornosti bakterij *Campylobacter* spp. na eritromicin, ciprofloksacin in tetraciklin

V eksperimentalni del smo vključili 26 izolatov *Campylobacter coli*, *C. jejuni* in *C. spp.* Vsakemu izmed njih smo določili minimalno koncentracijo antibiotika, ki je še inhibirala njihovo metabolično aktivnost. Uporabili smo mikrodilucijsko metodo na mikrotiterskih ploščicah. Metoda se je pokazala kot zelo enostavna, hitra ter dobro ponovljiva. Vsakemu izolatu smo vrednost MIC izmerili trikrat, dobljene vrednosti pa se med seboj niso bistveno razlikovale. Časovna analiza ni bila zamudna, saj smo za rezultate treh izolatov potrebovali okoli 6 ur dela. Živost bakterijskih celic smo določili z dodatkom reagenta CellTiter-Blue™ in s spremljanjem fluorescenčne intenzitete (RFU) z optičnim čitalcem mikrotiterskih ploščic. Prisotnost membranskih izlivnih črpalk in njihovo vpletenost v mehanizem bakterijske odpornosti

proti testiranim antibiotikom smo ugotavljali z dodatkom inhibitorja PAβN, ki je inhibiral delovanje membranskih izlivnih črpalk.

1 Določanje vrednosti MIC in učinkovitost inhibitorja PAβN z mikrodilucijsko metodo

Uporaba mikrodilucijske metode za določanje vrednosti MIC do danes še ni tako uveljavljena. Avtorji študij, v katerih so določali bakterijsko odpornost na posamezne protimikrobne snovi, so se posluževali drugih metod. Tako so Mamelli in sod. (2003), Payot in sod. (2004) uporabljali agar dilucijsko metodo na ploščah, Ge in sod. (2002) pa so uporabljali agar dilucijsko metodo v bujonu, metodo difuzije v agarju z diski ter E-test.

Največja prednost uporabe mikrodilucijske metode je bila, da je analiza potekala v majhnem volumnu, dodajali smo majhne volumne reagentov in kulture, načini razredčevanja raztopin pa časovno niso bili zamudni. Metoda je sicer avtomatizirana in lahko poteka za več izolatov hkrati. Slabost te metode je v uporabi aparatur, ki so v primerjavi z ostalimi metodami dražje. Bakterijsko živost lahko spremljamo na čitalcu mikrotiterskih ploščic preko merjenja luminiscence, fluorescence ali absorbance. Glavni dejavniki pri izbiri metode so fizikalno-kemijske lastnosti gojišč ter barvila, ki jih pri analizi uporabljamo.

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

2 Določanje točkovnih mutacij z metodo PCR

V analizo ugotavljanja točkovnih mutacij, kot vzroka za povečano odpornost, je bilo vključenih 15 izolatov. Ker je točkovna mutacija ključna za povečano bakterijsko odpornost samo na eritromicin, smo izolate izbrali za analizo glede na vrednosti MIC, dobljene pri učinkovanju eritromicina.

Določili smo le točkovno mutacijo na 2075. mestu gena *23S rRNA*, kjer je bila dušikova baza adenin zamenjana z gvaninom (A2075G). Posledica prisotnosti te mutacije je bila, da je bilo ustvarjeno dodatno restrikcijsko mesto, ki ga je restrikcijski encim *BsmAI* lahko razgradil. Tako smo pri odpornih izolatih na eritromicin dobili na gelu po elektroforezi 5 fragmentov. Rezultat je prikazan na slikah 41 in 42.

To mutacijo smo dokazali le pri štirih izolatih, in sicer pri: *C. coli* 137, *C. coli* 140, *C. coli* CV11076 in pri *C. coli* M37. Za vse našete izolate smo z mikrodilucijsko metodo določili vrednost MIC za eritromicin večjo ali enako 512 µg/ml (preglednica 11, stran 52). Pri vseh našetih izolatih je imel inhibitor membranskih izlivnih črpalk tudi učinek, kar pomeni, da so imele bakterije razvita oba mehanizma za povečanje bakterijske odpornosti. Tako lahko sklepamo, da sta imela točkovna mutacija in izčrpavanje antibiotika iz celice vzajemni učinek na povečano odpornost na eritromicin. Visoko vrednost MIC na eritromicin je imel tudi izolat *C. coli* 2235, a zaradi neopravljene izolacije DNA in nadaljnje analize določitve točkovne mutacije na *23S rRNA* ne moremo sklepati ali je bila prisotna ali ne.

4 Vloga izlivnih membranskih črpalk in točkovnih mutacij pri oblikovanju MDR fenotipa

V zadnjih letih smo zasledili objavo številnih študij, v katerih avtorji obravnavajo mehanizme, ki bakterijam, med drugim tudi *Campylobacter* spp., omogočajo večjo odpornost na različne protimikrobne snovi. Točkovne mutacije, ki omogočajo povečano odpornost kampilobakterjev tako proti eritromicinu kot tudi proti ciprofloksacinu, so znane že nekaj časa. Zlasti v devetdesetih letih prejšnjega stoletja so znanstveniki začeli posvečati vedno večjo pozornost k iskanju ostalih mehanizmov, kateri pomembno vplivajo na povečano bakterijsko odpornost. Membranske izlivne črpalke so ene najpomembnejših izmed njih. Njihovo prisotnost so dokazali pri številnih (taksonomsko si med seboj različnih) bakterijah.

Ker se membranske izlivne črpalke med seboj razlikujejo po zgradbi, načinu delovanja ter po izčrpavanju specifičnih protimikrobnih snovi, jih danes uvrščamo v pet večjih skupin (razredov). Lin in sod. (2002) so v svoji raziskavi preučevali delovanje in zgradbo membransko-proteinskega sistema pri kampilobakterjih. Navedli so, da je zgrajen iz treh različnih beljakovinskih struktur in je lociran v membrani bakterijske celice. Ge in sod. (2005) pa so objavili točno sekvenco genoma, ki kodira zapis za sintezo posameznih komponent membranske izlivne črpalke. Avtorji navajajo, da so bakterije z njihovo pomočjo zmožne iz svoje notranjosti izčrpavati številne (po kemijski zgradbi raznolike) protimikrobne snovi. Poleg različnih antibiotikov omenjajo tudi barvila, težke kovine, žolčne soli in detergente (Lin in sod., 2002). Pri povečani odpornosti na makrolide in fluorokinolone (kinolone) igrajo pomembno vlogo tudi točkovne mutacije na specifičnem delu genoma. Na povečano odpornost proti kinolonom vpliva mutacija v regiji QRDR na genu *GyrA*. Točkovna mutacija na ribosomski podenoti 23S *rRNA* pa prispeva k povečani odpornosti proti makrolidom.

V eksperimentalnem delu diplomske naloge smo proučevali vpliv točkovne mutacije na 23S *rRNA* ter vpliv aktivnosti membranskih izlivnih črpalk na povečano odpornost celic kampilobakterjev na antibiotike: eritromicin, ciprofloksacin ter tetraciklin. Dobljene rezultate smo nato primerjali z rezultati iz različnih študij ter tako ugotavljali, na katere antibiotike deluje membranski izlivni mehanizem (CmeABC) in kako deluje točkovna mutacija na 23S *rRNA*. Pred pričetkom eksperimentalnega dela smo predpostavili, da membransko izlivna črpalka črpa iz bakterijske celice vse tri vrste uporabljenih antibiotikov, vendar smo želeli ugotoviti, na katero izmed njih ima največji učinek. Predpostavili smo tudi, da točkovna mutacija na 23S *rRNA* vpliva samo na večjo odpornost proti eritromicinu, saj so podobno ugotovili tudi Ge in sod. (2005), Payot in sod. (2003), Vester in sod. (2001) ter Gibreel in sod. (2005).

Učinek inhibitorja PAβN (U), ki je zaviral delovanje membranskih izlivnih črpalk CmeABC, je bil pri naših poizkusih pri posameznih antibiotikih različen. Največji učinek je imel pri dodatku eritromicina, saj se je vrednost MIC zaradi njegovega dodatka v povprečju zmanjšala za 28-krat (preglednica 12, stran 53). Rezultat dokazuje, da je ta inhibitor onemogočal delovanje črpalke CmeABC, oziroma da je ta črpalka služila za izčrpavanje molekul eritromicina iz bakterijskih celic. Zaradi dodatka inhibitorja PAβN se je vrednost MIC nekoliko zmanjšala tudi pri ostalih dveh antibiotikih. Vendar je bila njegova učinkovitost precej nižja, saj se je vrednost MIC pri dodatku ciprofloksacina zmanjšala v povprečju za 3-krat, pri dodatku tetraciklina pa za 2-krat. Oba rezultata sicer potrjujeta, da dodatek inhibitorja tudi pri ostalih dveh antibiotikih poveča občutljivost, oziroma, da membranske izlivne črpalke CmeABC niso specifične, ampak celicam

kampilobakterjev omogočajo izčrpavanje iz celice tudi molekule ciprofloksacina in tetraciklina, a v veliko manjši meri kot molekule eritromicina.

Učinek U smo preučevali tudi glede na razrede občutljivosti. Izolate smo glede na dobljen vrednost MIC razdelili na odporne ($\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g/ml}$), srednje-odporne ($4 \mu\text{g/ml} \leq \text{MIC} < 16 \mu\text{g/ml}$) ter na občutljive izolate ($\text{MIC} < 4 \mu\text{g/ml}$). Največji učinek na zmanjšanje vrednosti MIC, je imel inhibitor pri srednje-odpornih izolatih na eritromicin, saj se je vrednost MIC v povprečju zmanjšala za 41-krat. Pri odpornih izolatih na eritromicin je bila njegova učinkovitost 21, pri občutljivih pa 17. Rezultati kažejo, da so bile membransko izlivne črpalke najbolj aktivne pri srednje-odpornih izolatih, pri visoko odpornih pa niso imele ključne vloge na povečano odpornost in je bila le-ta posledica tudi drugega dejavnika. Da so imele membransko izlivne črpalke najmanjšo vlogo pri občutljivih izolatih dokazuje, da ti izolati nimajo razvitega tega sistema in so tako bolj občutljivi na eritromicin. Za razliko od eritromicina pa so imele membransko izlivne črpalke največjo aktivnost ob dodatku ciprofloksacina pri občutljivih izolatih, saj je bila učinkovitost najvišja in sicer se je vrednost MIC v povprečju zmanjšala za faktor 5. To dokazuje, da imajo odporni in srednje-odporni izolati razvit tudi drug mehanizem, ki jim poveča odpornost na ciprofloksacin. Učinkovitost inhibitorja pri učinkovanju tetraciklina, je bila približno enaka tako pri odpornih, kot tudi pri občutljivih izolatih, vrednost MIC se je v povprečju zmanjšala za 3-krat oziroma za 2-krat. Ker so bili analizirani izolati v povprečju najmanj odporni na tetraciklin, so verjetno membransko izlivne črpalke CmeABC eden izmed pomembnejših dejavnikov na povečano občutljivost.

Iz preglednice 13 na strani 54 lahko razberemo, da je bilo med analiziranimi izolati tudi nekaj posebnosti. Kot največjo izmed njih bi izpostavili izolat *C. jejuni* VC81, saj PA β N pri eritromicinu ni imel učinka na zmanjšanje vrednosti MIC. Po drugi strani pa je učinkoval tako pri dodatku ciprofloksacina ($U = 2$) kot tudi tetraciklina ($U = 4$). Razloge bi lahko iskali v odpornosti seva na oba slednja antibiotika, na eritromicin pa ni bil odporen in po vsej verjetnosti ni imel prisotnih aktivnih membranskih izlivnih črpalk, ki bi prepoznale in izčrpavale molekule eritromicina iz celice. Glede na to, da je kljub učinkovanju PA β N odpornost na ciprofloksacin in tetraciklin ostala razmeroma visoka, je verjetno, da je v povečano odpornost proti omenjenima antibiotikoma vključen tudi kak drug mehanizem. Drugi primer, ki bi ga lahko uvrstili med posebnosti, pa je izolat *C. coli* 110725, saj je bila učinkovitost U pri delovanju ciprofloksacina večja kot pa pri eritromicinu. Razlog je verjetno podoben kot pa pri izolatu *C. jejuni* VC81. Izolat *C. coli* 110725 je imel prisotne aktivne membranske izlivne črpalke, ki pa učinkoviteje izčrpavajo iz celice molekule ciprofloksacina.

2 SKLEPI

- Potrdili smo, da na visoko odpornost na eritromicin vplivajo tako točkovne mutacije na *23S rRNA*, kot tudi membranske izlivne črpalke (CmeABC).
- Prisotnost točkovnih mutacij na *23S rRNA* smo odkrili le pri izolatih, ki smo jim z mikrodilucijsko metodo določili visoko vrednost MIC za eritromicin. Pri izolatih z nižjo vrednostjo MIC točkovna mutacija ni bila prisotna.
- Ugotovili smo, da imajo membransko izlivne črpalke največjo vlogo pri povečani odpornosti na eritromicin, še posebej pri LLR izolatih ($4 \mu\text{g/ml} \leq \text{MIC} < 16 \mu\text{g/ml}$).

Inhibitor PA β N je občutljivost teh sevov povečal povprečno za 41-krat. V manjši meri sodelujejo pri povečani odpornosti HLR (MIC ≥ 16 μ g/ml) in S izolatih (MIC < 4 μ g/ml).

- Pri desetih izmed 26 analiziranih izolatov smo določili odpornost na dva ali tri testirane antibiotike. Vsi so bili izolirani iz živil (svinjskega, puranjega in piščančjega mesa).
- Z uporabo mikrodilucijske metode smo ugotovili, da se rezultati med paralelkami niso razlikovali, kar pomeni da je metoda dobro ponovljiva. Je relativno hitra in primerna za določanje vrednosti MIC pri kampilobakterjih.

6 POVZETEK

Kampilobakterji so znani povzročitelji črevesnih infekcij tako pri ljudeh, kot tudi pri živalih. Podobno kot ostale po Gramu negativne bakterije so tudi te razvile številne obrambne mehanizme proti antibiotikom in ostalim protimikrobnim učinkovinam. Najbolj pogost razlog za okužbo s kampilobakterji je uživanje premalo temperaturno obdelanega perutninskega in prašičjega mesa. Med razloge za povečano bakterijsko odpornost na številne protimikrobne snovi lahko uvrstimo nesmotrno uporabo antibiotikov v humani in veterinarski medicini. Poleg tega so bakterije v okolju proizvodne verige živil izpostavljene številnim fizikalno-kemijskim stresom in je njihova preživelost zato odvisna od prisotnosti mehanizmov, ki povečajo njihovo odpornost.

Za zdravljenje infekcij z bakterijami *Campylobacter* spp. se uporabljajo različne vrste antibiotikov. Vse večjo skrb za zdravje ljudi pa predstavljajo tiste bakterije, ki so odporne proti makrolidom, fluorokinolonom ter tetraciklinom. Glavna mehanizma, ki bakterijam omogočata zaznavanje in prilagajanje na okolje s povečano koncentracijo protimikrobnih snovi, so točkovne mutacije in membranske izlivne črpalke.

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, kateri mehanizmi bakterijskim celicam, ki smo jih proučevali, omogočajo večjo odpornost na izbrane antibiotike. Proučevali smo specifičnost delovanja membranskih izlivnih črpalk (CmeABC) ter prisotnost točkovnih mutacij na tarčnem genu (*23S rRNA*). V nalogo smo vključili 26 živilskih in humanih izolatov *Campylobacter* spp., katerim smo z mikrodilucijsko metodo (preko merjenja fluorescentnega signala) določili

minimalno koncentracijo izbranega antibiotika, ki še inhibira njihovo metabolično aktivnost. Kot protimikrobne snovi smo uporabili: eritromicin, ciprofloksacin ter tetraciklin. Za ugotavljanje vključenosti membranskih izlivnih črpalk v povečano odpornost kampilobakterjev na antibiotike smo ugotavljali, koliko inhibitor membranskih izlivnih črpalk PA β N poveča bakterijsko občutljivost. Določali smo tudi vpliv točkovne mutacije na *23S rRNA* na odpornost bakterijskih celic na eritromicin. Za njihovo ugotavljanje smo najprej izolirali bakterijsko DNA ter po pomnoževanju gena *23S rRNA* s PCR naredili restrikcijsko analizo pomnožkov ter gelsko elektroforezo restrikcijskih fragmentov.

Po končanem eksperimentalnem delu smo izračunali povprečne vrednosti MIC za eritromicin, ciprofloksacin ter tetraciklin. Razmerje med vrednostmi MIC ob odsotnosti in ob prisotnosti inhibitorja je pokazalo, da so imele membransko izlivne črpalke največjo vlogo pri povečani odpornosti pri dodatku eritromicina. Iz rezultatov smo tudi razbrali, da so imele manjšo vlogo tudi pri povečanju občutljivosti tako na ciprofloksacin, kot tudi na tetraciklin. Da membranske izlivne črpalke CmeABC ne delujejo specifično (samo na eno vrsto antibiotika), kažejo tudi podatki v literaturi.

Prisotnost točkovnih mutacij v genu *23S rRNA* smo ugotovili samo pri izolatih, ki so bili na eritromicin visoko odporni. Pri srednje občutljivih ali pri občutljivih prisotnosti mutacij nismo dokazali. Ker smo pri visoko odpornih izolatih na eritromicin poleg točkovnih mutacij dokazali tudi aktivnost membranskih izlivnih črpalk, smo sklepali, da oba mehanizma na povečano odpornost delujeta vzajemno.

7 VIRI

Aarts H.J.M., Boumedine K.S., Nesme X., Cloeckaert A. 2001. Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. *Veterinary Research*, 32: 363-380

Andersson M.I., MacGowan A.P. 2003. Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 1-11

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

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

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

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

Ciprofloksacin. 2007. Zagreb, Farmakologija.

<http://www.farmakologija.com/materia/images/ciprofloksacin.gif> (10.5.2007): 1 str.

Cockerill F.R. 1999. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 2: 199-212

Corcoran D., Quinn T., Cotter L., Fanning S. 2005. An investigation of the molecular mechanisms contributing to high-level erythromycin resistance in *Campylobacter*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27, 1: 40-45

Davison H.C., Low J.C., Woolhouse M.E.J. 2000. What is antibiotic resistance and how we can measure it? *Trends in Microbiology*, 8, 12: 554-559

Engberg J., Aarestrup F.M., Taylor D.E., Gerner-Smidt P., Nachamakin I. 2001. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 1: 24-34

Federighi M., Magras C., Pilet M.F., Woodward D., Johnson W., Jugiau F., Jouve J.L. 1999. Incidence of thermotolerant *Campylobacter* in foods assessed by NF ISO 10272 standard: Results of two-year study. *Food Microbiology*, 16: 195-204

Flamm R., Hinrichs D., Thomashow M. 1984. Introduction of pAM beta 1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. *Infection Immunity*, 44: 157-161

Fluit A.C., Visser M.R., Schmitz F.-J. 2001. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 4: 836-871

Gallay A., Prouzet-Mauléon V., Kempf I., Lehours P., Labadi L., Camou C., Denis M., de Valk H., Desenclos J.-D., Mégraud F. 2007. *Campylobacter* antimicrobial drug resistance among humans, broiler chickens and pigs, France. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 2: 259-266

Gasparič A., Komel R. 1996. Metode izboljšanja delovnih mikroorganizmov. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA: 185-212

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

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

Gibreel A., Kos V.N., Keelan M., Trieber C.A., Levesque S., Michaud S., Taylor D.E. 2005. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 2753-2759

Goranovič D. 2005. Vpliv matičnega mlečka na vitalnost kvasovke. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 60 str.

Izolacija DNA in RNA. 2007. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Slovenija.

http://www.farma-drustvo.si/gradivo_1/Tehnike%20molekularne%20biologije%20v%20medicini/predavanja.doc (23.7.2007): 2 str.

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

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

Kelly D.J. 2007. Molecular microbiology and physiology of *Campylobacter* and *Helicobacter*. Sheffield. The University of Sheffield. (januar 2007) <http://www.shef.ac.uk/mbb/staff/kelly> (15.1.2007): 2 str.

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

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

Kraigher A., Hočevār-Grom A., Klavs I., Sočan M., Grgič-Vitek M., Pahor L., Kastelic Z. 2001. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2000. *Zdravstveno varstvo*, 40, 4: 1-96.

Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA: 609-63

Kumar A., Schweizer H.P. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 10: 1486-1513

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

Lee A., Mao W., Warren M.S., Mistry A., Hoshino K., Okumura R., Ishida H., Lomovskaya O. 2000. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *Journal of Bacteriology*, 182, 11: 3142-3150

Lilja L., Hänninen M.L. 2001. Evaluation of commercial automated ELISA and PCR-method for rapid detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in poultry products. *Food Microbiology* 18, 2: 205-209

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

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

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

Lukančič I., Šolmajer T. 1998. DNA giraze-tarče antibakterijskih zdravilnih učinkovin. *Farmacevtski vestnik*, 49: 493-508

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

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

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

Martinez A., Lin J. 2006. Effect of an efflux pump inhibitor on the function of the multidrug efflux pump CmeABC and antimicrobial resistance in *Campylobacter*. *Journal of Foodborne Pathogens and Disease*, 3, 4: 393-401

Mehle J., Gubina M., Gliha B. 1982. Contamination of chicken meat with *Campylobacter jejuni* during the process of industrial slaughter. V: *Campylobacter-epidemiology, pathogenesis and biochemistry*. Newell D.G. (ed.). Lancher, Boston, The Hague, MTP Press Limited, International Medical Publisher: 267-269

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

Microorganisms in foods. 5: Microbiological specifications of food pathogens. 1996. Roberts T.A., Baird-Parker A.C., Tompkin R.B. (eds.). London, ICMSF, Blackie Academic and Professional: 45-60

Nielsen E.M., Engberg J., Fussing V., Petersen L., Brogren, On S.L.W. 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters of Applied Microbiology*, 38, 10: 3800-3810.

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

Parisi A., Lanzilotta S.G., Addante N., Normanno G., Di Modugno G., Dambrosio A., Montagna C.O. 2007. Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* isolates from cattle, hens, broilers and broiler meat in south-eastern Italy. *Veterinary Research Communications*, 31: 113-123

Park S.F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 177-188

- Payot S., Avrain L., Magras C., Praud K., Cloeckert A., Chaslus-Dancla E. 2004. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23, 5: 468-472
- Payot S., Bolla J.-M., Corcoran D., Fanning S., Mégraud F., Zhang Q. 2006. Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Microbes and Infection*, 8, 7: 1967-1971
- Payot S., Dridi S., Laroche M., Federighi M., Magras C. 2004. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolated from fattening pigs in France. *Veterinary Microbiology*, 101, 2: 91-99
- Pezzotti G., Serafin A., Luzzi I., Mioni R., Milan M., Perin R. 2002. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 3: 281-287
- Piddock L.J.V. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 2: 382-402
- Piddock L.J.V. 1998. Fluoroquinolone resistance: overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can be related to resistance. *British Medical Journal*, 317: 1029-1030
- Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56: 20-51
- Poole K. 2000. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 9: 2233-2241
- Pumbwe L., Piddock L.J.V. 2002. Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiology Letters*, 206: 185-189
- Piddock L.J.V., Woodward M.J. 2003. Prevalence of multiple antibiotic resistance in 443 *Campylobacter* spp. isolated from humans and animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 507-510
- Randall L.P., Ridley A.M., Cooles S.W., Sharma M., Sayers A.R., Pumbwe L., Newell D.G.,
- RFLP method. 2007. Davidson, The Davidson College, USA.
<http://www.bio.davidson.edu/COURSES/genomics/method/RFLP.html> (9.6.2007): 6 str.
- RFLP method. 2002. Michigan, Michigan State University, USA.
http://rdp8.cme.msu.edu/html/t-rflp_jul02.html (11.6.2007): 2str.
- Riss T., Moravec R. 2003. Introducing CellTiter-Blue cell viability assay. *Promega Notes*, 83: 10-13

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

Saénz Y., Zarazaga M., Lantero M., Gastanares M.J., Baquero F., Torres C. 2000. Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 2: 267-271

Schwarz S., Chaslus-Dancla E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 32: 201-225

Szymanski C.M., King M., Haardt M., Armstrong G.D. 1995. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. *Infection and Immunity*, 63: 4295-4300

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

Senok A., Yousif A., Mazi W., Sharaf E., Bindayna K., Elnima E.-A., Botta G. 2007. Pattern of antibiotic susceptibility in *Campylobacter jejuni* isolates of human and poultry origin. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 60, 1: 1-4

Smole Možina S., Jeršek B., Zorman T., Avbelj J. 2002. Verižna reakcija s polimerazo (PCR) v živilski mikrobiologiji. Delavnica, Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za živilsko mikrobiologijo: 13 str.

Smole Možina S., Zorman T., Berce I. 2005. Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. from retail poultry meat in Slovenia—Comparison with human clinical isolates. V: Karlović D. (ur.). 17th – 20th October 2004, Opatija, Zagreb. Proceedings of the 2nd Central European meeting and 5th Croatian Congress of Food technologists, Biotechnologists and Nutritionists: 134-142

Snelling W. J., Matsuda M., Moore J. E., Dooley J.S.G. 2004. Under the microscope: *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 51: 297-302

Solomon E.B., Hoover D.G. 1999. *Campylobacter jejuni*: a bacterial paradox. *Journal of Food Safety*, 19: 121-136

TE buffer. 2006. openwetware.org, USA
http://openwetware.org/wiki/TE_buffer (23.7.2007): 1 str.

Tegos G., Stermitz F.R., Lomovskaya O., Lewis K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 10: 3133–3141.

Threlfall E.J., Ward L.R., Frost J.A., Willshaw G.A. 2000. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *International of Food Microbiology*, 62: 1-5

Vacher S., Ménard A., Bernard E., Mégraud F. 2003. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for detection of point mutations associated with macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 1125-1128

van Looveren M., Daube G., De Zutter L., Dumont J.-M., Lammens C., Wijdooghe M., Vandamme P., Jouret M., Cornelis M., Goossens H. 2001. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 235-240

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

Varagić V.M., Milošević M.P. 1999. *Farmakologija*. Beograd, Elit – Medica: 575-606

Vester B., Douthwaite S. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in *rRNA*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 1: 1-12 235

Wan J., Wilcock A., Coventry M.J. 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 152-158

Webber M.A., Piddock L.J.V. 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 9-11

Woods G.L., Washington J.A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. V: *Manual of clinical Microbiology*. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 1327-1341

Zirnstien G., Li Y., Swaminathan B., Angulo F. 1999. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 10: 3276-3280

Zloh M., Kaatz G.W., Gibbons S. 2003. Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 14, 4: 881-885

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

Zorman T., Smole Možina S. 2004. *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in poultry meat: Detection and identification. 2004. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi. 18. – 19. marec 2004, Radenci. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Biotehniška fakulteta, Oddlek za živilstvo. Ljubljana, 297-30

ZAHVALA

Zahvaljujem se vsem, ki so me v času študija vspodbujali in mi pomagali z različnimi nasveti. Posebej pa bi se zahvalil:

Mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za koristne napotke in za strokoven pregled diplomskega dela.

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

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

Zahvaljujem se tudi Jani Avbelj za pomoč v laboratoriju.

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

Posebna zahvala je namenjena tudi moji družini za vso podporo med študijem.