

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Monika ŠPORIN

**GENETSKA VARIABILNOST GENA *cmeB* PRI BAKTERIJAH VRST
Campylobacter jejuni IN *Campylobacter coli***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**GENETIC VARIATION OF *cmeB* GENE IN BACTERIA *Campylobacter*
jejuni AND *Campylobacter coli***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Sonja Smole Možina in za recenzenta doc. dr. Blaž Cigić.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Monika Šporin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24/.26:577.2.083(043)=163.6
KG	patogene bakterije / <i>Campylobacter jejuni</i> / <i>Campylobacter coli</i> / genska raznolikost / gen <i>cmeB</i> / izlivne črpalke / PCR-RFLP / restrikcijske karte / restrikcijski vzorci / odpornost proti razkužilom / odpornost proti antibiotikom
AV	ŠPORIN, Monika
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/CIGIČ, Blaž (recenzent)
KZ	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2011
IN	GENETSKA VARIABILNOST GENA <i>cmeB</i> PRI BAKTERIJAH VRST <i>Campylobacter jejuni</i> IN <i>Campylobacter coli</i>
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XI, 62 str., 9 pregl., 31 sl., 110 vir
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Namen diplomske naloge je bil določiti genetsko raznolikost gena <i>cmeB</i> pri bakterijah <i>Campylobacter jejuni</i> in <i>Campylobacter coli</i> , izoliranih iz različnih virov in z različno stopnjo odpornosti na protimikrobne snovi in razvrstiti seve po skupinah glede na raznolikosti v genu <i>cmeB</i> . Iz 42 sevov bakterij vrste <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> smo izolirali DNK in z metodo PCR (verižno reakcijo s polimerazo) in specifičnimi začetnimi oligonukleotidi pomnožili gen <i>cmeB</i> . Restrikcijsko analizo pomnožkov PCR smo naredili z metodo RFLP (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov). Uporabili smo 8 različnih encimov in 4 encimske mešanice. S pomočjo podatkovne baze GenBank in programa pDRAW32 smo v programu Microsoft Office Excel izdelali restrikcijske karte. Pri 42 analiziranih sevih smo določili 14 različnih restrikcijskih vzorcev. Analiza ni pokazala povezave med genetsko raznolikostjo gena <i>cmeB</i> in izvorom seva. Ravno tako genetska raznolikost gena <i>cmeB</i> ni vplivala na odpornost sevov na razkužila in antibiotike.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.24/.26:577.2.083(043)=163.6

CX pathogens / *Campylobacter jejuni* / *Campylobacter coli* / genetic variability / *cmeB* gene / efflux pumps / PCR-RFLP / restriction maps / restriction patterns / resistance to disinfectants / resistance to antibiotics

AU ŠPORIN, Monika

AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/CIGIĆ, Blaž (reviewer)

PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2011

TI GENETIC VARIATION OF *cmeB* GENE IN BACTERIA *Campylobacter jejuni* AND *Campylobacter coli*

DT Graduation Thesis

NO XI, 62 p., 9 tab., 31 fig., 110 ref.

LA SI

AL sl/en

AB The purpose of the graduation thesis was to determine genetic variability of *cmeB* gene in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* bacteria isolated from different sources and with different degrees of resistance to antimicrobial substances, and to sort strains to groups according to diversity in *cmeB* gene. We isolated DNA from 42 strains of *C. jejuni* and *C. coli* and amplified *cmeB* gene with the PCR (polymerase chain reaction) and specific oligonucleotide primers. Restriction analysis of PCR amplicons were done with RFLP (restriction fragment length polymorphism) method. We used 8 different enzymes and 4 enzyme mixtures. Using GenBank information base and pDRAW32 program restriction maps were made in Microsoft Office Excel. Among 42 strains included in this analysis, 14 different restriction patterns were found. The analysis showed no connection between genetic diversity of gene *cmeB* and strain origin. Also genetic diversity of gene *cmeB* had no influence on strain resistance to disinfectants and antibiotics.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i>	3
2.1.1 Zgodovina in klasifikacija	3
2.1.2 Morfološke in fiziološke lastnosti	3
2.1.3 Epidemiologija, patogeneza in zdravljenje kampilobakterioz.....	4
2.1.3.1 Epidemiologija	4
2.1.3.2 Patogeneza.....	5
2.1.3.3 Zdravljenje kampilobakterioze.....	6
2.1.4 Incidenca in prevalenca kampilobakterjev	6
2.2 ODPORNOST BAKTERIJ NA PROTIMIKROBNE SNOVI	7
2.2.1 Odpornost bakterij na antibiotike.....	7
2.2.2 Odpornost bakterij na biocide.....	9
2.2.3 Izlivne črpalke	10
2.2.3.1 Črpalka CmeABC pri bakterijah rodu <i>Campylobacter</i>	11
2.2.3.2 Inhibitorji izlivnih črpalk	12
2.2.4 Mehanizmi odpornosti bakterij rodu <i>Campylobacter</i>	12
2.2.4.1 Odpornost na antibiotike	12
2.2.4.2 Incidenca odpornih sevov	13
2.3 METODE DOLOČANJA GENETSKE RAZNOLIKOSTI	13

2.3.1	PCR-RFLP (Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov pomnoženih s PCR).....	15
3	MATERIAL IN METODE	16
3.1	POTEK DELA.....	16
3.2	MATERIAL	17
3.2.1	Bakterijski sevi.....	17
3.2.2	Mikrobiološka gojišča.....	18
3.2.2.1	Reagenti za izolacijo DNA.....	18
3.2.2.2	Reagenti za reakcijo PCR.....	18
3.2.2.3	Reagenti za določanje pomnožkov PCR	19
3.2.2.4	Reagenti za restrikcijo pomnožkov PCR	19
3.2.2.5	Reagenti za analizo restrikcijskih vzorcev	20
3.2.2.6	Drugi reagenti.....	21
3.2.3	Laboratorijska oprema	21
3.3	METODE	22
3.3.1	Revitalizacija bakterijskih sevov.....	22
3.3.2	Priprava kulture v tekočem gojišču MHB.....	23
3.3.3	Preverjanje koncentracije in čistosti bakterijske kulture.....	23
3.3.4	Izolacija DNK.....	23
3.3.5	Spektrofotometrična kvantifikacija DNK	24
3.3.6	Identifikacija sevov z reakcijo mnogokratni PCR.....	24
3.3.6.1	Priprava reakcijske mešanice	24
3.3.6.2	Potek reakcije mnogokratni PCR.....	25
3.3.6.3	Dokazovanje pomnožkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo	25
3.3.7	Pomnoževanje gena <i>cmeB</i>	25
3.3.7.1	Priprava reakcijske mešanice	25
3.3.7.2	Potek reakcije PCR	26
3.3.7.3	Dokazovanje pomnožkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo	26
3.3.8	Restrikcija pomnožkov PCR.....	27
3.3.8.1	Analiza restrikcijskih vzorcev z agarozno gelsko elektroforezo.....	28
3.3.9	Izdelava restrikcijskih kart gena <i>cmeB</i>	28

3.3.9.1	Izdelava restrikcijskih kart gena <i>cmeB</i> sevov <i>Campylobacter</i> z znanim nukleotidnim zaporedjem.....	28
3.3.9.2	Izdelava restrikcijskih kart gena <i>cmeB</i> sevov <i>Campylobacter</i> različnega izvora.....	28
4	REZULTATI.....	30
4.1	IDENTIFIKACIJA SEVOV <i>Campylobacter</i> Z METODO MNOGOKRATNI PCR.....	30
4.2	POMNOŽEVANJE GENA <i>cmeB</i>	32
4.3	RESTRIKCIJSKE KARTE GENA <i>cmeB</i>	33
4.3.1	Restrikcijske karte gena <i>cmeB</i> sevov <i>Campylobacter</i> iz baze podatkov in z neznanim nukleotidnim zaporedjem.....	34
4.4	ANALIZA RESTRIKCIJSKIH VZORCEV.....	36
4.4.1	Analiza restrikcijskih vzorcev glede na vrsto sevov <i>Campylobacter</i>	36
4.4.2	Analiza restrikcijskih vzorcev glede na izvor sevov	45
4.4.3	Analiza restrikcijskih vzorcev glede na odpornost na protimikrobna sredstva	47
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	50
5.1	RAZPRAVA.....	50
5.2	SKLEPI.....	51
6	POVZETEK.....	52
7	VIRI	53

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Genotipizacijske metode in zmožnost razlikovanja mikroorganizmov (Vandamme in sod., 1996; Čadež in Štorman, 2004).....	14
Preglednica 2: Bakterijski sevi vrste <i>Campylobacter coli</i> in <i>Campylobacter jejuni</i>	17
Preglednica 3: Laboratorijska oprema.....	21
Preglednica 4: Sestava reakcijskih mešanic za restrikcijo pomnožkov PCR.....	27
Preglednica 5: Sevi <i>Campylobacter</i> z znanimi nukleotidnimi zaporedji gena <i>cmeB</i> in številke dostopa v podatkovni bazi GenBank.....	28
Preglednica 6: Identifikacija sevov <i>Campylobacter</i> z metodo mnogokratni PCR.....	31
Preglednica 7: Izvor sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i>	45
Preglednica 8: Definicija stopnje odpornosti na protimikrobne snovi pri bakterijah vrste <i>C.</i> <i>jejuni</i> in <i>C. coli</i> (Mavri in sod., 2011)	47
Preglednica 9: Nivoji odpornosti na protimikrobne snovi in restrikcijski vzorci testiranih sevov <i>Campylobacter jejuni</i> in <i>C. coli</i> (Mavri in sod., 2011)	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Ekološki cikel <i>C. jejuni</i> (Konkel in sod., 2001)	4
Slika 2: Razširjenost bakterij vrste <i>Campylobacter</i> na živalih in mesu v Evropski uniji (Smole Možina in sod., 2011)	6
Slika 3: Pojavnost kampilobakterioze v primerjavi s salmonelozo v Sloveniji (IVZ RS, 2010).....	7
Slika 4: Reakcija RFLP in ločitev fragmentov z elektroforezo (Wolfe, 2006)	15
Slika 5: Potek eksperimentalnega dela	16
Slika 6: Velikost fragmentov molekularnega označevalca dolžin pomnožkov po agarozni gelski elektroforezi (Fermentas, 2011a).....	19
Slika 7: Velikost fragmentov molekularnega označevalca dolžin pomnožkov po agarozni gelski elektroforezi (Fermentas, 2011b).....	21
Slika 8: Prikaz časovnega in temperaturnega poteka reakcije mnogokratni PCR.....	25
Slika 9: Prikaz časovnega in temperaturnega poteka PCR.....	26
Slika 10: Potek izvedbe PCR reakcije in dokazovanja pomnožkov	27
Slika 11: Pomnoževanje specifičnih DNK regij vrst <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> z metodo mnogokratne PCR.	30
Slika 12: Elektroforetske slike PCR pomnožkov gena <i>cmeB</i> velikosti 3213 bp.	32
Slika 13: Restriksijska karta gena <i>cmeB</i> seva <i>C. jejuni</i> NCTC 11168, izdelana s programom dDRAW32	33
Slika 14: Restriksijske karte gena <i>cmeB</i> sevov <i>Campylobacter</i> z znanim nukleotidnim zaporedjem	33
Slika 15: Elektroforetska slika restriksijske analize gena <i>cmeB</i> seva <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (a); virtualni elektroforetski gel za sev <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 izdelan s programom pDRAW32 (b)	34
Slika 16: Restriksijske karte gena <i>cmeB</i> , velikosti 3213 bp, sevov <i>Campylobacter</i> , ki smo jih razdelili v 14 restriksijskih vzorcev, z neznanim nukleotidnim zaporedjem...	35
Slika 17: Elektroforetska slika restrikcije gena <i>cmeB</i> sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> z encimom <i>PvuII</i>	36
Slika 18: Restriksijska karta restriksijskega vzorca 1, ki je značilen za vrsto <i>C. jejuni</i>	37

Slika 19: Elektroforetska slika restrikcijske analize sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> z encimom <i>HaeII</i>	37
Slika 20: Elektroforetska slika restrikcijske analize sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> z encimom <i>HaeII</i>	38
Slika 21: Elektroforetska slika restrikcijske analize sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> z encimom <i>PvuII</i>	38
Slika 22: Elektroforetski sliki restrikcijske analize sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> z različnimi encimi.	39
Slika 23: Elektroforetska slika restrikcijske analize seva 1080 vrste <i>C. coli</i> , z različnimi encimi.	39
Slika 24: Elektroforetska slika restrikcijske analize sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> z različnimi encimi.	40
Slika 25: Elektroforetska slika restrikcijske analize seva VC 110725 vrste <i>C. coli</i> z različnimi encimi.....	40
Slika 26: Elektroforetski sliki restrikcijske analize sevov <i>C. coli</i> 809 in VC 7114 z različnimi encimi.....	41
Slika 27: Elektroforetska slika restrikcijske analize seva <i>C. coli</i> ATCC 33559 z različnimi encimi.	41
Slika 28: Elektroforetska slika restrikcijske analize sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> z encimom <i>BsmAI</i>	42
Slika 29: Restrikcijska karta restrikcijskega vzorca 3, ki je značilen za vrsto <i>C. coli</i>	42
Slika 30: Elektroforetska slika restrikcijske analize sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> z encimom <i>XmnI</i> in encimsko mešanico <i>PvuII</i> - <i>XmnI</i>	42
Slika 31: Dendrogram 36 sevov <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> , izdelan na osnovi PCR-RFLP restrikcijskih vzorcev	44

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABC	družina prenašalnih proteinov, ki vežejo ATP (anfl. ATP binding cassette)
AFLP	dolžinski polimorfizem pomnoženih fragmentov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)
AP-PCR	pomnoževanje DNK z naključnimi začetnimi olinukleotidi s PCR
ARDRA	restriksijska analiza fragmentov rDNK, pomnoženih s PCR
BOX-PCR	pomnoževanje elementov BOX s PCR
BC	benzalkonijev klorid
BHI	gojišče Brain Heart Infusion
CPC	cetilpiridinijev klorid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
HLR	visoka stopnja odpornosti (angl. high level resistant)
LLR	nizka stopnja odpornosti (angl. low level resistant)
MATE	družina prenašalnih proteinov, ki kot vir energije uporabljajo gradient protonov in natrija (angl. multidrug and toxic compound extrusion)
MHB	gojišče Mueller-Hinton (angl. Mueller-Hinton broth)
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (angl. minimal inhibitory concentration)
MLR	srednja stopnja odpornosti (angl. middle level resistant)
MFS	družina prenašalnih proteinov, ki je sposobna prenosa majhnih topljencev (angl. major facilitator superfamily)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PCR-RFLP	polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov pomnoženih s PCR
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju
PAβN	fenilalanin-arginin beta-naftilamid
PBS	fosfatni pufer
R	odporen (angl. resistant)
RAPD-PCR	pomnoževanje DNK z naključnimi začetnimi olinukleotidi s PCR
RC-PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju DNK, razrezane z restriksijskimi encimi
REP-PCR	pomnoževanje elementov REP s PCR
RFLP	polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov
RISA	restriksijska analiza fragmentov rDNK pomnoženih s PCR
RND	družina prenašalnih proteinov, ki kot vir energije izkoriščajo gradient protonov (angl. resistance nodulation division)
RNK	ribonukleinska kislina
S	občutljiv (angl. sensitive)
SDS	natrijev dodecil sulfat
TSP	trinatrijev fosfat

1 UVOD

Termotolerantne bakterije rodu *Campylobacter* so vodilni povzročitelji alimentarnih obolenj v številnih razvitih državah. Do okužbe najpogosteje pride z uživanjem premalo toplotno obdelanega in kontaminiranega piščančjega mesa. Vzrok pa je lahko tudi navzkrižna kontaminacija med pripravo hrane (Smole Možina in sod., 2009). Zdravljenje kampilobakterioz v večini primerov poteka simptomatsko brez uporabe antibiotikov. V primeru krvave diareje, dolgo trajajoče bolezni ter pri bolnikih z oslabele imunostjo se za zdravljenje uporabljajo antibiotiki. Prva izbira so fluorokinoloni, makrolidi in tetraciklini (Allos, 2001).

Uporaba antibiotikov v humani in veterinarski medicini je najverjetnejši razlog široke razprostranjenosti mikrobne odpornosti na antibiotike (Moore in sod., 2005). Po poročilih Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni je večkratna odpornost na antibiotike prisotna kar pri 16,9 % bakterij *Campylobacter* (ECDC, 2007). Odpornost na protimikrobne snovi je bila po raziskavah Evropske agencije za varno hrano leta 2008 mnogo pogostejša med kampilobaktri, kot med bakterijami rodu *Salmonella* (EFSA, 2010f). Pri bakterijah *Campylobacter* je prisotnih več mehanizmov odpornosti. Genetski mehanizem odpornosti na fluorokinolone in makrolide je povezan s tarčno mutacijo gena *gyrA* in mutacijo na področju V gena 23S rRNA. Vse več raziskav pa kaže, da izlivna črpalka CmeABC prispeva tako k intrinzični, kot tudi k pridobljeni odpornosti na te antibiotike (Quinn in sod., 2007).

Izlivna črpalka CmeABC bakterij rodu *Campylobacter* spada v družino RND prenašalnih proteinov, ki prispevajo k odpornosti proti številnim protimikrobnim snovem. Sestavljajo jo periplazmatski protein CmeA, protein CmeB v notranji membrani in protein CmeC v zunanji membrani (Lin in sod., 2002). Odsotnost gena *cmeB*, ki nosi zapis za protein CmeB, onemogoča kolonizacijo piščancev in za 2 do 4-krat poveča občutljivost kampilobaktrov na različna protimikrobna sredstva (Lin in sod., 2002).

Pri kampilobaktirih je prisotna velika genetska raznolikost, ki jo je mogoče detektirati na fenotipskem in genotipskem nivoju. Najpogosteje uporabljene metode določanja genetske raznolikosti so gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (PFGE), polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov pomnoženih s PCR (PCR-RFLP), restrikcijska analiza fragmentov rDNK, pomnoženih z verižno polimerazno reakcijo (ARDRA), pomnoževanje z naključnimi začetnimi oligonukleotidi (RAPD, AP-PCR), dolžinski polimorfizem pomnoženih fragmentov (AFLP) in druge (Nachamkin in sod., 1993; Shi in sod., 2002).

Z metodo PCR-RFLP je bila dokazana velika genetska raznolikost gena *cmeB* pri vrstah *C. jejuni* in *C. coli*. Med 21 različnimi sevi so določili kar 18 različnih restrikcijskih vzorcev (Cagliero in sod., 2006). Visoka genetska raznolikost sevov vrste *C. jejuni* je bila dokazana tudi z metodama tipizacije gena *flaA* in elektroforeze v pulzirajočem polju. Povezava med genotipom in odpornostjo na protimikrobna sredstva pa je bila nizka (Han in sod., 2007).

1.1 CILJI NALOGE

Cilj diplomske naloge je bil določiti genske raznolikosti gena *cmeB* pri bakterijah *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* z različno stopnjo odpornosti na protimikrobne snovi in razvrstiti seve po skupinah glede na raznolikosti v genu *cmeB*.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Pri bakterijah *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* iz živil, vode, humanih in kliničnih vzorcev se pojavlja genetska raznolikost na genu *cmeB*, ki kodira transportni protein izlivne črpalke CmeABC in vpliva na odpornost sevov na razkužila in antibiotike.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU *Campylobacter*

2.1.1 Zgodovina in klasifikacija

Bakterije rodu *Campylobacter* so bile prvič opažene leta 1880 v blatu dojenčka z diarejo v Nemčiji. Prvo identifikacijo sta naredila McFadyen in Stockman leta 1913 v povezavi z abortusi pri ovcah. Potrditveni test je opravil Smith leta 1918, ko je izoliral podoben organizem iz govejega fetusa. Sprva so organizem uvrstili v rod *Vibrio* zaradi spiralne oblike, Smith pa ga je poimenoval *Vibrio fetus*. Leta 1957 je E. King predlagal dva tipa bakterij rodu *Vibrio*, ki so povezani z črevesnimi obolenji. Prvi tip naj bi bil *Vibrio fetus*, drugi pa je bil mikroaerofilne narave. Šele leta 1963 je bil predlagan rod *Campylobacter*, ko so ugotovili, da ti organizmi ne morejo izkoriščati monosaharidov in da imajo drugačno vsebnost gvanina in citozina v strukturi DNK kot ostali predstavniki rodu *Vibrio*. Dekeyser in Butzler sta leta 1972 podkrepila ugotovitve E. Kinga z metodo izolacije termofilnih kampilobaktrov. Metoda je vključevala filtracijo vzorcev blata skozi 0,64 µ membranski filter ter inokulacijo filtra v agar. Leta 1977 je Martin Skirrow opisal metodo direktnega nanosa vzorcev blata na krvni agar, ki vsebuje vankomicin, polimiksin in trimetoprim. Plošče so inkubirali pri 43 °C v mikroaerofilni atmosferi (Moore in sod., 2005).

V družino Campylobacteriaceae spadajo rodovi *Campylobacter*, *Arcobacter* in *Bacteroides*. Termofilni kampilobaktri vrst *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* in *C. upsaliensis* so najpogosteje povezani s humanimi gastrointestinalnimi boleznimi (Snelling in sod., 2005).

2.1.2 Morfološke in fiziološke lastnosti

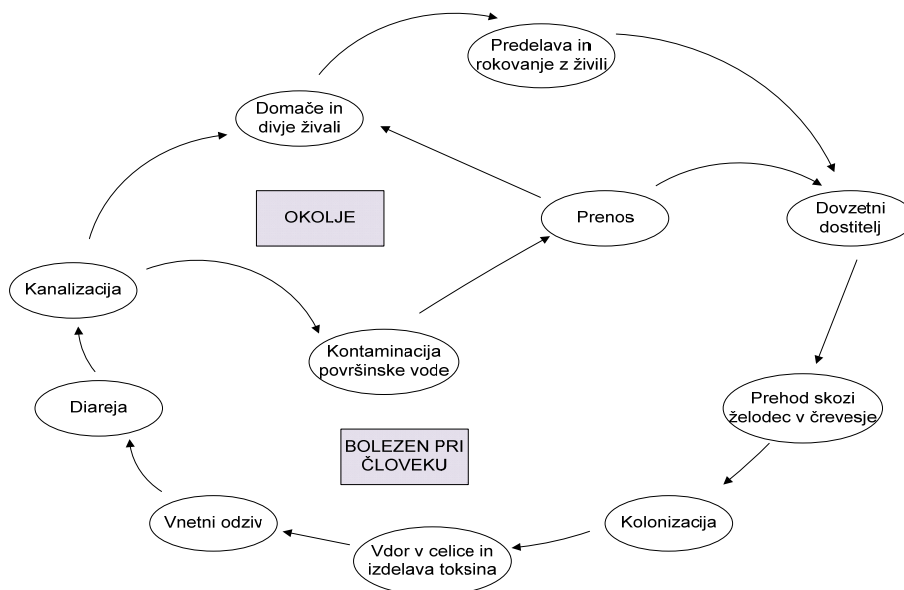
Družina Campylobacteriaceae so majhne (0.2–0.9 µm široke in 0.2–5.0 µm dolge), spiralno oblikovane, po Gramu-negativne bakterije. So mikroaerofilne bakterije, občutljive na previsoko koncentracijo kisika. Za svojo rast zahtevajo 5 – 10 % kisika v atmosferi (Humphrey in sod., 2007). Njihovo rastno območje je zelo omejeno tudi glede temperature, saj pod 30 °C in nad 45 °C ne rastejo. *Campylobacter coli* in *C. jejuni* se od ostalih bakterij rodu *Campylobacter* razlikujeta po višji optimalni temperaturi rasti (42 °C) (Van Vliet in Ketley, 2001; Snelling in sod., 2005). De Cesare in sod. (2002) so ugotovili, da bakterije rodu *Campylobacter* preživijo tudi 4 ure pri 27 °C in pri 60 – 62 % relativni vlažnosti, na nekaterih čistih in nečistih površinah, ki so v stiku z živili. Gibljivost jim omogočajo enopolarni ali bipolarni bički. Ne fermentirajo in ne oksidirajo ogljikovih hidratov, energijo pa pridobivajo iz aminokislin in intermediatov Krebsovega cikla (Snelling in sod., 2005). So katalaza in oksidaza pozitivni ter ureaza negativni (Van Vliet in Ketley, 2001). *C. jejuni* razgrajuje hipurat, indoksil in acetat ter reducira nitrat (Keener in sod., 2004). So prehransko zahtevne bakterije, ki rastejo v kompleksnih medijih z dodatkom rastnih faktorjev (Kelly, 2001). Optimalno območje pH za njihovo rast je med 6,5 in 7,5, pod 4,9 in nad 9,0 pa ne preživijo. D-vrednost za kampilobaktre je manj kot 1 minuta pri 60 °C, kar

pomeni 90 % zmanjšanje števila kampilobaktrov pri segrevanju na 60 °C za 1 minuto. Populacijo zmanjša tudi zmrzovanje in tajanje (Keener in sod., 2004). Inaktivira jih skladiščenje pri -15 °C 3 dni (Stern in Kotula, 1982). Njihov genom obsega 1600 – 1700 kb, kar je malo v primerjavi z drugimi enteropatogenimi bakterijami (Van Vliet in Ketley, 2001). Izpostavitvev kampilobaktrov nizkim temperaturam, oksidativnemu stresu in stradanju se kaže v spremenjeni morfologiji. Iz spiralne oblike postopoma prehajajo v kokoidno. Pod neugodnimi pogoji *C. jejuni* izgubi kultivabilnost in preide v stanje VBNC (živo, a nekultivabilno) (Klančnik, 2006).

2.1.3 Epidemiologija, patogeneza in zdravljenje kampilobakterioz

2.1.3.1 Epidemiologija

Bakterije rodu *Campylobacter* so znane kot zoonozne, patogene bakterije. Največ infekcij povzročita *C. jejuni* in *C. coli*, v državah v razvoju pa tudi *C. upsaliensis* (Humphrey in sod., 2007). So komenzalni organizmi, pogosto najdeni v govedu, ovcah, prašičih in predvsem perutnini zaradi višje telesne temperature (Keener in sod., 2004). Do okužbe najpogosteje pride pri rokovanju s piščanci ali uživanjem toplotno slabo obdelanega piščančjega mesa. Okužba je možna tudi z uživanjem nepasteriziranega mleka in kontaminirane vode (Konkel in sod., 2001). Ekološki cikel bakterije *C. jejuni* prikazuje slika 1.



Slika 1: Ekološki cikel *C. jejuni* (Konkel in sod., 2001)

Na obsežnost kontaminacije piščančjega mesa s kampilobaktri vpliva več dejavnikov, kot so starost piščancev ob klanju, letni čas in kateri del dneva se meso obdeluje. Tveganje kontaminacije je večje med julijem in septembrom, ter v poznejših popoldanskih urah

(EFSA, 2010a). Ravno tako je večja verjetnost kontaminacije pri mesu starejših piščancev (EFSA, 2010b).

V primerjavi z leti med 1994 do 1998 se je leta 1999 pojavnost kampilobakterioze zmanjšala za 40 %. Vzrok je bil predvsem umik perutnine iz tržišča zaradi pojava dioksina v živalski krmi (Vellinga in Van Loock, 2002). Direktni prenos kampilobaktra je povezan predvsem z določenimi poklici (kmetje in mesarji), v gospodinjstvo pa lahko okužbo prenesejo tudi hišni ljubljenci. Prenos iz človeka na človeka se pojavi redko. S potovanji pa je povezano 3–50 % primerov kampilobakterioz (Butzler, 2004; Sandberg in sod., 2002; Wieland in sod., 2005).

2.1.3.2 Patogeneza

Kampilobakter vstopi v telo gostitelja s hrano ali vodo, preide želodec in naseli spodnji del tankega črevesa ter debelo črevo. Ima sposobnost adhezije in invazije v gostiteljeve celice. Po naselitvi mukoznega sloja in pripenjanju na površino črevesnih celic zmoti normalno absorptivno kapaciteto črevesja (Wooldridge in Ketley, 1997; Verhoeff-Bakkenes in sod., 2009). Za naselitev kampilobaktrov v črevesju gostitelja je pomembna tudi sposobnost kemotakse, gibanja v smeri koncentracijskega gradienta snovi, kot so hranila (Van Vliet in Ketley, 2001). Takata in sod. (1992) so ugotovili, da mutanti brez sposobnosti kemotakse ne morejo kolonizirati prebavnega trakta miši z razliko od divjih sevov. Za razliko od bakterij rodu *Shigella* in *Salmonella* prodiranje v krvni obtok za kampilobaktr ni značilno (Nester in sod., 2009).

Produkcija toksinov je še en izmed virulenčnih dejavnikov bakterij *Campylobacter*. Enterotoksin in citotoksin, ki ju proizvajajo, povzročata vodeno in vnetno diarejo (Wassenaar, 1997). Endotoksično delovanje pa ima tudi lipopolisaharid v zunanji membrani (Andlovic, 2002).

Infektivna doza je v primerjavi z bakterijami rodu *Shigella* visoka. Zaužiti je potrebno $800\text{--}10^6$ bakterijskih celic, da bi zbolelo 10–50 % ljudi (Allos, 2001). Prisotni simptomi so vodena ali krvava diareja, abdominalna bolečina, povišana telesna temperatura, glavobol, splošna oslabelost in pomanjkanje apetita. Simptomi se pojavijo 2 do 3 dni po zaužitju kontaminirane hrane in izzvenijo v enem tednu. V primerjavi z infekcijo s salmonelo ali šigelo je infekcija s kampilobaktri blažja (Moore in sod., 2005).

V državah v razvoju, kjer so otroci večkrat okuženi s kampilobaktr, se pri ljudeh razvije odpornost in bolezen poteka subklinično. Odpornost se je pojavila tudi v razvitih državah pri ljudeh, ki uživajo surovo mleko ali so pogosto v stiku s perutnino. Pri ljudeh z zmanjšanim imunskim odzivom (starejši, diabetiki, rakavi bolniki, bolniki z AIDS-om) lahko okužba z bakterijo *Campylobacter* pomeni hudo infekcijo z intenzivneje izraženimi simptomi (Moore in sod., 2005). HIV pozitivni zbolijo za kampilobakteriozo 39-krat pogosteje kot HIV negativni, med okuženimi pogosteje zbolijo ženske kot moški (Sorvillo in sod., 1991).

Izven črevesne komplikacije infekcije s *C. jejuni* so pankreatitis, artritis, karditis, meningitis, hemolitično uremični sindrom in bakteriemija (Pitkänen in sod., 1983; Quondamcarlo in sod., 2003). Infekcija s *C. jejuni* pa lahko privede do pojava Guillain-Barre-jevega sindroma. Le ta se pojavi v 0,1 % primerov okužb (Mishu in sod., 1993; Nester in sod., 2009). Simptomi se pojavijo nenadno po desetih dneh od začetka diareje z občutkom otrplosti in zbadanja v nogah in se nadaljuje s paralizo nog, rok in ostalega telesa (Nester in sod., 2009).

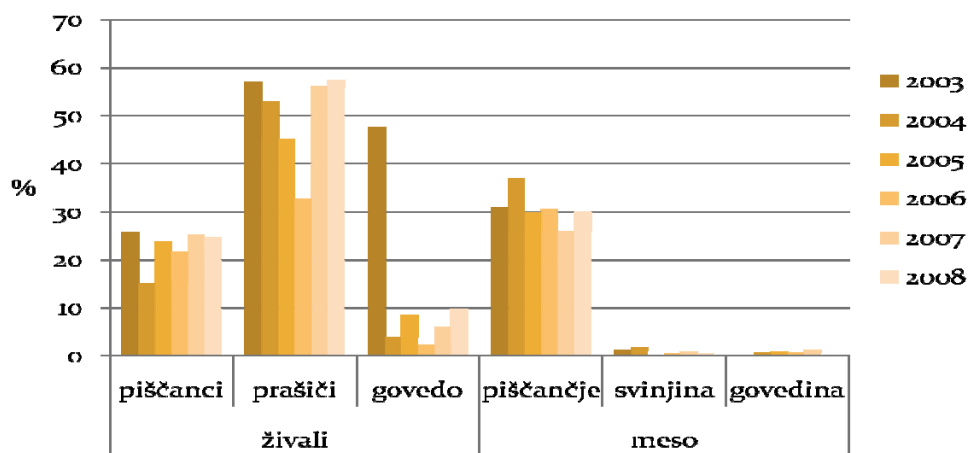
2.1.3.3 Zdravljenje kampilobakterioze

Zdravljenje kampilobakterioz v večini primerov poteka simptomatsko brez uporabe antibiotikov. V primerih hujše oblike bolezni, kot so zelo visoka telesna temperatura, krvava diareja in dolgo trajajoča bolezn, ter pri nosečnicah in bolnikih z oslabele imunostjo se uporabljajo antibiotiki. Glavna terapevtska sredstva v teh primerih so fluorokinoloni, makrolidi in tetraciklini (Allos, 2001).

2.1.4 Incidenca in prevalenca kampilobakterjev

Termotolerantni kampilobaktri, predvsem *C. jejuni* in *C. coli*, so najpogostejši povzročitelji črevesnih okužb v Združenih državah Amerike. Okužbo povzročajo 2–7 krat pogosteje kot *Salmonella* ali *Shigella*. Najpogosteje obolevajo otroci do 1 leta starosti in odrasli med 15 in 44 letom. Med obolelimi so pogosteje moški (Allos, 2001).

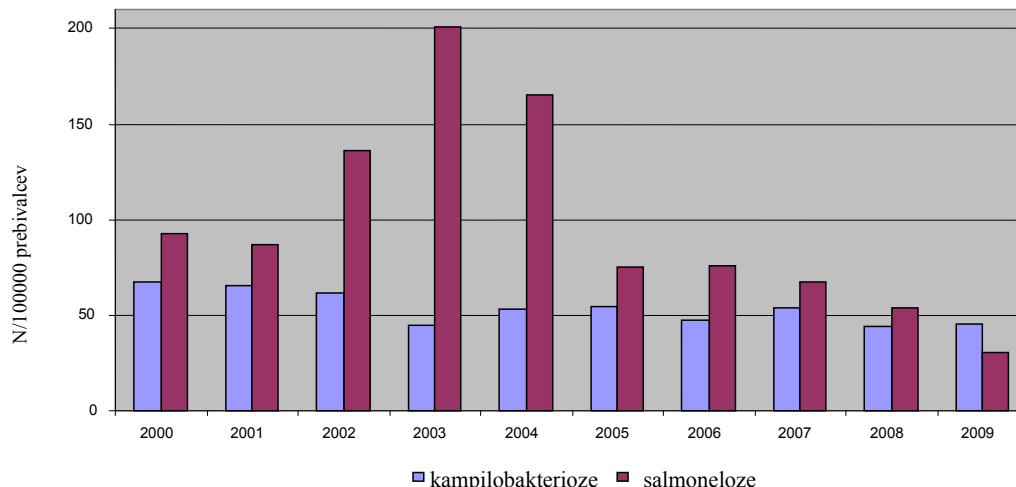
V Evropski uniji sta kampilobakterioza in salmoneloza najpogostejši alimentarni obolenji pri ljudeh (EFSA, 2010c). Slika 2 prikazuje razširjenost bakterij vrste *Campylobacter*.



Slika 2: Razširjenost bakterij vrste *Campylobacter* na živalih in mesu v Evropski uniji (Smole Možina in sod., 2011)

V Evropski uniji je bilo leta 2006 prijavljenih 175.561 primerov kampilobakterioze. V letu 2007 je to število naraslo na več kot 200.000 (EFSA, 2010d). Leta 2008 je bil opažen 5 % padec primerov kampilobakterioze, prijavljenih je bilo 190,566 primerov (EFSA, 2010e).

Kampilobakter je bil v letu 2009, podobno kot v številni državah EU, najpogostejši bakterijski povzročitelj enteritisov v Sloveniji. Število prijav je glede na leto 2008 poraslo za 3,7 %. Pri ljudeh je najpogostejši *C. jejuni*, ki predstavlja 89 % prijav, *C. coli* 3,9 % in, *C. lari* 1,8 % prijav. Letna incidenca kampilobakterskih okužb je bila 45,1/100.000 prebivalcev in je približno za šestino nižja od 10-letnega povprečja. Najvišja incidenca je bila v mariborski, sledita ravenska in novomeška zdravstvena regija. Večina prijavljenih obolelih so bili otroci in sicer je bilo 25 % obolelih mlajših od 5 let, 41 % obolelih pa mlajših od 15 let (IVZ RS, 2010). Slika 3 prikazuje pojavnost kampilobakterioze v primerjavi s salmonelozo.



Slika 3: Pojavnost kampilobakterioze v primerjavi s salmonelozo v Sloveniji (IVZ RS, 2010)

2.2 ODPORNOST BAKTERIJ NA PROTIMIKROBNE SNOVI

2.2.1 Odpornost bakterij na antibiotike

Odpornost na protimikrobne snovi je genotipska in/ali fenotipska značilnost bakterij. Delimo jo lahko glede na izvor (intrinzična in pridobljena) ali na tip (enojna, navzkrižna in večkratna). Gene za odpornost najdemo na plazmidih, transpozonih in kromosomih. Odpornost je lahko naravna (intrinzična) ali pridobljena z mutacijami in insercijami zunanjih genov (Davison in sod., 2000). Intrinzična ali naravna odpornost se pojavi brez protimikrobnega selektivnega pritiska. Pridobljeno odpornost obravnavamo z genetskega ali biokemijskega vidika. Genetsko pridobljena odpornost je lahko trajna ali začasna. Začasna je največkrat odvisna od rastnih pogojev. Na primer, bakterija *Pseudomonas*

aeruginosa je odporna na polimiksine in aminoglikozide, kadar ji primanjkuje magnezijevih ionov. Trajna odpornost nastane z mutacijami ali s pridobljeno zunanjo DNK. Sama protimikrobna sredstva ne povzročajo mutacij, ampak selekcijo med že obstoječimi spontanimi odpornimi mutanti (Sefton, 2006). Posamezne bakterijske vrste ali rodovi so naravno odporni proti nekaterim antibiotikom, kadar nimajo tarčnih mest, na katera antibiotiki delujejo. Nekatere vrste bakterij imajo značilno sestavo celične stene, ki preprečujejo antibiotikom vdor do tarčnega mesta njihovega delovanja (Seme, 2002).

Pridobljena bakterijska odpornost nastane z vstopom tuje (zunanje) DNK v celico s transformacijo, transdukcijo ali z konjugacijo. Izmed teh je najpomembnejša konjugacija, saj predstavlja prenos DNK med živimi celicami. Širjenje plazmidov na ta način je v največji meri odgovorno za razvoj odpornosti pri bakterijah. Odporni geni se pogosto nahajajo na transpozonih, kateri so definirani kot »lepljivi konci« delov DNK in se lahko izrezujejo iz enega plazmida ter se vstavljajo v drug plazmid. Lahko se vstavijo tudi v kromosom. S tem je sicer zmanjšana prenosljivost, vendar povečana stabilnost odpornosti (Sefton, 2006). Pridobljeno odpornost proti protimikrobnim snovem imajo v nasprotju z naravno samo posamezni sevi bakterijske vrste ali rodu (Seme, 2002).

Z biokemijskega vidika se lahko odpornost na antibiotike pojavi v obliki petih različnih mehanizmov (Sefton, 2006; Seme, 2002):

1. Sinteza encimov, ki inaktivirajo zdravilo: veliko bakterij ima kromosomsko ali plazmidno posredovano β -laktamazo. Sinteza β -laktamaze je pogost vzrok odpornosti črevesnih po Gramu-negativnih bakterij.
2. Sprememba tarčnega mesta: modifikacija 12S proteina je primer spremembe obstoječe tarče, katere posledica je ribosomalna odpornost na streptomycin.
3. Sprememba presnovne poti, na katero deluje antibiotik: preprečena sinteza timina v bakterijski celici povzroči odpornost proti sulfonamidom in trimetoprimu.
4. Zmanjšana celična propustnost: do te pride z izgubo porinov, kar zmanjša vstop številnih hidrofilnih spojin skozi zunanjo membrano pri po Gramu-negativnih bakterijah, kar povzroča tudi večkratno odpornost.
5. Odstranjevanje snovi iz celice: je aktivni mehanizem. Klasičen primer je odpornost na tetraciklin.

Navzkrižna odpornost je odpornost na kemijsko sorodne protimikrobne snovi. Večkratna odpornost pa je pojav odpornosti na kemijsko nesorodne protimikrobne snovi (Sefton, 2006). Geni, odgovorni za odpornost na antibiotike, se lahko prenesejo iz za živali patogenih bakterij na bakterije, patogene za ljudi. Glavni razlog porasta odpornosti bakterij na antibiotike je pogosta uporaba antibiotikov za zdravljenje ljudi in živali ter njihovo vključevanje v živalsko krmo (Russell, 2002b; Teale, 2002).

Odpornost bakterij na antibiotike je čedalje pogostejša, medtem ko je proizvodnja novih antibiotikov čedalje počasnejša. Povečuje se tudi zmanjšana občutljivost na biocide. Skrb zbujajoča je predvsem verjetnost, da je široka uporaba biocidov kriva za selekcijo in vzdrževanje na antibiotike odpornih bakterij (Russell, 2002a).

2.2.2 Odpornost bakterij na biocide

Biocidi so kemijske spojine, ki imajo širok spekter delovanja in inaktivirajo mikroorganizme. Uporabljajo se v bolnišnicah in ostalih zdravstvenih ustanovah ter so esencialnega pomena za prakso kontrole infekcij. Zaradi zagotavljanja varnosti se je povečala uporaba razkužil tudi v živilski industriji. Biocidi imajo širši spekter delovanja kot antibiotiki. Medtem ko antibiotiki delujejo na specifično intracelularno tarčo, delujejo biocidi na številne celične tarče. Po Gramu negativne bakterije so bolj odporne na antiseptike in razkužila kot po Gramu pozitivne bakterije. Zunanja membrana po Gramu negativnih bakterij predstavlja bariero, ki zmanjša vstop številnih kemijsko nesorodnih vrst protibakterijskih spojin (McDonnell in Russell, 1999). Odpornost na biocide je lahko posledica delovanja izlivnih črpalk, ki so odgovorne tudi za večkratno odpornost na protimikrobne snovi. Mutacije tarčnega mesta, ki bi povzročile odpornost na biocide, so redke (Poole, 2002).

Triklosan je protimikrobna snov, ki se pogosto uporablja v izdelkih za osebno higieno. Pri bakterijah inhibira encim enoil-reduktazo in s tem preprečuje sintezo maščobnih kislin. V subinhibitornih koncentracijah prepreči vstop esencialnih hranilnih snovi v celico, v višjih koncentracijah pa poškoduje celično membrano in povzroči celično smrt (McMurty in sod., 1998; McDonnell in Russell, 1999; Villalaín in sod., 2001; Gomez Escalada in sod., 2005).

Trinatrijev fosfat je protimikrobna snov, ki se uporablja za zmanjševanje mikrobne populacije na mesu. Protimikrobna aktivnost vključuje kombinacijo visoke vrednosti pH in ionske moči. Ti učinki povzročijo motnje v citoplazemski membrani in povečanje topnosti DNK v vodi (Yuk in Marshall, 2006).

Klorheksidini so substituirani bigvanidi z močnimi bazičnimi lastnostmi, ki s številnimi kislinami tvorijo stabilne soli kot je klorheksidin diacetat. Uporabljajo se v humane in veterinarske namene (Holešova in sod., 2010). Preprečujejo nastajanje spor, povzročijo lizo bakterijske celice, v visokih koncentracijah pa obarjanje proteinov in nukleinskih kislin (McDonnell in Russell, 1999).

Cetilpiridinijev in benzalkonijev klorid sta protimikrobni snovi, ki spadata v skupino kvartarnih amonijevih spojin. Te spojine delujejo na citoplazemsko membrano (McDonnell in Russell, 1999). Protimikrobna aktivnost cetilpiridinijevega klorida je povezana z interakcijo bazičnega cetilpiridinijevega iona s kislimi skupinami na površini bakterijske celice, kar povzroči nastanek ionskih spojin, ki motijo respiracijo in tako inhibirajo bakterijski metabolizam (Pohlman in sod., 2002).

Natrijev dodecil sulfat (SDS) je anionski detergent, ki poruši terciarno in sekundarno strukturo proteinov in jim da negativni naboj. V stiku s celico povzroči raztapljanje celične membrane in denaturacijo proteinov (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, 1997).

2.2.3 Izlivne črpalke

Membranski izlivni transport je poznan pri prokarionskih in evkarionskih celicah. Membranske izlivne črpalke so ubikvitarni proteini lokalizirani v citoplazemski membrani. Vključene so v izločanje toksičnih spojin iz notranjosti celice v zunanje okolje. Lahko so specializirane za transport ene same komponente ali pa prenašajo kemijsko različne spojine in so tako odgovorne za večkratno odpornost (Van Bambeke in sod., 2003; Webber in Piddock, 2003). Iz celic ne odstranjujejo le protimikrobnih snovi ampak tudi barve, detergente in organska topila (Li in Nikado, 2004).

Izlivni sistemi so vključeni v vnos esencialnih hranilnih snovi in ionov, izločanje metabolitov in škodljivih substanc ter komunikacijo med celicami in okoljem (Li in Nikado, 2004). Poznamo pet različnih družin prenašalnih proteinov (Piddock, 2006):

- RND (angl. resistance nodulation division),
- MFS (angl. major facilitator superfamily),
- SMR (angl. staphylococcal multiresistance),
- MATE (angl. multidrug and toxic compound extrusion) in
- ABC (angl. ATP binding cassette).

Izlivne črpalke iz družine RND so protonski antiporterji, ki kot vir energije izkoriščajo gradient protonov preko celične membrane. Zgrajene so iz treh proteinov: transportnega proteina v notranji membrani, periplazmatskega proteina in proteina v zunanji membrani. Transportni protein v notranji membrani sprejme substrat in ga preko proteina na zunanji membrani transportira v zunanje okolje. Sodelovanje med njima je posredovano s periplazmatskim proteinom. Tovrstni proteini so bili opisani pri različnih bakterijah: AcrB pri *E. coli*, MexB pri *P. aeruginosa*, CmeB pri *C. jejuni* in MtrD pri *Neisseria gonorrhoeae*. Primerjalna genomika je odkrila visoko stopnjo homologije med geni, ki kodirajo proteine izlivnih črpalk družine RND (nad 70 %) in aminokislinskimi sekvencami njihovih proteinskih produktov (do 80 %) med istimi vrstami, kot tudi med različnimi vrstami bakterij. Geni, ki kodirajo izlivne črpalke, so organizirani v operon s skupnim promotorjem v naslednjem vrstnem redu: regulator, sledi mu gen, ki kodira periplazmatski protein, gen, ki kodira protein v notranji membrani in gen, ki kodira protein v zunanji membrani (Piddock, 2006; Eswaran in sod., 2004).

Najbolj raziskani črpalke družine MFS sta NorA pri bakteriji *Staphylococcus aureus* in PmrA pri bakteriji *Streptococcus pneumoniae*. Zgrajeni sta iz 12-ih hidrofobnih transmembranskih regij (Piddock, 2006; Yoshida in sod., 1990). Te črpalke so sposobne prenosa majhnih topljencev kot odgovor na kemoosmotski ionski gradient. Znotraj družine MFS je še 17 družin črpalk (Pao in sod., 1998).

Prenašalci družine SMR so protonski antiporterji. So najmanjši znani transporterji. Vsebujejo le okoli 100 aminokislin. Tovrstni prenašalci so bili opisani pri bakterijah *S. aureus* in *E. coli* (Li in Nikaido, 2004; Schuldiner in sod., 1997).

Izlivne črpalke iz družine MATE so bile opisane pri številnih bakterijah kot so *Vibrio parahaemolyticus* (NorM), *Vibrio cholerae* (VcrM in VcmA), *Bacteroides*

thetaitaomicron (BexA), *Haemophilus influenzae* (HmrM), *Pseudomonas aeruginosa* (PmpM), *Clostridium difficile* (CdeA) in *Staphylococcus aureus* (MepA). Kot vir energije uporabljajo gradient protonov in natrija preko celične membrane. Transportirajo podobne snovi kot črpalke iz družine RND. Razlika med njimi je v zgradbi. Z razliko od črpalk iz družine RND črpalke MATE niso sestavljene iz treh proteinov (Piddock, 2006).

Prenašalce ABC najdemo tako pri mikroorganizmih kot tudi pri ljudeh. Vključeni so v transport številnih snovi, vključno z monosaharidi, aminokislinami, ioni, zdravili, polisaharidi in proteini. Povezani so s protimikrobno in protifungicidno odpornostjo. Pri ljudeh jih povezujejo z genetskimi obolenji, kot so cistična fibroza, motnje v transportu holesterola in odpornost na zdravila za zdravljenje raka. Zgrajeni so iz dveh citoplazemskih področij, ki vežejo molekule ATP in dveh hidrofobnih transmembranskih področij. Vir energije jim predstavlja hidroliza molekul ATP (Fath in Kolter, 1993; Higgins, 2001).

2.2.3.1 Črpalka CmeABC pri bakterijah rodu *Campylobacter*

Črpalka CmeABC je energijsko odvisen izlivni sistem, ki sodeluje pri intrinzični odpornosti bakterij *Campylobacter* na različna protimikrobna sredstva. Spada v družino RND prenašalnih proteinov. Sestavljena je iz periplazmatskega fuzijskega proteina CmeA, transportnega proteina CmeB na notranji celični membrani in proteina CmeC na zunanji celični membrani. Vsi trije proteini skupaj oblikujejo membranski kanal, skozi katerega se izločajo protimikrobne snovi in ostale toksične komponente. Kodirani so s tremi geni: *cmeA*, *cmeB* in *cmeC*, ki so organizirani v operon s skupnim promotorjem, tako kot pri ostalih poznanih izlivnih črpalkah iz te družine, npr. sistem MexAB-OprM pri *P. aeruginosa*. Stop kodon (TAA) gena *cmeA* prekriva start kodon (ATG) gena *cmeB*, med tem ko se gena *cmeB* in *cmeC* prekrivata z osmimi nukleotidi (Lin in sod., 2002, 2003). Pri transportu različnih komponent iz bakterijske celice proti njihovem koncentracijskemu gradientu se kot vir energije izkorišča gradient protonov (Van Bambeke in sod., 2000). Izražanje črpalke CmeABC je nadzorovano s transkripcijskim represorjem CmeR, kodiranim z genom *cmeR*, ki se nahaja pred geni *cmeABC*. Protein CmeR se veže na obrnjeno zaporedje v promotorski regiji in s tem inhibira izražanje operona (Lin in sod., 2005). Izražanje črpalke je inducirano s substrati, ki jih črpalka izčrpava. Žolčne soli se vežejo na CmeR, ki se nato sprosti s promotorja in tako je omogočeno prepisovanje. Cagliero in sod. (2006) so ugotovili, da obstaja visoka genetska raznolikost gena *cmeB* med različnimi sevi bakterij *C. jejuni* in *C. coli*. Z metodo PCR-RFLP so dokazali 4 različne vzorce med petimi sevi *C. jejuni* in 14 različnih vzorcev med 16-imi sevi *C. coli*.

Druga RND izlivna črpalka pri bakterijah *Campylobacter* je CmeDEF, sestavljena iz treh membranskih proteinov: CmeD v zunanji membrani, periplazmatski protein CmeE in CmeF na notranji membrani. CmeDEF sodeluje s CmeABC pri protimikrobni odpornosti in vzdrževanju živosti celice. Črpalka CmeDEF igra pri tem sekundarno vlogo (Akiba in sod., 2006).

2.2.3.2 Inhibitorji izlivnih črpalk

V boju proti bakterijski odpornosti na protimikrobna sredstva imajo velik pomen inhibitorji izlivnih sistemov, kateri povečajo aktivnost obstoječih antibiotikov. V tem primeru je antibiotik uporabljen skupaj z inhibitorjem, ki nevtralizira odpornost. Na tak način so antibiotiki, na katere je organizem odporen, spet uporabni (Marquez, 2005). Znana sta dva načina inhibicije izlivnih sistemov: sprememba obstoječih antibiotikov tako, da ima efluks minimalen učinek, ter uporaba terapevtskih substanc, t.i. inhibitorjev izlivnih črpalk, ki inhibirajo transportno aktivnost izlivnih črpalk (Lomovskaya in Watkins, 2001). Inhibitorji izlivnih črpalk prekinejo aktivnost črpalk na več načinov (Pagès in sod., 2005; Marquez, 2005):

- ustvarijo zamašek v kanalu zunanje membrane,
- tekmujejo s substrati črpalk za vezalna mesta v črpalki notranje membrane,
- spremenijo sestavo črpalke,
- s substrati tvorijo kompleks in tako preprečijo njegovo izločanje zaradi velikosti kompleksa.

Domneven inhibitor izlivnih črpalk PAβN (angl. phenylalanine-arginine beta-naphthylamide) je močno povečal odpornost bakterij *Campylobacter* na žolčne soli, eritromicin in fluorokinolone (Lin in Martinez; 2006; Kurinčič in sod., 2007).

2.2.4 Mehanizmi odpornosti bakterij rodu *Campylobacter*

2.2.4.1 Odpornost na antibiotike

V zadnjem desetletju je bil v svetu opažen nezaželen in problematičen pojav večkratno odpornih bakterij *Campylobacter* proti makrolidom in fluorokinolonom, ki so glavna terapevtska sredstva za zdravljenje kampilobakterioz (Randall in sod., 2003; Kurinčič in sod., 2005; Moore in sod., 2006; Taremi in sod., 2006; Shin in Lee, 2007).

Makrolidi, kot je na primer eritromicin, inhibirajo sintezo proteinov, tako da se vežejo na 23S rRNA na 50S podenoti ribosoma. Pri visoko odpornih vrstah *C. jejuni* in *C. coli* proti eritromicinu so potrdili mutacije na domeni V gena 23S rRNA na mestu 2074 in 2075 (Gibreel in sod., 2005; Payot in sod., 2006; Kurinčič in sod., 2007).

Fluorokinoloni inhibirajo delovanje encima DNK giraza, ki ohranja negativno helično zvitje molekule DNK med njenim podvojevanjem in prepisovanjem in tako preprečijo njeno normalno podvojevanje. Pri bakterijah *Campylobacter* je glavni mehanizem odpornosti na fluorokinolone mutacija na genu *gyrA*, ki vodi v zamenjavo aminokisline Thr v Ile na mestu 86 (Zirnstein in sod., 2000; Payot in sod., 2004; Payot in sod., 2006).

K intrinzični in pridobljeni odpornosti proti makrolidom in fluorokinolonom pri bakterijah *Campylobacter* igra pomembno vlogo tudi efluks, predvsem izlivna črpalka CmeABC

(Luo in sod., 2003; Cagliero in sod., 2005; Ge in sod., 2005; Gibreel in sod., 2007; Kurinčič in sod., 2007).

2.2.4.2 Incidenca odpornih sevov

Raziskava, ki jo je izvedla EFSA leta 2008 med 22-imi državami članicami Evropske unije (EU) ter Švico in Norveško, je pokazala, da je raven odpornosti na protimikrobne snovi pri bakterijah rodu *Campylobacter*, izoliranih iz hrane in živali, večja kot pri izoliranih sevih salmonele. Odpornost je bila bolj pogosto prisotna pri sevih *C. coli*. Med sevi *C. jejuni*, izoliranimi iz kokoši *Gallus gallus*, je bila prisotna odpornost na tetraciklin (37 %), ciprofloksacin (50 %) in nalidiksično kislino (51 %). Nekoliko nižja je bila odpornost na eritromicin (3 %) in gentamicin (4 %). Pri izolatih *C. coli* pa je bila prisotna odpornost na tetraciklin (53 %), ciprofloksacin (62 %), nalidiksično kislino (61 %), eritromicin (12 %) in gentamicin (3 %). V primeru sevov *C. jejuni*, izoliranih iz mesa brojlerjev, je bila prisotna rezistenca na tetraciklin (38 %), ciprofloksacin (46 %), nalidiksično kislino (50 %) in eritromicin (3%). Iz prašičev izolirani sevi *C. coli* so bili odporni na tetraciklin (79 %), ciprofloksacin (39 %), nalidiksično kislino (39 %) in eritromicin (25 %). Sevi *C. jejuni* izolirani iz goveda so kazali odpornost na tetraciklin (28 %), ciprofloksacin (34 %), nalidiksično kislino (34 %) in eritromicin (1 %) (EFSA, 2010f). Leta 2007 je bilo v EU 0,8 % humanih izolatov *C. jejuni* odpornih na gentamicin, 33,6 % na ampicilin, 1,5 % na eritromicin, 26,1 % na tetraciklin, 38,3 % na nalidiksično kislino in 44,7 % na ciprofloksacin. V primeru humanih izolatov *C. coli* je bilo na gentamicin odpornih 49 %, na ampicilin 29,3 %, na eritromicin 15,4 %, na tetraciklin 54,5 %, na nalidiksično kislino 55,4 % in na ciprofloksacin 58,4 % izolatov. Večkratno odpornost je kazalo 12,2 % *C. jejuni* in 34,2 % *C. coli* humanih izolatov. V primerjavi z letom 2005 se je do 2007 povečala odpornost na vse antibiotike razen nalidiksične kisline (ECDC, 2007; ECDC 2006). V Sloveniji je bilo leta 2005 46,1 % humanih izolatov kampilobaktra odpornih na nalidiksično kislino in 44,1 % na ciprofloksacin (ECDC, 2005).

2.3 METODE DOLOČANJA GENETSKE RAZNOLIKOSTI

Nadzor alimentarnih bakterijskih patogenov temelji na identifikaciji izvora bakterij in poti prenosa. Ker so bakterije rodu *Campylobacter* v okolju vsesplošno prisotne, se okužba z njimi pojavlja sporadično in je identifikacija izvora zaradi tega težja. Med sevi *C. jejuni* in *C. coli* je bila dokazana velika raznolikost in jo je možno dokazati tako na fenotipskem kot genotipskem nivoju (Wassenaar in Newell, 2000). Tipizacija, ki označuje razlikovanje tipov, sevov ali klonov znotraj posamezne bakterijske vrste, je nujno potrebna, saj si številni mikroorganizmi delijo ekološke niše ali živijo v podobnih pogojih okolja. To je privedlo do razvoja številnih molekularnih tehnik, ki se uporabljajo za identifikacijo in natančno primerjavo med mikroorganizmi (van Belkum, 1994).

Klasične mikrobiološke metode temelijo na morfoloških lastnostih mikroorganizmov, načinu barvanja in sposobnost mikroorganizmov, da rastejo pod določenimi pogoji, kot so temperatura, prisotnost kisika, osmolarnost in potreba po določenih hranilnih snoveh. Biokemijski testi omogočajo razlikovanje med posameznimi rodovi mikroorganizmov in

identifikacijo vrste. Med fenotipske tehnike spadajo še fagotipizacija, serotipizacija in tipizacija na osnovi antibiogramov (van Belkum, 1994).

Genotipizacijske metode imajo prednost pred fenotipizacijskimi, saj rast celice in dejavniki okolja ne vplivajo na zaporedje nukleinskih kislin (de Boer in Beumer, 1999). Genotipizacijske metode so usmerjene direktno v analizo DNK ali RNK (Vandamme, 1996). Za presojo različnosti na molekularni ravni se uporabljajo podatki o količini baz v nukleotidih, zlasti razmerje med gvaninom in citozinom, zaporedje baz v DNK ali v RNK, zaporedje aminokislin v proteinih in proteinske oz. encimske profile (Nekrep, 1996). Z njimi identificiramo posamezne seve znotraj vrst, kar je nujno za epidemiološke in taksonomske študije (Čadež in Štorman, 2004). Najpogostejše uporabljene genotipizacijske metode za razlikovanje mikroorganizmov so prikazane v preglednici 1.

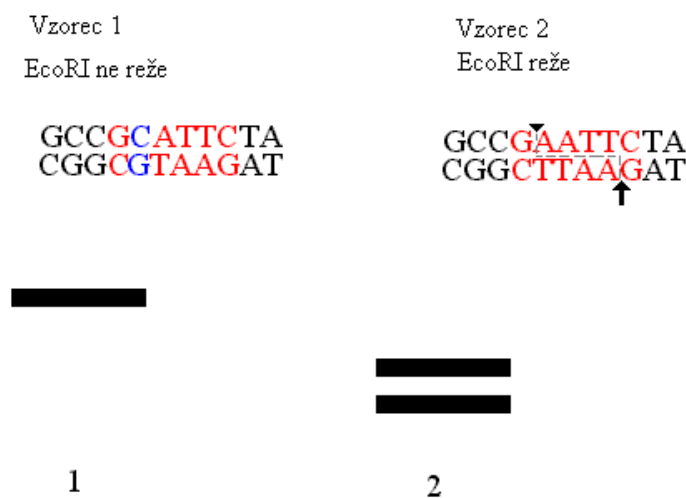
Preglednica 1: Genotipizacijske metode in zmožnost razlikovanja mikroorganizmov (Vandamme in sod., 1996; Čadež in Štorman, 2004)

OKRAJŠAVA	POMEN OKRAJŠAVE	NIVO RAZLIKOVANJA		
		ROD	VRSTA	SEV
AFLP	dolžinski polimorfizem pomnoženih fragmentov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)		X	X
AP-PCR (RAPD-PCR)	pomnoževanje DNK z naključnimi začetnimi oligonukleotidi s PCR (angl. Arbitrary Primed PCR in PCR of Random Amplified Polymorphic DNA)			X
ARDRA	restriksijska analiza fragmentov rDNK pomnoženih s PCR (angl. Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)	X	X	X
BOX-PCR	pomnoževanje elementov BOX s PCR (angl. PCR of BOX Elements)			X
RISA	restriksijska analiza fragmentov regije ITS pomoženih s PCR (angl. Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)		X	X
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. Pulsed-Field Gel Electrophoresis)		X	X
PCR-RFLP	polimorfizem dolžin restriksijskih fragmentov pomnoženih s PCR (angl. Restriction Fragment Length Polymorphisms of PCR Generated Amplicons)	X	X	X
RC-PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju DNK razrezane z restriksijskimi encimi (angl. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA Digested by Rare Cutting Endonucleases)			X
REP-PCR	pomnoževanje elementov REP s PCR (angl. PCR of DNA Sequences between Repetitive Extragenomic Palindromic Elements)			X

Omejitev metod, ki temeljijo na analizi nukleinskih kislin, je v tem, da kažejo le genetski potencial, ki ga ima bakterija za produkcijo toksina ali izražanja virulence, ne dajo pa informacije ali je toksin že prisoten v hrani in ali je virulenčni dejavnik že izražen. Ne omogočajo izolacije mikroorganizma in nadaljnjih analiz. So pa bolj zanesljive pri detekciji živih nekultivabilnih bakterijskih celic kot klasične metode (de Boer in Beumer, 1999).

2.3.1 PCR-RFLP (Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov pomnoženih s PCR)

Metoda RFLP se uporablja za primerjavo dolžine specifičnih restrikcijskih fragmentov večjega števila sevov (Burlage, 1998). PCR-RFLP se nanaša na prvotno pomnožitev specifične genske sekvence z reakcijo PCR, kateri sledi razrez pomnoženih sekvenc z enim ali večimi restrikcijskimi encimi. Produkti restrikcije se ločijo elektroforetsko na agaroznem gelu, kar je prikazano na sliki 4. Razlika v številu in velikosti fragmentov nam omogoča razlikovanje med posameznimi sevi (Levin, 2010). Rezultate analize RFLP težje razlagamo, če uporabimo encim, ki ima veliko restrikcijskih mest. V takem primeru dobimo več kot 100 fragmentov, ki jih lahko primerjamo med bakterijskimi izolati. Zato moramo uporabiti encim, ki ima malo restrikcijskih mest in specializirano elektroforetsko metodo za ločevanje velikih DNK fragmentov (Foley in sod., 2009).

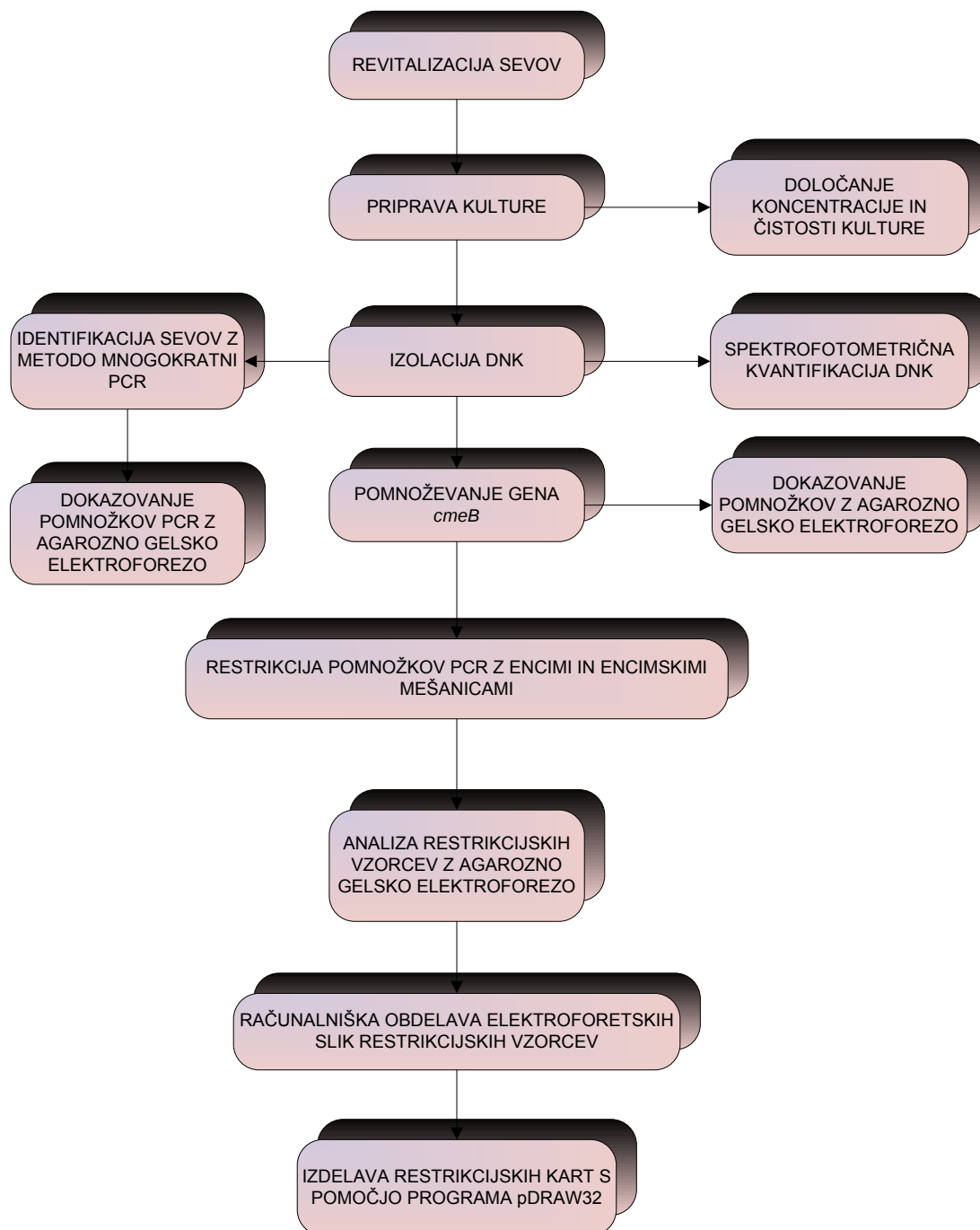


Slika 4: Reakcija RFLP in ločitev fragmentov z elektroforezo (Wolfe, 2006)

Metoda PCR-RFLP je relativno hitra, ima širok spekter uporabe in je primerna alternativa serotipizaciji (Shi in sod., 2002). Uporablja se za tipizacijo gena *flaA* pri bakterijah *Campylobacter* (Nachamkin in sod., 1993; Ayling in sod., 1996; Nishimura in sod., 1996; Wassenaar in Newell, 2000). Cagliero in sod. (2006) so z metodo PCR-RFLP določali genetsko raznolikost gena *cmeB* pri bakterijah *Campylobacter*.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 5: Potek eksperimentalnega dela

3.2 MATERIAL

3.2.1 Bakterijski sevi

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali 42 bakterijskih sevov Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete. Navedeni so v preglednici 2.

Preglednica 2: Bakterijski sevi vrste *Campylobacter coli* in *Campylobacter jejuni*

ZAPOREDNO ŠT.	OZNAKA SEVA	IZVOR
1	137	piščančji
2	171	piščančji
3	140	piščančji
4	K27/4	piščančji
5	K30/2	piščančji
6	K32/2	piščančji
7	K33/1	piščančji
8	M37	piščančji
9	158	piščančji
10	K49/4	piščančji
11	K34/1	piščančji
12	K45/4	piščančji
13	K50/4	piščančji
14	1080	humani
15	557	humani
16	6553-05	humani
17	2235	humani
18	3341-05	humani
19	10162	humani
20	10522	humani
21	6272-05	humani
22	375-06	humani
23	481	humani
24	3552	humani
25	413-06	humani
26	VC 7114	piščančji
27	VC 11076	prašičji
28	VC 110722	prašičji
29	VC 110725	prašičji
30	653	vodni
31	807	vodni
32	850	vodni
33	2782	vodni
34	1845	vodni

... se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Bakterijski sevi vrste *Campylobacter coli* in *Campylobacter jejuni*

ZAPOREDNO ŠT.	OZNAKA SEVA	IZVOR
35	803	vodni
36	652/1	vodni
37	944	vodni
38	809	vodni
39	655	vodni
40	ATCC 33559	prašičji feces
41	ATCC 33560	goveji
42	NCTC 11168	humani

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili različna gojišča, ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalca:

- Gojišče Brain Heart Infusion (BHI) (CM0375, Oxoid, Anglija),
- Gojišče Mueller Hinton Broth (MHB) (CM0405B, Oxoid, Anglija),
- Columbia agar (CM0331B, Oxoid, Anglija),
- Karmali agar (CM0935B, Oxoid, Anglija).

3.2.2.1 Reagenti za izolacijo DNA

- Fosfatni pufer (PBS pufer) (BR00146, Oxoid, Anglija),
- QIAamp DNA Mini Kit (51304, Qiagen, Nemčija),
- Absolutni etanol (1.00983.1000, Merck, Nemčija),
- Bidestilirana voda Milli-Q (Millipore, Francija).

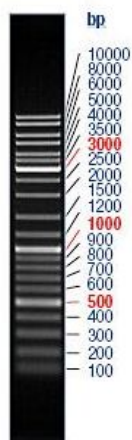
3.2.2.2 Reagenti za reakcijo PCR

- Pufer REDTaq PCR 10x (100 mM Tris HCl; pH=8,3; 500 mM KCl; 11 mM MgCl₂; 0,1 % gelatin) (B5926, Sigma, ZDA)
- Mešanica deoksinukleotid trifosfatov – dNTP (10mM) (18427-013, Invitrogen, ZDA)
- Oligonukleotini začetniki:
 - o COL 3.3 GGTATGATTCTACAAAGCGAG (K7990A05, Invitrogen, ZDA)
 - o COL 4.4 ATAAAAGACTATCGTCGCGTG (K7990A06, Invitrogen, ZDA)
 - o JEJ 3.3. GAAGAGGGTTTGGGTGGTG (K7990A07, Invitrogen, ZDA)
 - o JEJ 4.4 AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG (K7990A06, Invitrogen, ZDA)

- o cmeA1078Fwd GAAGTTAAAGAAATTGGAGCACAATAA (C9517F04, Invitrogen, ZDA)
- o cmeC47Rev TGGACTTAAAGAGCAAGCTGAAA (C9456E0, Invitrogen, ZDA)
- REDTaq DNA polimeraza (D4309, Sigma, ZDA)
- Voda za PCR – Nuclease Free H₂O_{PCR} (129114, Qiagen, Nemčija)

3.2.2.3 Reagenti za določanje pomnožkov PCR

- Pufer TAE 10x (pH 8,1)
 - o 0,4 M raztopina Tris baze (H5232, Promega, ZDA)
 - o 0,2 M raztopina očetne kisline (1.0063.1000, Merck, Nemčija)
 - o 0,02 M raztopina Na₂-EDTA (E 5134, Sigma, Nemčija)
- Agarozni gel
 - o Pufer TAE 0,5x
 - o Agaroz (50015, FMC BioProducts, ZDA)
 - o Fluorescentno barvilo SYBR Safe (S33102, Invitrogen, ZDA)
- Voda za PCR – Nuclease Free H₂O_{PCR} (129114, Qiagen, Nemčija)
- Barvilo za nanos pomnožkov PCR na gel – GelPilot DNA Loading Dye, 5x (239901, Qiagen, Nemčija)
- Molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK GeneRuler DNA Ladder Mix (SM0331, Fermentas, ZDA) (slika 6)



Slika 6: Velikost fragmentov molekularnega označevalca dolžin pomnožkov po agarozni gelski elektroforezi (Fermentas, 2011a)

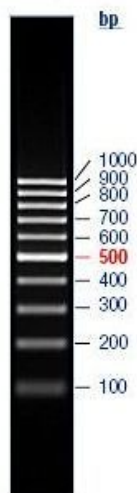
3.2.2.4 Reagenti za restrikcijo pomnožkov PCR

- Voda za PCR – Nuclease Free H₂O_{PCR} (129114, Qiagen, Nemčija)
- Restriksijski encimi:
 - o *Hind*III (R6041, Promega, ZDA)
 - o *Pvu*II (R6331, Promega, ZDA)

- o *XmnI* (R7271, Promega, ZDA)
 - o *HaeII* (R6661, Promega, ZDA)
 - o *EcoRV* (R6351, Promega, ZDA)
 - o *EcoRI* (R6011, Promega, ZDA)
 - o *PstI* (R6111, Promega, ZDA)
 - o *BsmAI* (R0529S, BioLabs, Anglija)
- Pufer B (60 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM DTT) (R002A, Promega, ZDA)
- Pufer H (900 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂) (R008A, Promega, ZDA)
- Pufer Multicore (250 mM Tris-acetat (pH 7,8), 1 M kalijev acetat, 100 mM magnezijev acetat, 10 mM DTT) (R999A, Promega, ZDA)
- Pufer NEBuffer 4 (20 mM Tris-acetat, 50 mM kalijev acetat, 10 mM magnezijev acetat, 1 mM DTT) (B7004S, BioLabs, Anglija)

3.2.2.5 Reagenti za analizo restrikcijskih vzorcev

- Pufer TAE 10x (pH 8,1)
 - o 0,4 M raztopina Tris baze (H5232, Promega, ZDA)
 - o 0,2 M raztopina očetne kisline (1.0063.1000, Merck, Nemčija)
 - o 0,02 M raztopina Na₂-EDTA (E 5134, Sigma, Nemčija)
- Agarozni gel
 - o Pufer TAE 0,5x
 - o Agaroz (50015, FMC BioProducts, ZDA)
 - o Fluorescentno barvilo SYBR Safe (S33102, Invitrogen, ZDA)
- Voda za PCR – Nuclease Free H₂O_{PCR} (129114, Qiagen, Nemčija)
- Barvilo za nanos pomnožkov PCR na gel GelPilot DNA Loading Dye, 5x (239901, Qiagen, Nemčija)
- Molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK GeneRuler DNA Ladder Mix (SM0331, Fermentas, ZDA)
- Molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK GeneRuler 100bp DNA Ladder (SM0241, Fermentas, ZDA) (slika 7)



Slika 7: Velikost fragmentov molekularnega označevalca dolžin pomnožkov po agarozni gelski elektroforezi (Fermentas, 2011b)

3.2.2.6 Drugi reagenti

- Ringerjeva raztopina (1.15525.0001, Merck, Nemčija)
- Glicerol (0711901, Kemika, Hrvaška)

3.2.3 Laboratorijska oprema

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali različno laboratorijsko opremo, ki je navedena v preglednici 3.

Preglednica 3: Laboratorijska oprema

APARATURA	OZNAKA	PROIZVAJALEC
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Jugoslavija
Avtomatske pipete	P10, P100, P1000	Gilson, Francija
	P10, P100, P1000	Eppendorf, Nemčija
Aparatura za PCR	GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystem, ZDA
Aparatura PCR	Gene Amp DNA Thermal Cycler 2400	Perkin Elmer, ZDA
Centrifuga	Mini spin PLUS	Eppendorf, Nemčija
Čitalec mikrotitrskih ploščic	Safire ²	Tecan, Avstrija
Digestorij	Tip 382	MED-LAB Rauh, Slovenija
Elektroforeza	PowrePac Basic	BioRad, ZDA
Hladilnik	/	Zanussi, Italija
	/	LHT, Slovenija
	/	Gorenje, Slovenija

... se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3: Laboratorijska oprema

APARATURA	OZNAKA	PROIZVAJALEC
Inkubatorji	I-115C	Kambič, Slovenija
	SP190	Kambič, Slovenija
Komora za PCR	Holten Laminar Air	Heto-Holten, Nemčija
Mikrovalovna pečica	Cookgrill 1300	Sanyo, Japonska
pH-meter	InLab pH combination liquid electrodes	Mettler Toledo, Švica
Sistem za dokumentiranje gelov	Gel doc 2000	BioRad, ZDA
Spektrofotometer	Tecan Safire ²	Tecan, Avstrija
Stresalnik	Thermomixer comfort	Eppendorf, Nemčija
Sušilnik	SO-260	Elektromedicina, Slovenija
Tehtnica	PB1502-S	Mettler Toledo, Švica
Vrtinčno mešalo	Yellow Line TTS2	IKA, ZDA
Zamrzovalnik (-20 °C)	/	LHT, Slovenija
	/	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80 °C)	Heto Ultra Freeze	Thermo Electron

Poleg opreme, našteje v preglednici 3, smo pri eksperimentalnem delu uporabili tudi gorilnike, cepilne zanke, čaše, mikrocentrifugirke (2 ml, 1,5 ml), PCR mikrocentrifugirke, epruvete, filtre za mikrofiltracijo, merilne valje, erlenmajerice, nastavke za pipete (1 ml, 100 µl, 10 µl), petrijevke, pincete, skalpele, steklenice, steklene bučke, stojala, štoparice, plin za pripravo mikroaerofilne atmosfere (Istrabenz plin), vrečke za vzpostavitev mikroaerofilne atmosfere CampyGen (CN35, Oxoid, Anglija), vrečke za sterilizacijo, anaerobne lonce (Oxoid, Anglija) in mikrotitrne plošče (Nunc, Danska).

3.3 METODE

3.3.1 Revitalizacija bakterijskih sevov

Bakterijski sevi so bili shranjeni v tekočem gojišču BHI (Brain Heart Infusion) z dodatkom glicerola (20 %) (0711901, Kemika, Hrvaška) in defibrilirane konjske krvi (20 %) (SR0048C, Oxoid, Anglija) pri temperaturi -80 °C (Herman in sod., 2003). Seve smo s cepilno zanko aseptično prenesli na agar Columbia s 5 % dodatkom defibrilirane konjske krvi, selektivnim dodatkom *Campylobacter* Selective Supplement (SR0069E, Oxoid, Anglija) in dodatkom za rast *Campylobacter* Growth Supplement (SR0232E, Oxoid, Anglija). Plošče smo inkubirali 24 ur pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi (5 % O₂, 1 % CO₂ in 85 % N₂). Po inkubaciji smo kolonije precepili na sveže gojišče Columbia in ponovno inkubirali 24 ur pod enakimi pogoji.

3.3.2 Priprava kulture v tekočem gojišču MHB

Po 24-urni inkubaciji kulture na krvnem agarju Columbia smo kolonije resuspendirali v 5 ml tekočega gojišča MHB in inkubirali 18 – 20 ur pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi.

3.3.3 Preverjanje koncentracije in čistosti bakterijske kulture

Pripravili smo 10-kratne razredčitve suspenzije 18 – 20-urne bakterijske kulture v gojišču MHB v Ringerjevi raztopini, jih nacepili na Karmali agar, kateremu je bil dodan selektivni dodatek *Campylobacter* Selective Supplement (SR0167E, Oxoid, Anglija), in inkubirali 24 ur pri 42 °C v mikroaerofilni atmosferi. Koncentracijo in čistost bakterijske kulture smo določili s štetjem na števnih ploščah ob upoštevanju razredčitvenega faktorja.

3.3.4 Izolacija DNK

DNK smo izolirali s setom kemikalij QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Postopek izolacije smo izvedli po navodilih proizvajalca (Qiagen, 2007):

- 1 ml bakterijske kulture v tekočem gojišču smo odpipetirali v mikrocentrifugirke in centrifugirali 5 min na 7500 rpm.
- Supernatant smo odlili in in dodali pufer ATL (pufer za lizo tkiva) ter ponovno centrifugirali 5 minut pri 7500 rpm.
- Po centrifugiranju smo supernatant odlili in usedlini dodali proteinazo K, pomešali na vrtničnem mešalniku ter inkubirali 3 ure pri 56 °C ob stalnem mešanju.
- Po inkubaciji smo mikrocentrifugirke kratko centrifugirali in dodali 200 µl pufra AL (pufer za lizo), pomešali na vrtničnem mešalniku in inkubirali 10 minut na 70 °C.
- Po inkubaciji smo mikrocentrifugirke zopet kratko centrifugirali, dodali 200 µL etanola (96-100 %), pomešali na vrtničnem mešalniku in ponovno kratko centrifugirali.
- Vsebinsko smo prenesli v posebne mikrocentrifugirke z filtrom in zbiralno epruveto in centrifugirali 1 minuto pri 8000 rpm.
- Mikrocentrifugirko s filtrom smo prenesli v novo zbiralno epruveto in dodali 500 µl pufra AW1 (pufer za spiranje), filtrat smo zavrgli. Mikrocentrifugirko smo nato centrifugirali 1 minuto pri 8000 rpm.
- Filtrat smo zopet zavrgli in mikrocentrifugirko s filtrom prenesli v novo zbiralno epruveto. Dodali smo 500 µl pufra AW2 (pufer za spiranje) in centrifugirali 3 minute pri 14000 rpm.
- Mikrocentrifugirko s filtrom smo še enkrat prenesli v novo zbiralno epruveto in centrifugirali 1 minuto pri 14000 rpm.
- Po centrifugiranju smo mikrocentrifugirko s filtrom ponovno prenesli v novo zbiralno epruveto in dodali 200 µl pufra AE (pufer za elucijo), inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi in centrifugirali 1 minuto pri 8000 rpm. Postopek smo še enkrat ponovili.
- Filtrat (izolirano DNK) smo shranili na – 20 °C.

3.3.5 Spektrofotometrična kvantifikacija DNK

Izolirani DNK smo spektrofotometrično določili koncentracijo in čistost z merjenjem absorbance pri 260 nm in 280 nm s čitalcem mikrotitrskih plošč (Tecan). Za slepo probo smo uporabili bidestilirano vodo. Iz meritev smo izračunali koncentracijo DNK po naslednji formuli:

$$C_{DNK} = \bar{A}_{260nm} \cdot R \cdot F \quad (\text{ng}/\mu\text{l}) \quad \dots(1)$$

R = razredčitveni faktor (1)

F = faktor za DNK (50 ng/μl)

Iz razmerja A_{260} in A_{280} smo določili čistost DNK.

$$\frac{A_{260nm}}{A_{280nm}} = 1,8 - 2,0 \quad \dots(2)$$

A_{280nm} – absorpcijski maksimum proteinov

3.3.6 Identifikacija sevov z reakcijo mnogokratni PCR

3.3.6.1 Priprava reakcijske mešanice

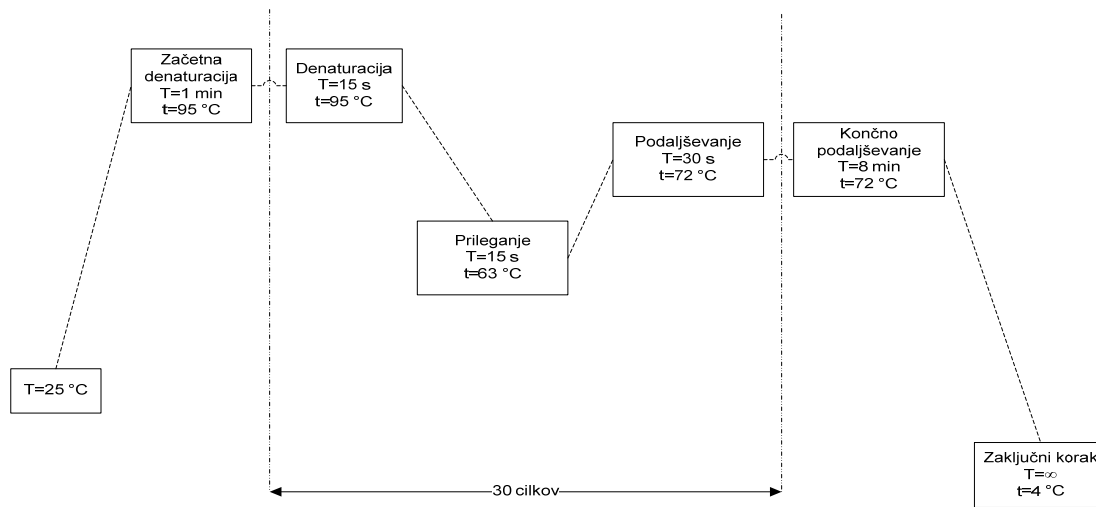
Pripravili smo reagente v obliki skupne reakcijske mešanice, kateri smo tik pred PCR dodali izolirano DNK. Upoštevali smo tudi negativno kontrolo reakcije, kjer smo DNK nadomestili s H_2O_{PCR} . Za pozitivno kontrolo reakcije smo uporabili DNK referenčnih sevov *C. coli* ATCC33559, *C. jejuni* ATCC33560 in *C. jejuni* NCTC11168.

25 μL reakcijske mešanice je vsebovalo (Zorman in Smole Možina, 2002):

- o H_2O_{PCR} ,
- o Pufer REDTaq PCR 10x: 1X,
- o dNTP mix (10 mM): 200 μM,
- o Oligonukleotidne začetnike (1 mg/ml):
 - COL 3.3: 1 mg/ml,
 - COL 4.4: 1 mg/ml,
 - JEJ 3.3: 1 mg/ml in
 - JEJ 4.4: 1 mg/ml
- o REDTaq DNK-polimerazo: 1 U/ml,
- o Izolirana DNK: 1 μl.

3.3.6.2 Potek reakcije mnogokratni PCR

Mikrocentrifugirke s 25 µL reakcijske mešanice smo razvrstili v aparaturo za PCR. Začetni 1 minutni denaturaciji DNK na 95 °C je sledilo 30 ciklov, sestavljenih iz 15 s denaturacije na 95 °C, 15 s prileganja na 63 °C in 30 s podaljševanja na 72 °C. Sledilo je končno podaljševanje 8 min pri 72 °C in ohlajanje na 4 °C (slika 8) (Zorman in Smole Možina, 2002).



Slika 8: Prikaz časovnega in temperaturnega poteka reakcije mnogokratni PCR

3.3.6.3 Dokazovanje pomnožkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo

Pomnožke PCR smo dokazovali z agarozno gelsko elektroforezo v 1,5 % agaroznem gelu z dodatkom reagenta SYBR Safe v pufru TAE 0,5x. Na agarozni gel smo nanесли 5 µL pomnožka in molekularni označevalec dolžin pomnožkov (GeneRuler DNA Ladder Mix). Elektroforeza je potekala pri konstantni električni napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo gel opazovali pod UV svetlobo in ga računalniško dokumentirali. Velikost pomnožkov smo določili glede na velikost fragmentov molekularnega označevalca. Prisotnost pomnožkov velikosti 500 bp za *C. coli* in 735 bp za *C. jejuni* je pomenila pozitiven rezultat (Zorman in Smole Možina, 2002).

3.3.7 Pomnoževanje gena *cmeB*

3.3.7.1 Priprava reakcijske mešanice

Pripravili smo reagente v obliki skupne reakcijske mešanice, kateri smo tik pred PCR dodali izolirano DNK (slika 10). Upoštevali smo tudi negativno kontrolo reakcije, kjer smo

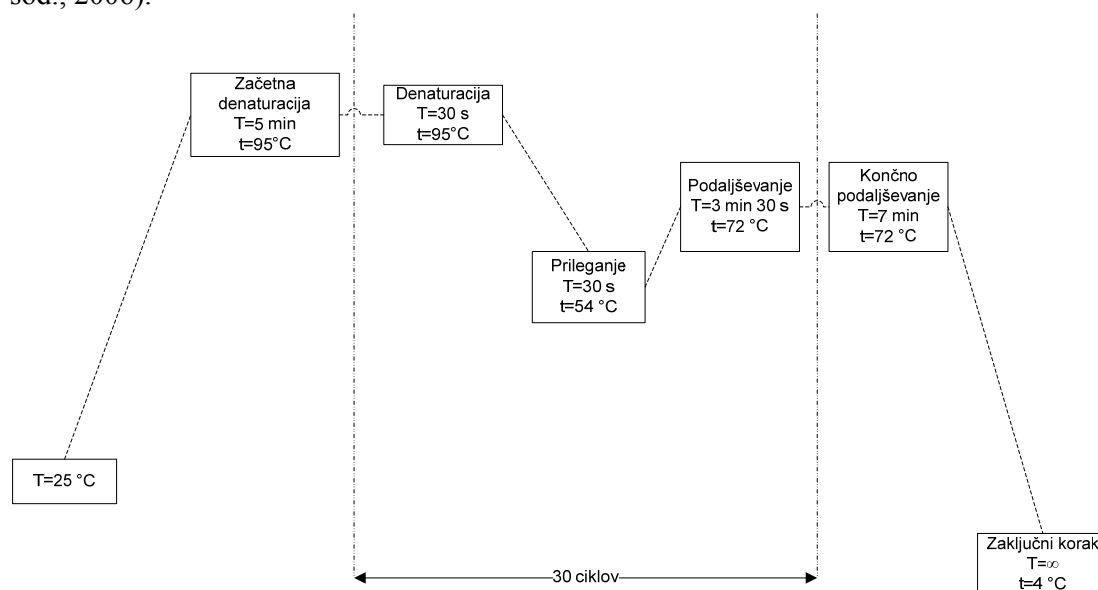
DNK nadomestili s H_2O_{PCR} . Za pozitivno kontrolo reakcije smo uporabili DNK referenčnega seva *C. jejuni* NCTC11168 (Cagliero in sod., 2006).

100 μ L reakcijske mešanice je vsebovalo (Cagliero in sod., 2006):

- o H_2O_{PCR} ,
- o Pufer REDTaq PCR 10x: 1X,
- o dNTP mix (10 mM): 200 μ M,
- o Oligonukleotidna začetnika:
 - *cmeA1078Fwd* (100 μ M): 100 pmol in
 - *cmeC47Rev* (100 μ M): 100 pmol
- o REDTaq DNK-polimerazo (1 U/ μ L): 0,05 U/ μ L,
- o Izolirana DNK: 10 μ L.

3.3.7.2 Potek reakcije PCR

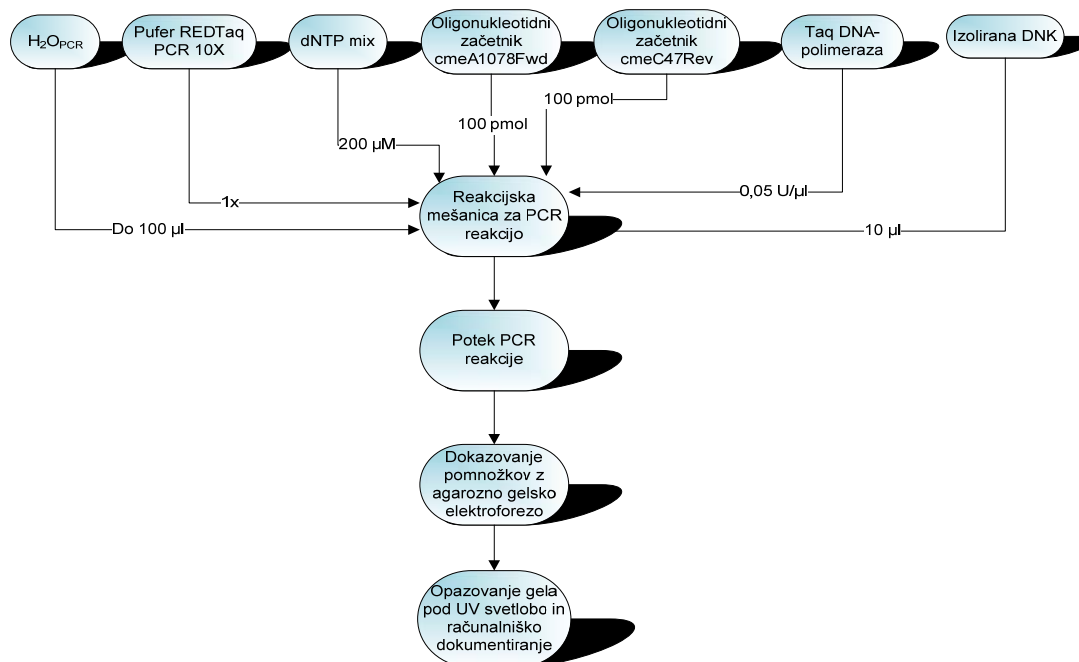
Mikrocentrifugirke s 100 μ L reakcijske mešanice smo razvrstili v aparaturo za PCR. Začetni 5 min denaturaciji DNK pri 95 °C je sledilo 30 ciklov, sestavljenih iz 30 s denaturacije pri 95 °C, 30 s prileganja pri 54 °C, 3 min 30 s podaljševanja pri 72 °C. Sledilo je končno podaljševanje 7 min pri 72 °C in ohlajanje na 4 °C (slika 9) (Cagliero in sod., 2006).



Slika 9: Prikaz časovnega in temperaturnega poteka PCR

3.3.7.3 Dokazovanje pomnožkov PCR z agarozno gelsko elektroforezo

Pomnožke PCR smo dokazovali z agarozno gelsko elektroforezo, kot je opisano v točki 3.3.6.3. Velikost pomnožkov smo določili glede na velikost fragmentov molekularnega označevalca. Prisotnost pomnožkov velikosti 3213 bp je pomenila pozitivni rezultat (Cagliero in sod., 2006).



Slika 10: Potek izvedbe PCR reakcije in dokazovanja pomnožkov

3.3.8 Restrikcija pomnožkov PCR

Restriksijsko analizo pomnožkov PCR smo naredili z metodo, ki so jo opisali Cagliero in sod. (2006) z nekaj spremembami. Za vsak pomnožek PCR smo pripravili 12 restriksijskih mešanic. Prikazane so v preglednici 4.

Preglednica 4: Sestava reakcijskih mešanic za restrikcijo pomnožkov PCR

Restriksijski encim / mešanica restriksijskih encimov	Restriksijski pufer
<i>Hind</i> III	Pufer B
<i>Pvu</i> II	Pufer B
<i>Hae</i> II	Pufer B
<i>Xmn</i> I	Pufer B
<i>Eco</i> RV	Multicore
<i>Eco</i> RI	Pufer H
<i>Pst</i> I	Pufer H
<i>Bsm</i> AI	NE pufer 4
<i>Hind</i> III - <i>Pvu</i> II	Pufer B
<i>Pvu</i> II - <i>Xmn</i> I	Pufer B
<i>Hae</i> II - <i>Hind</i> III	Pufer B
<i>Eco</i> RI - <i>Pst</i> I	Pufer H

15 mL reakcijske mešanice je vsebovalo:

- o Restriksijski encim: 5U
- o Ustrezni restriksijski pufer 10X: 1,5 µL
- o H₂O_{PCR}

o Pomnožek PCR: 12,5 µL

Restriksijske mešanice smo inkubirali 3 h pri 37 °C z izjemo mešanice z encimom *BsmAI*, ki smo jo inkubirali pri 55 °C.

3.3.8.1 Analiza restriksijskih vzorcev z agarozno gelsko elektroforezo

Reakcijske fragmente smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo kot je opisano v točki 3.3.6.3. Na gel smo nanесли 15 µL restriksijskega vzorca. Velikost restriksijskih fragmentov smo določili glede na velikost fragmentov molekularnega označevalca z računalniškim programom Quantity One 4.6.3 (Caglierio in sod., 2006).

3.3.9 Izdelava restriksijskih kart gena *cmeB*

3.3.9.1 Izdelava restriksijskih kart gena *cmeB* sevov *Campylobacter* z znanim nukleotidnim zaporedjem

Za seve *Campylobacter* z znanim nukleotidnim zaporedjem gena *cmeB* (preglednica 5) smo iz podatkovne baze GenBank (Benson in sod., 2010) pridobili nukleotidne sekvence gena *cmeB*. S programom pDRAW32 (AcaClone, 2011) smo izdelali virtualne elektroforetske gele in restriksijske karte. S pomočjo restriksijskih kart, izdelanih s programom pDRAW32, pa smo restriksijske karte pripravili še v programu Microsoft Office Excel. Le te smo kasneje uporabili za izdelavo restriksijskih kart gena *cmeB* sevov z neznanim nukleotidnim zaporedjem.

Preglednica 5: Sevi *Campylobacter* z znanimi nukleotidnimi zaporedji gena *cmeB* in številke dostopa v podatkovni bazi GenBank

Oznaka seva	Vrsta	Številka dostopa
NCTC 11168 ^a	<i>C. jejuni</i>	NC002163
ATCC 33559 ^a	<i>C. coli</i>	FJ797670
NCTC 81-176	<i>C. jejuni</i>	EAQ73164
596	<i>C. coli</i>	DQ333455
275	<i>C. coli</i>	DQ333456

^a Seva *C. jejuni* NCTC 11168 in *C. coli* ATCC 33559 sta bila vključena v analizo PCR-RFLP

3.3.9.2 Izdelava restriksijskih kart gena *cmeB* sevov *Campylobacter* različnega izvora

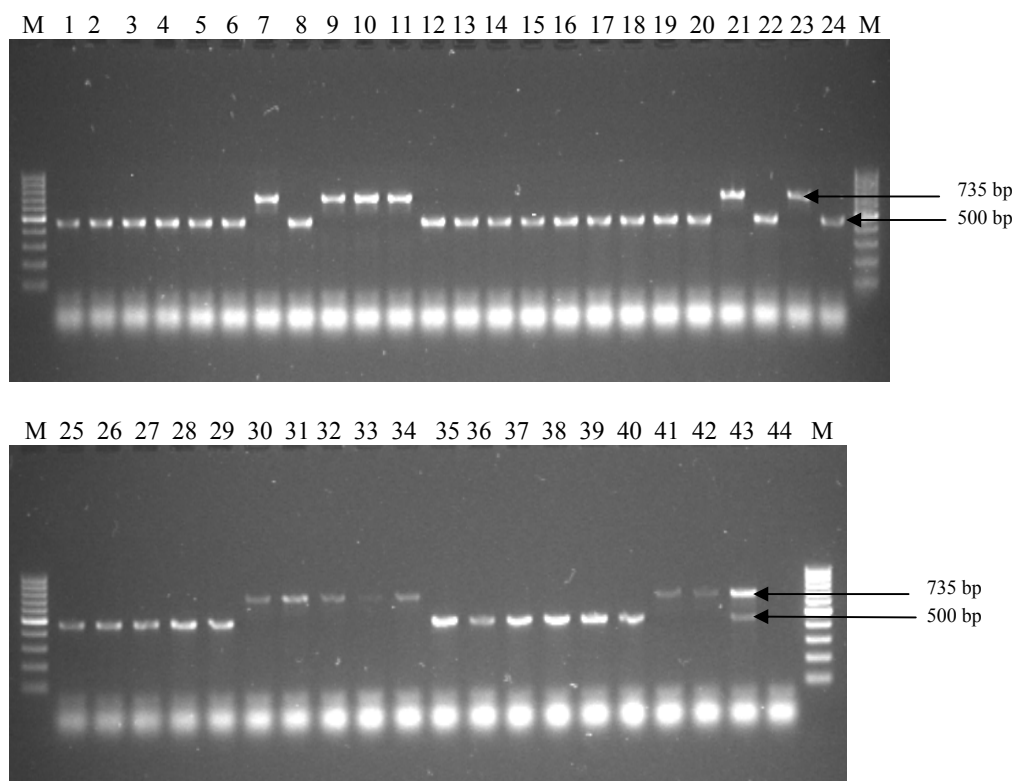
Restriksijske karte gena *cmeB* sevov *Campylobacter* z neznanimi zaporedji smo pripravili s primerjavo velikosti restriksijskih fragmentov na elektroforetski sliki po analizi PCR-RFLP in virtualnih elektroforetskih gelih sevov z znanim zaporedjem gena *cmeB* ter velikosti restriksijskih fragmentov na elektroforetskih slikah sevov z neznanimi zaporedji. Posamično progo na elektroforetski sliki smo primerjali s progo na virtualnem gelu sevov z znanim nukleotidnim zaporedjem. Ko se je nek restriksijski vzorec ujema, smo s pomočjo

pripadajoče restrikcijske karte sevov z znanim nukleotidnim zaporedjem določili restikcijsko mesto na genu *cmeB* seva z neznanim nukleotidnim zaporedjem. Karte smo izdelali s programom Microsoft Office Excel.

4 REZULTATI

4.1 IDENTIFIKACIJA SEVOV *Campylobacter* Z METODO MNOGOKRATNI PCR

Z uporabo dveh parov začetnih oligonukleotidov smo pomnoževali dve regiji DNK. Prisotnost pomnožkov velikosti 500 bp za *C. coli* in 735 bp za *C. jejuni* je pomenila pozitiven rezultat. Na sliki 11 in v preglednici 6 so vidni rezultati identifikacije z metodo mnogokratni PCR.



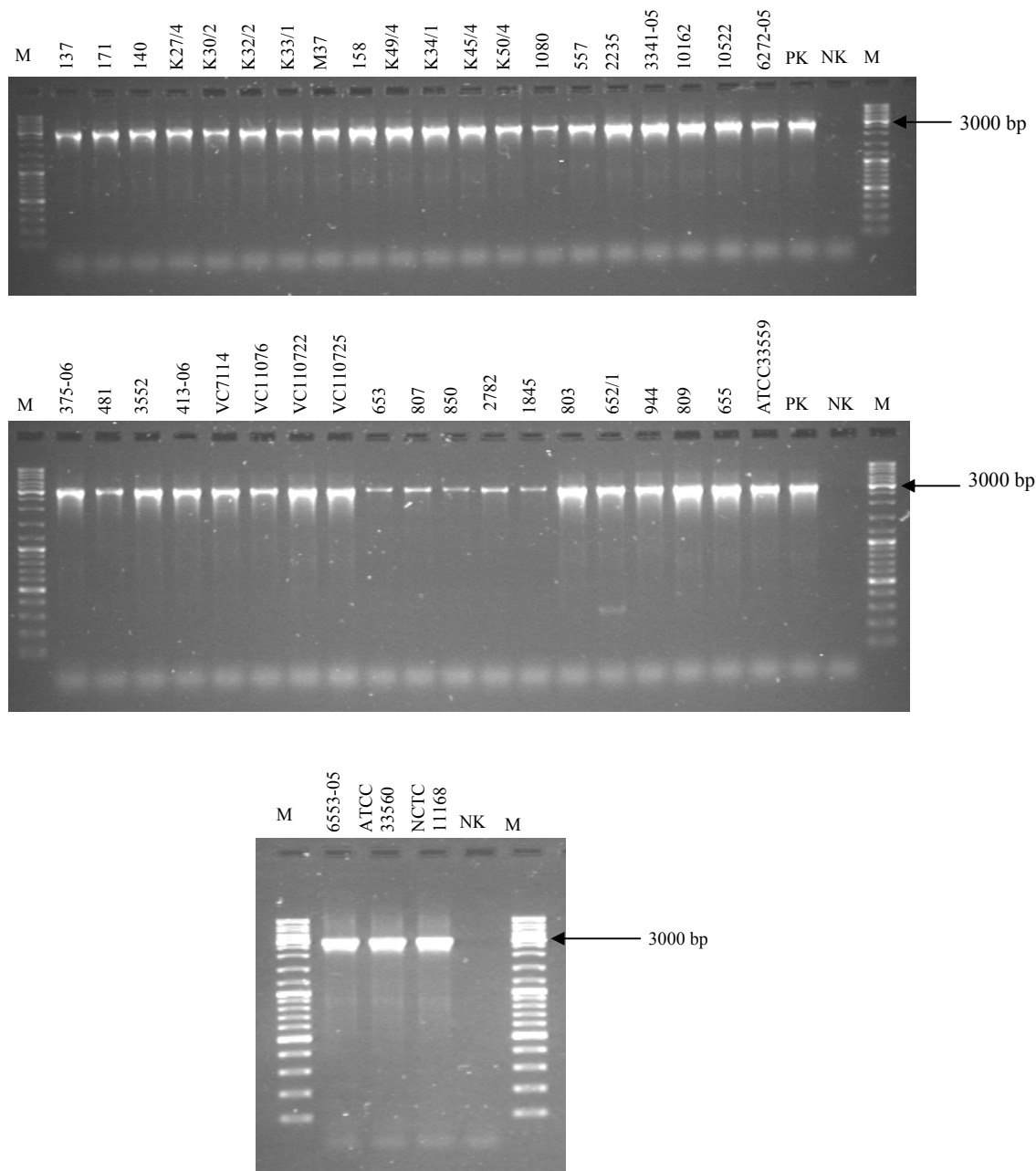
Slika 11: Pomnoževanje specifičnih DNK regij vrst *C. jejuni* in *C. coli* z metodo mnogokratne PCR. Proga 40: referenčni sev ATCC33559 vrste *C. coli*; proga 41: referenčni sev ATCC33560 vrste *C. jejuni*; proga 42: referenčni sev NCTC11168 vrste *C. jejuni*; proga 43: referenčna seva ATCC33559 (*C. coli*) in ATCC33560 (*C. jejuni*); proga 44: negativna kontrola. M: molekularni označevalec dolžin fragmentov DNK (GenRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas)

Preglednica 6: Identifikacija sevov *Campylobacter* z metodo mnogokratni PCR

Proga na elektroforetski sliki 11	Oznaka seva	Vrsta določena z mnogokratnim PCR	Izvor
1	137	<i>C. coli</i>	piščančji
2	171	<i>C. coli</i>	piščančji
3	140	<i>C. coli</i>	piščančji
4	K27/4	<i>C. coli</i>	piščančji
5	K30/2	<i>C. coli</i>	piščančji
6	K32/2	<i>C. coli</i>	piščančji
7	K33/1	<i>C. jejuni</i>	piščančji
8	M37	<i>C. coli</i>	piščančji
9	158	<i>C. jejuni</i>	piščančji
10	K49/4	<i>C. jejuni</i>	piščančji
11	K34/1	<i>C. jejuni</i>	piščančji
12	K45/4	<i>C. coli</i>	piščančji
13	K50/4	<i>C. coli</i>	piščančji
14	1080	<i>C. coli</i>	humani
15	557	<i>C. coli</i>	humani
16	6553-05	<i>C. coli</i>	humani
17	2235	<i>C. coli</i>	humani
18	3341-05	<i>C. coli</i>	humani
19	10162	<i>C. coli</i>	humani
20	10522	<i>C. coli</i>	humani
21	6272-05	<i>C. jejuni</i>	humani
22	375-06	<i>C. coli</i>	humani
23	481	<i>C. jejuni</i>	humani
24	3552	<i>C. coli</i>	humani
25	413-06	<i>C. coli</i>	humani
26	VC 7114	<i>C. coli</i>	prašičji
27	VC 11076	<i>C. coli</i>	prašičji
28	VC 110722	<i>C. coli</i>	prašičji
29	VC 110725	<i>C. coli</i>	prašičji
30	653	<i>C. jejuni</i>	vodni
31	807	<i>C. jejuni</i>	vodni
32	850	<i>C. jejuni</i>	vodni
33	2782	<i>C. jejuni</i>	vodni
34	1845	<i>C. jejuni</i>	vodni
35	803	<i>C. coli</i>	vodni
36	652/1	<i>C. coli</i>	vodni
37	944	<i>C. coli</i>	vodni
38	809	<i>C. coli</i>	vodni
39	655	<i>C. coli</i>	vodni
40	ATCC 33559	<i>C. coli</i>	prašičji feces
41	ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	goveji
42	NCTC 11168	<i>C. jejuni</i>	humani

4.2 POMNOŽEVANJE GENA *cmeB*

Z metodo PCR, opisano pod točko 3.3.7., smo pomnožili gen *cmeB*. Prisotnost pomnožkov PCR smo dokazali z gelsko elektroforezo. Prisotnost pomnožkov velikosti 3213 bp je pomenila pozitiven rezultat. Na sliki 12 so vidni pomnožki.



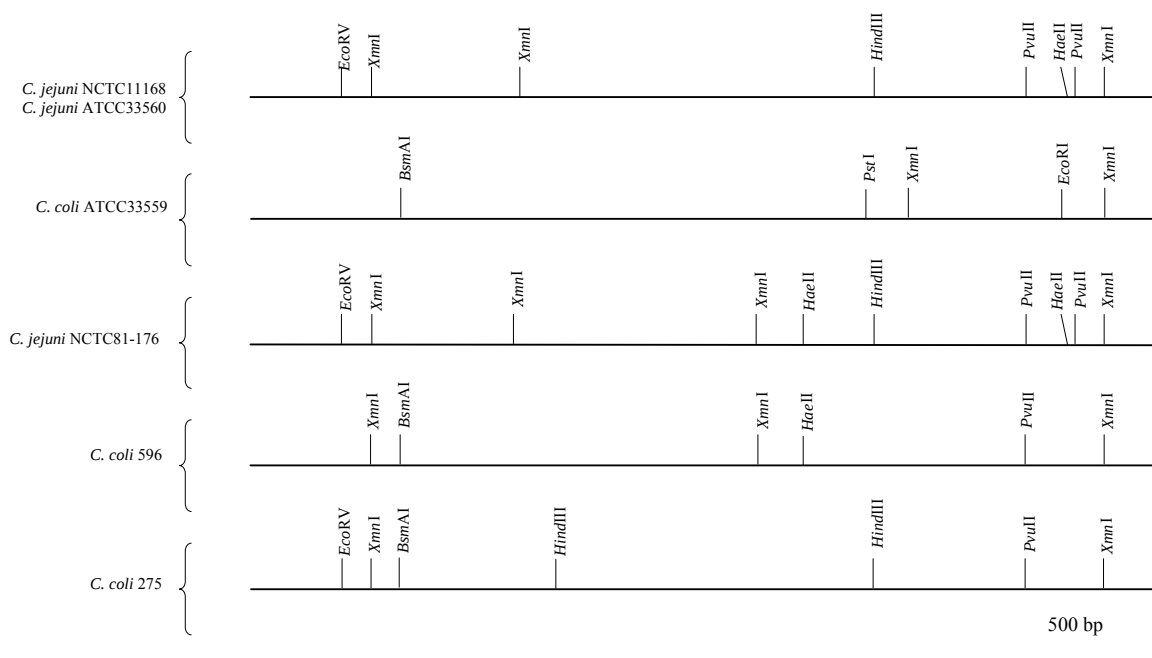
Slika 12: Elektroforetske slike PCR pomnožkov gena *cmeB* velikosti 3213 bp. PK: pozitivna kontrola NCTC 11168; NK: negativna kontrola; M: molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)

4.3 RESTRIKCIJSKE KARTE GENA *cmeB*

Restriksijske karte gena *cmeB* sevov z znanim nukleotidnim zaporedjem smo pripravili s programom pDRAW32 in Microsoft Office Excel. Prikazane so na slikah 13 in 14.



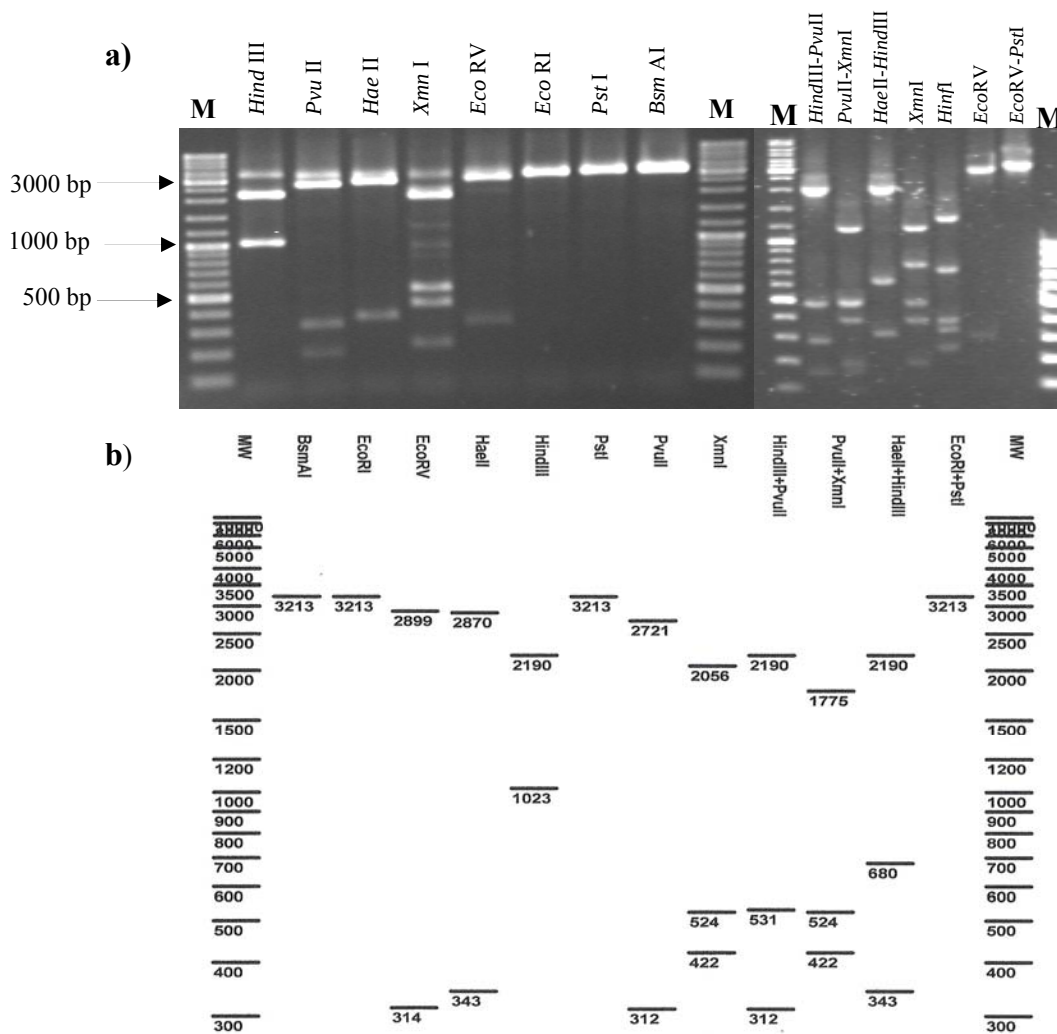
Slika 13: Restriksijska karta gena *cmeB* seva *C. jejuni* NCTC 11168, izdelana s programom pDRAW32



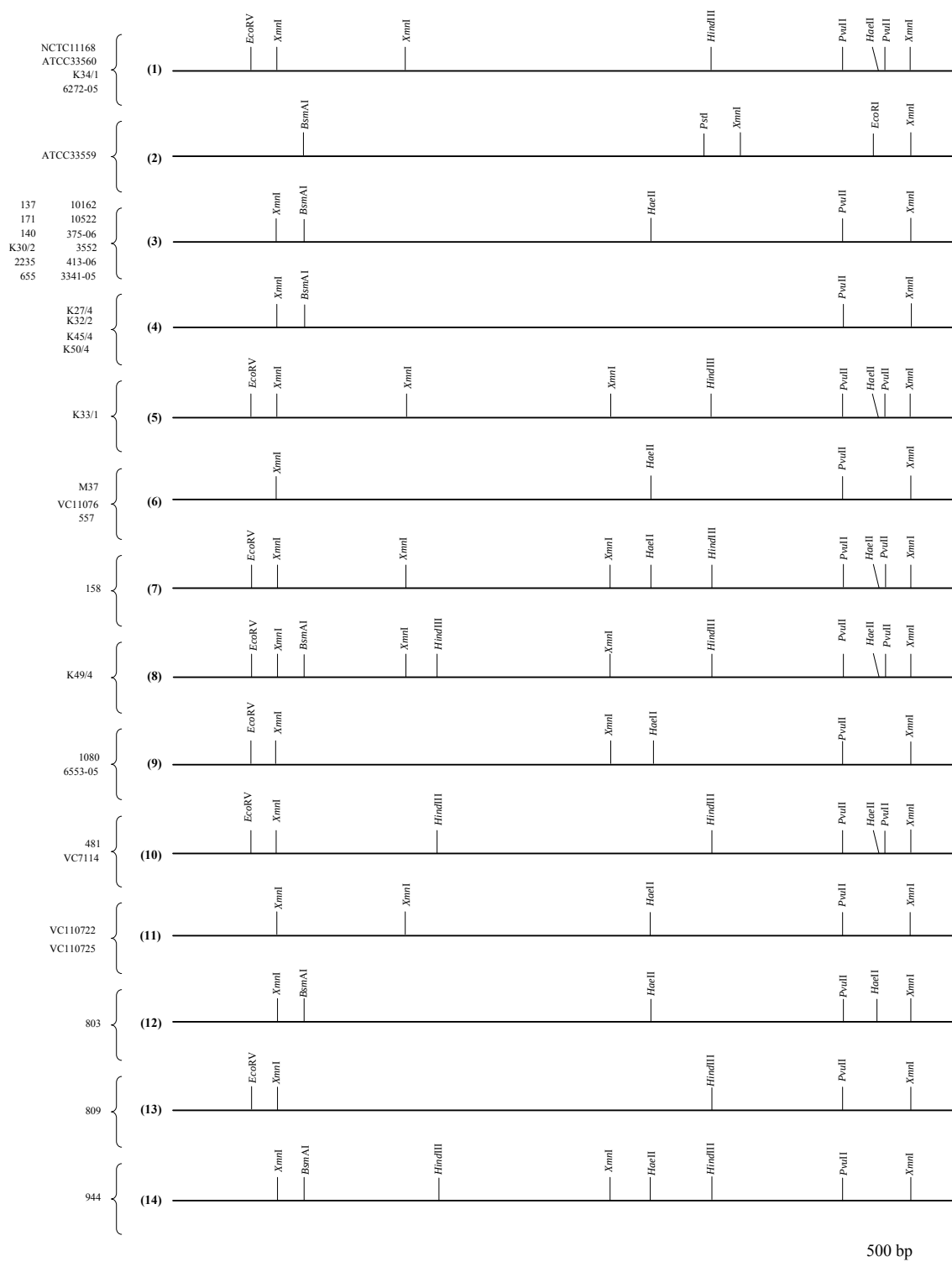
Slika 14: Restriksijske karte gena *cmeB* sevov *Campylobacter* z znanim nukleotidnim zaporedjem

4.3.1 Restriksijske karte gena *cmeB* sevov *Campylobacter* iz baze podatkov in z neznanim nukleotidnim zaporedjem

S primerjavo elektroforetskih slik gena *cmeB* po analizi s PCR-RFLP in virtualnih elektroforetskih gelov sevov z znanim zaporedjem gena *cmeB* (slika 15) ter elektroforetskih slik gena *cmeB* sevov z neznanim zaporedjem smo pripravili restriksijske karte. Restriksijske karte gena *cmeB*, sevov *Campylobacter* z znanim nukleotidnim zaporedjem, ki smo jih dobili iz podatkovne baze GenBank, so prikazane na sliki 14. Določili smo 14 različnih restriksijskih vzorcev med 42 sevi *Campylobacter*. Prikazani so na sliki 16.

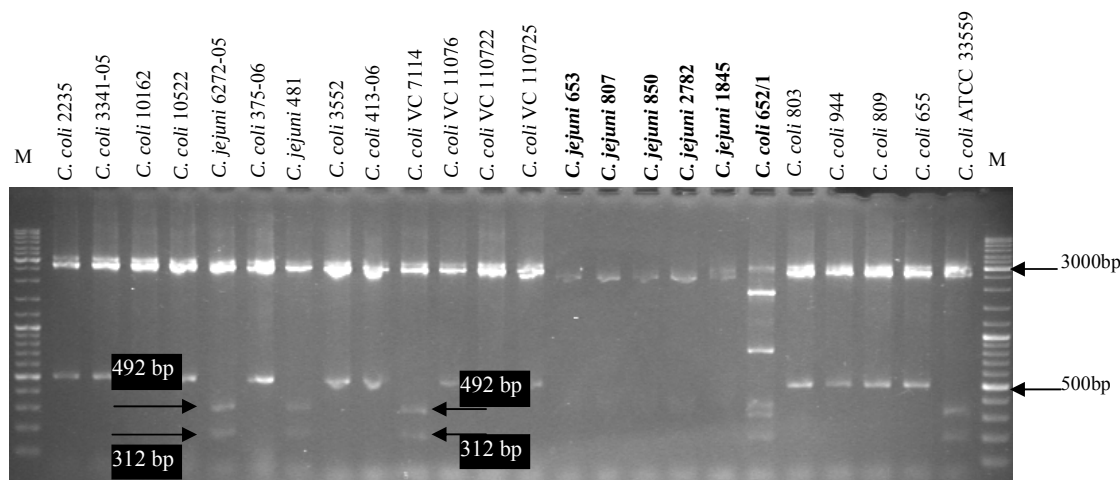


Slika 15: Elektroforetska slika restriksijske analize gena *cmeB* seva *C. jejuni* NCTC 11168 (a); virtualni elektroforetski gel za sev *C. jejuni* NCTC 11168 izdelan s programom pDRAW32 (b)



Slika 16: Restriksijske karte gena *cmeB*, velikosti 3213 bp, sevov *Campylobacter*, ki smo jih razdelili v 14 restriksijskih vzorcev, z neznanim nukleotidnim zaporedjem

Za 5 vodnih sevov (653, 807, 850, 2782, 1845) vrste *C. jejuni* in en sev (652/1) vrste *C. coli* restrikcijske karte gena *cmeB* ni bilo mogoče izdelati. Na slika 17 je prikazan elektroforetski gel po restrikciji gena *cmeB* teh sevov z encimom *PvuII*.



Slika 17: Elektroforetska slika restrikcije gena *cmeB* sevov *C. jejuni* in *C. coli* z encimom *PvuII*. M: molekularni označevalci dolžin pomnožkov DNK (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)

4.4 ANALIZA RESTRIKCIJSKIH VZORCEV

Restrikcijske vzorce smo analizirali glede na vrsto, izvor in odpornost na protimikrobne snovi.

4.4.1 Analiza restrikcijskih vzorcev glede na vrsto sevov *Campylobacter*

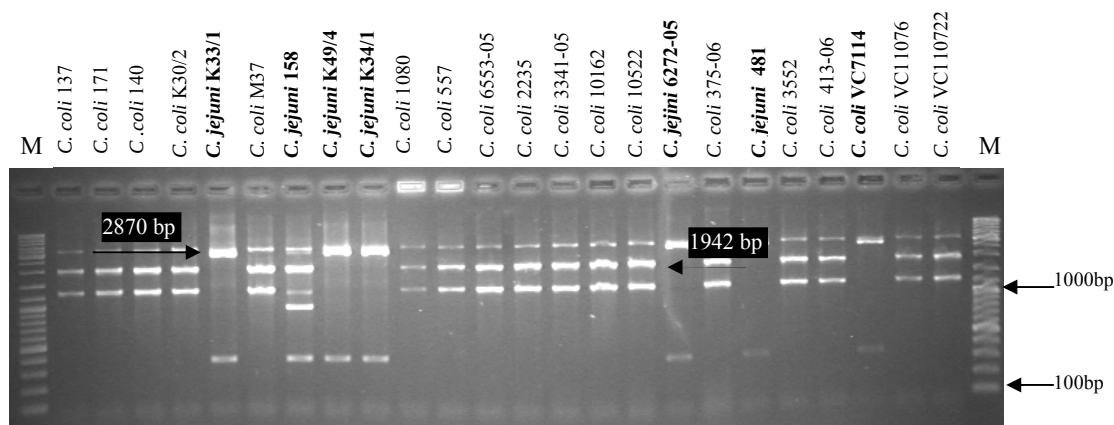
V trinajstih od štirinajstih restrikcijskih vzorcev je restrikcijski vzorec značilen le za vrsto *C. coli* ali le za vrsto *C. jejuni*. Restrikcijski vzorec 10 pa je značilen za sev *C. jejuni* 481 in *C. coli* VC7114, kar pomeni, da ni vrstno značilen. Obstaja pa tudi možnost kontaminacije seva *C. coli* VC7114.

V restrikcijskih vzorcih v katere spadajo le sevi vrste *C. jejuni* in za restrikcijski vzorec 10 je opaziti značilno skupino na koncu karte. 4 restrikcijska mesta, za encime *PvuII* (2721 in 2901 pb), *HaeII* (2870 bp) in *XmnI* (3002 bp) se nahajajo zelo blizu skupaj (slika 18).



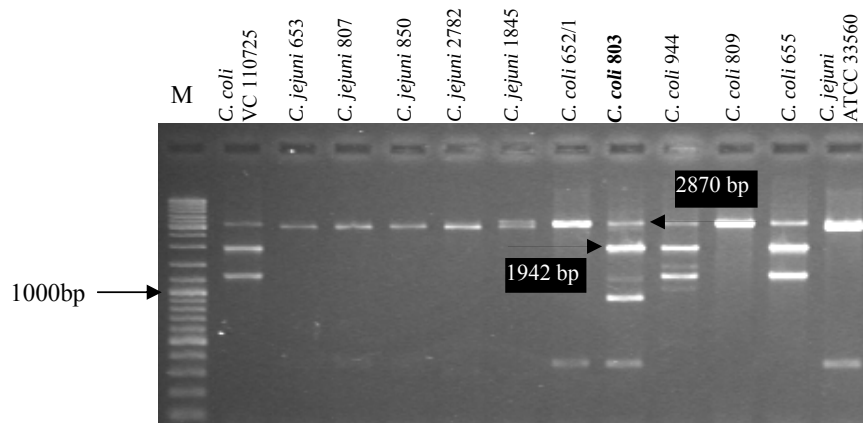
Slika 18: Restriksijska karta restriksijskega vzorca 1, ki je značilen za vrsto *C. jejuni*. V kvadratu je razvidna značilna skupina na koncu karte.

Na sliki 19 je s puščico označen fragment velikosti 2870 bp, rezultat razreza z encimom *HaeII*, značilen za vrsto *C. jejuni*, prisoten pa je tudi pri sevu VC 7114, ki spada v vrsto *C. coli*.



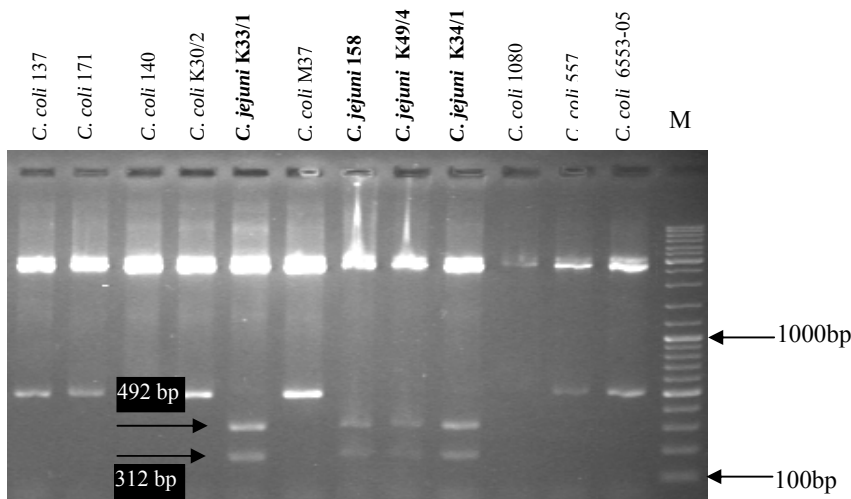
Slika 19: Elektroforetska slika restriksijske analize sevov *C. jejuni* in *C. coli* z encimom *HaeII*. M: molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)

Trije restriksijski vzorci, ki so značilni za vrsto *C. coli* (2., 4. in 13.), nimajo nobenega restriksijskega mesta za encim *HaeII*. Ostali restriksijski profili, ki so značilni za vrsto *C. coli* pa imajo restriksijsko mesto za ta encim na drugem mestu (fragment velikosti 1942 bp) (slika 19). Restriksijski vzorec 7, ki je značilen za sev 158 ter restriksijski vzorec 12, ki je značilen za sev 803, imata oba restriksijska mesta za encim *HaeII* (sliki 19 in 20).



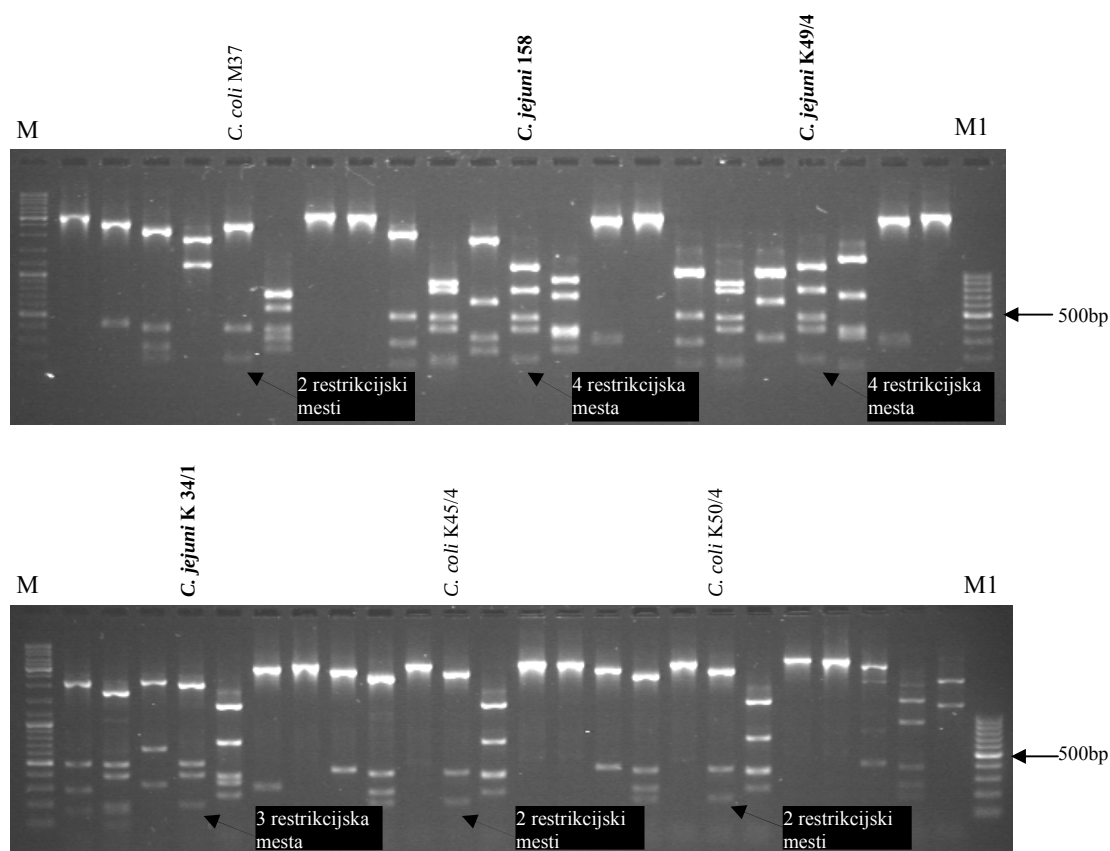
Slika 20: Elektroforetska slika restrikcijske analize sevov *C. jejuni* in *C. coli* z encimom *HaeII*. M: molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)

Ker sta fragmenta, ki sta produkt razreza encima *PvuII*, velikosti 2721 in 2901 bp, tako blizu skupaj, jih na elektroforetski sliki ne moremo ločiti. Sta pa dobro vidna fragmenta, velikosti 312 in 492 bp, ki sta bila odrezana na teh dveh mestih (slika 21). Takšen restrikcijski vzorec je prisoten tudi pri sevu VC 7114 vrste *C. coli* (slika 17).

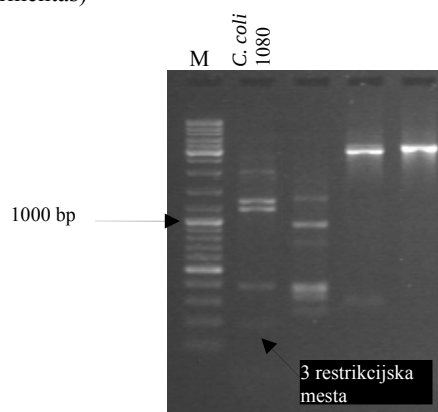


Slika 21: Elektroforetska slika restrikcijske analize sevov *C. jejuni* in *C. coli* z encimom *PvuII*. M: molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)

Vsak restrikcijski vzorec ima vsaj dve restrikcijski mesti za encim *XmnI*. Vsi vzorci imajo eno skupno restrikcijsko mesto za encim *XmnI*. Produkt razreza na tem mestu je fragment velikost 3002 bp. Sedem restrikcijskih vzorcev ima 2 restrikcijski mesti, trije restrikcijski vzorci imajo 3 restrikcijska mesta in štirje restrikcijski vzorci imajo 4 restrikcijska mesta za encim *XmnI* (slika 22). Restrikcijski vzorci z dvema in štirimi restrikcijskimi mesti za te encim imajo le-te na istih mestih. Restrikcijski vzorec 9 (sev 1080 in 6553-05) pa ima eno restrikcijsko mesto na drugem mestu, kot druga dva vzorca s tremi restrikcijskimi mesti za encim *XmnI* (slika 23).

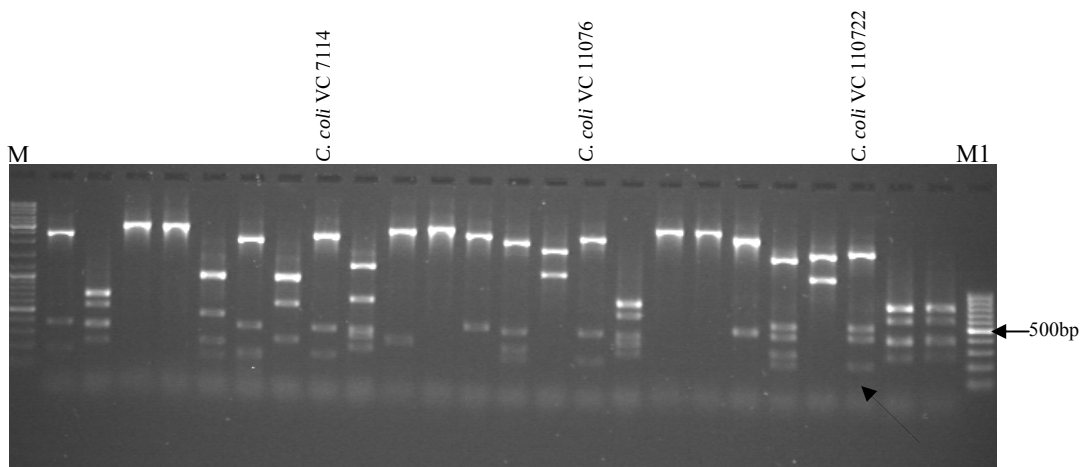


Slika 22: Elektroforetski sliki restrikcijske analize sevov *C. jejuni* in *C. coli* z različnimi encimi. Gen *cmeB*, označenih sevov, je bil razrezan z encimom *Xmn* I. M: molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas); M1: molekularni označevalec dolžin pomnožkov (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas)

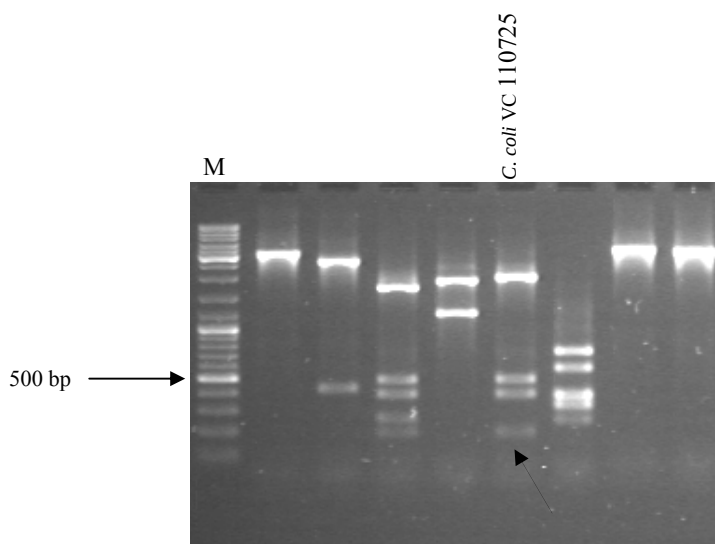


Slika 23: Elektroforetska slika restrikcijske analize seva 1080 vrste *C. coli*, z različnimi encimi. Na označenem mestu je bil gen *cmeB* razrezan z encimom *Xmn*I. M: molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)

Fragmenti, značilni za vrsto *C. jejuni*, ki so produkt razreza z *Xmn*I, so prisotni tudi pri dveh sevih vrste *C. coli*, VC 110722 in VC 110725. Na slikah 24 in 25 so označeni s puščicama.

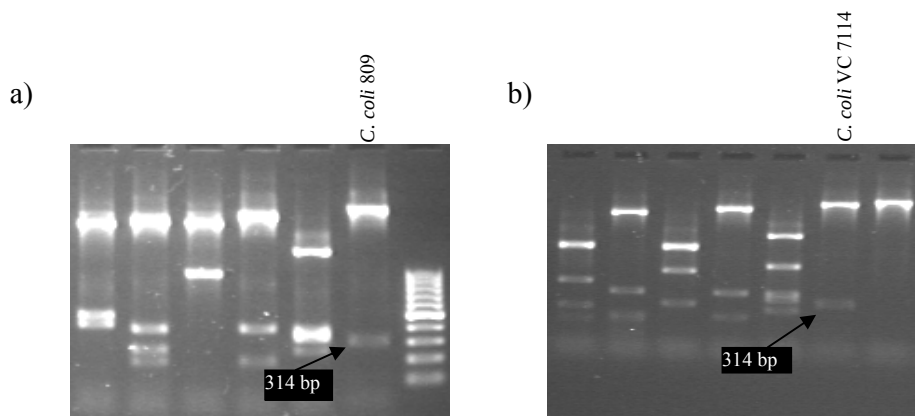


Slika 24: Elektroforetska slika restrikcijske analize sevov *C. jejuni* in *C. coli* z različnimi encimi. Gen *cmeB*, označenih sevov, je bil razrezan z encimom *Xmn*I. M: molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas); M1: molekularni označevalec dolžin pomnožkov (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas)



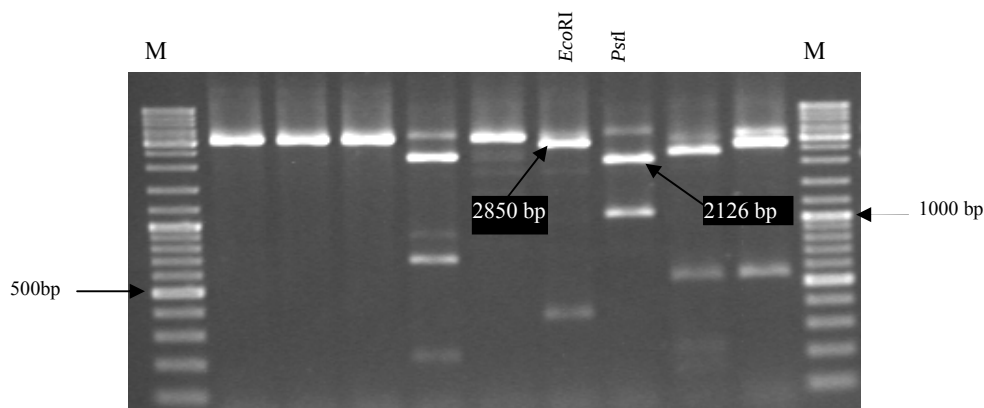
Slika 25: Elektroforetska slika restrikcijske analize seva VC 110725 vrste *C. coli* z različnimi encimi. Na označenem mestu je bila analiza narejena z encimom *Xmn*I. M: molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)

Vsi sevi vrste *C. jejuni* imajo restrikcijsko mesto za encim *Eco*RV, katerega produkt razreza je fragment velikosti 314 bp. Pri sevih *C. coli* se restrikcijsko mesto za encim *Eco*RV nahaja pri štirih analiziranih sevih, to so 1080, 6553-05, VC 7114 in 809. Na sliki 26 je s puščico prikazan fragment, ki je produkt razreza z encimom *Eco*RV pri sevih *C. coli* 809 in VC 7114.



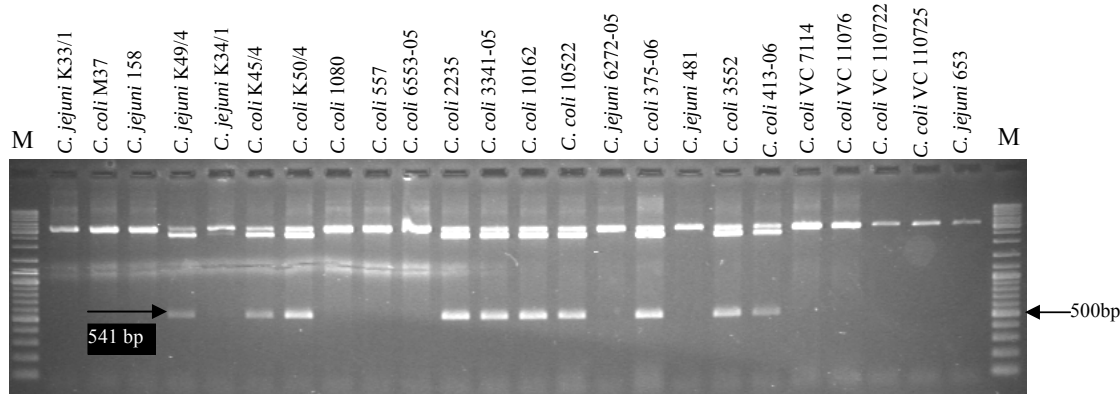
Slika 26: Elektroforetski sliki restrikcijske analize sevov *C. coli* 809 in VC 7114 z različnimi encimi. Na označenem mestu je bila analiza narejena z encimom *EcoRV*. a) Restrikcijska analiza seva 809. b) Restrikcijska analiza seva VC 7114

Restrikcijsko mesto za encim *EcoRI* ima samo en sev izmed analiziranih, to je *C. coli* ATCC 33559. Na sliki 27 je s puščico označen fragment, velikosti 2850 bp, ki dokazuje restrikcijsko mesto.



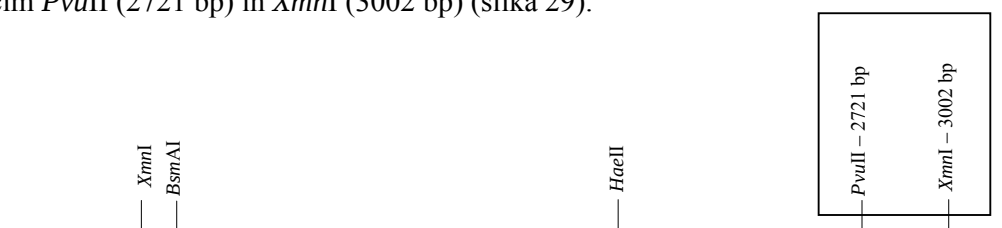
Slika 27: Elektroforetska slika restrikcijske analize seva *C. coli* ATCC 33559 z različnimi encimi. Na označenih mestih je bila analiza narejena z encimoma *EcoRI* in *PstI*. M: molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)

Restrikcijsko mesto za encim *BsmAI* je prisotno pri šestih različnih restrikcijskih vzorcih. Pet od teh je značilnih za vrsto *C. coli*, 12. restrikcijski profil pa je značilen za vrsto *C. jejuni*. Slednjemu pripada samo sev K49/4. Rezultat razreza encima *BsmAI* je fragment velikosti 541 bp (slika 28).



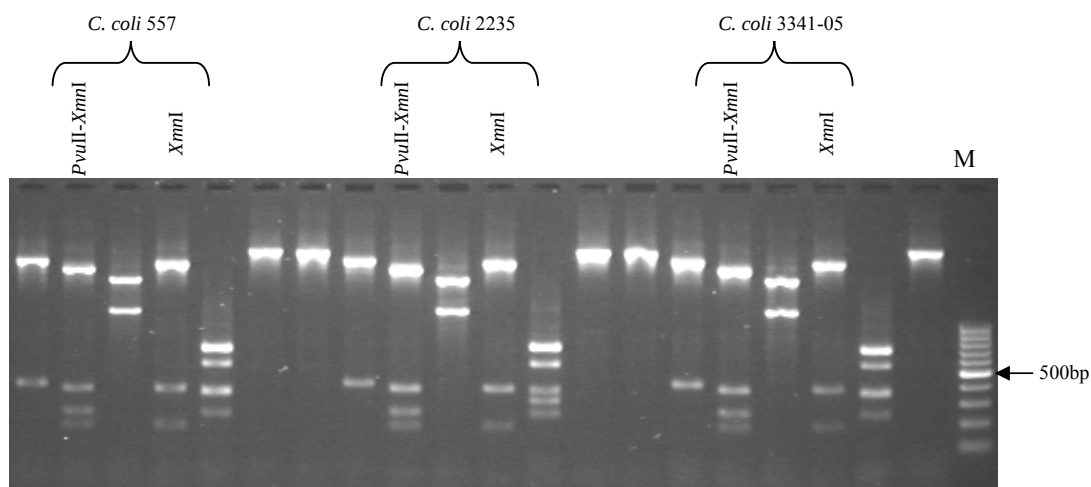
Slika 28: Elektroforetska slika restrikcijske analize sevov *C. jejuni* in *C. coli* z encimom *BsmAI*. M: molekularni označevalci dolžin pomnožkov DNK (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)

Tudi restrikcijski vzorci, ki so značilni za vrsto *C. coli*, razen restrikcijskega vzorca 2 in 12, imajo značilno skupino na koncu karte. Zanje sta značilni dve restrikcijski mesti, za encim *PvuII* (2721 bp) in *XmnI* (3002 bp) (slika 29).



Slika 29: Restrikcijska karta restrikcijskega vzorca 3, ki je značilen za vrsto *C. coli*. V kvadratu je razvidna značilna skupina na koncu karte.

Z analizo z encimsko mešanico *PvuII-XmnI* smo lahko ugotovili, s katere strani encima režeta gen *cmeB* (slika 30).



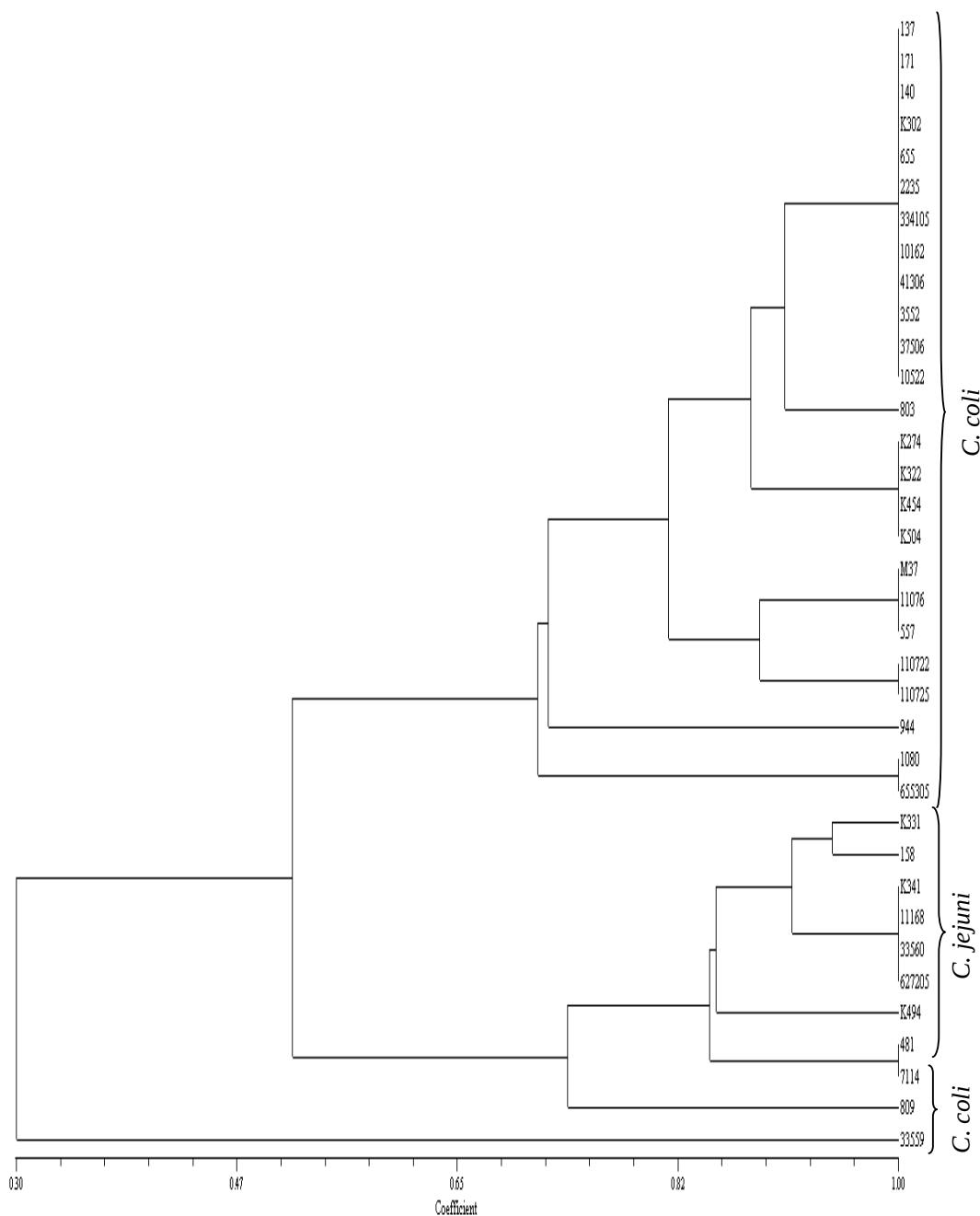
Slika 30: Elektroforetska slika restrikcijske analize sevov *C. jejuni* in *C. coli* z encimom *XmnI* in encimsko mešanico *PvuII-XmnI*. M: molekularni označevalci dolžin pomnožkov (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas)

Kot že omenjeno, restrikcijski vzorec 2 nima restrikcijskih mest na koncu karte (slika 29) saj nima restrikcijskega mesta za *HaeII* in *PvuII*. Ima pa edini izmed vseh restrikcijsko mesto za encim *PstI*, fragment velikosti 2126 bp (slika 27).

Encim *HindIII* oblikuje 7 restrikcijskih vzorcev. Trije izmed teh, 8., 10. in 14. restrikcijski vzorec, imajo dve restrikcijski mesti za ta encim. Imajo ga vsi vzorci, značilni za vrsto *C. jejuni*, vključno z vzorcem 10, ki je netipičen.

Restrikcijski vzorci, ki so značilni za vrsto *C. jejuni*, imajo v povprečju več restrikcijskih mest kot restrikcijski vzorci, ki so značilni za vrsto *C. coli*. Največ restrikcijskih mest, 11, ima restrikcijski vzorec 8, ki je značilen za sev K49/4 vrste *C. jejuni*. Najmanj restrikcijskih mest, to je 4, imata vzorca 4 in 6 in sta značilna le za seve vrste *C. coli*.

Z numerično analizo restrikcijskih vzorcev sevov, katerim smo lahko izdelali restrikcijske karte, smo s programom Bionumeric izdelali dendrogram, ki je prikazan na sliki 31. Iz dendrograma se lahko ločita dve skupini sevov, katerih restrikcijski vzorci so se bistveno razlikovali. Eno skupino sevov sestavljajo sevi vrste *C. coli* in drugo sevi vrste *C. jejuni*.



Slika 31: Dendrogram 36 sevov *C. jejuni* in *C. coli*, izdelan na osnovi PCR-RFLP restrikcijskih vzorcev

V drugo skupino, vrste *C. jejuni*, so se razvrstili tudi sevi VC 7114, 809 in ATCC 33559, katerim smo z metodo mnogokratni PCR določili vrsto *C. coli*. Pri sevu VC 7114 gre najverjetneje za kontaminacijo s sevom vrste *C. jejuni*. Referenčni sev ATCC 33559 se močno razlikuje od ostalih sevov vrste *C. coli*, ravno tako so razlike tudi pri sevu 809. To je najverjetneje vzrok, da so se ti trije sevi razvrstili skupaj z sevi *C. jejuni*.

4.4.2 Analiza restrikcijskih vzorcev glede na izvor sevov

V preglednici 7 so navedeni vsi sevi, uporabljeni v raziskavi in njihov izvor. Razporejeni so glede na restrikcijski vzorec, kateremu pripadajo.

Preglednica 7: Izvor sevov *C. jejuni* in *C. coli*

Sev	Vrsta	Izvor		Restrikcijski vzorec
K34/1	<i>C. jejuni</i>	Slovenija, vzorčenje, 2001	piščančji	1
6272-05	<i>C. jejuni</i>	Medicinska fakulteta	humani	1
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	Tipski sev	goveji	1
NCTC 11168	<i>C. jejuni</i>	Tipski sev	humani	1
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	Belgija, 2006	prašičji feces	2
137	<i>C. coli</i>	Slovenija, piščanci, 2001	piščančji	3
171	<i>C. coli</i>	Slovenija, piščanci, 2001	piščančji	3
140	<i>C. coli</i>	Slovenija, piščanci, 2001	piščančji	3
K30/2	<i>C. coli</i>	Slovenija, vzorčenje, 2001	piščančji	3
3341-05	<i>C. coli</i>	Medicinska fakulteta	humani	3
375-06	<i>C. coli</i>	Medicinska fakulteta	humani	3
413-06	<i>C. coli</i>	Medicinska fakulteta	humani	3
10162	<i>C. coli</i>	Bosna, klinika	humani	3
10522	<i>C. coli</i>	Bosna, klinika	humani	3
2235	<i>C. coli</i>	Medicinska fakulteta 2006	humani	3
3552	<i>C. coli</i>	Medicinska fakulteta, 2006	humani	3
655	<i>C. coli</i>	Bosna, 2004-2006	vodni	3
K27/4	<i>C. coli</i>	Slovenija, vzorčenje, 2001	piščančji	4
K32/2	<i>C. coli</i>	Slovenija, vzorčenje, 2001	piščančji	4
K45/4	<i>C. coli</i>	Slovenija, vzorčenje, 2001	piščančji	4
K50/4	<i>C. coli</i>	Slovenija, vzorčenje, 2001	piščančji	4
K33/1	<i>C. jejuni</i>	Slovenija, vzorčenje, 2001	piščančji	5
M37	<i>C. coli</i>	Avstrija, piščanci, 2006	piščančji	6
557	<i>C. coli</i>	Gorica, klinika, 2002	humani	6
VC 11076	<i>C. coli</i>	Belgija, 2006	piščančji	6
158	<i>C. jejuni</i>	Slovenija, piščanci, 2001	piščančji	7
K49/4	<i>C. jejuni</i>	Slovenija, vzorčenje, 2001	piščančji	8
1080	<i>C. coli</i>	Gorica, klinika, 2001	humani	9
6553-05	<i>C. coli</i>	Gorica, klinika, 2002	humani	9
481	<i>C. jejuni</i>	Gorica, klinika, 2002	humani	10

... se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 7: Izvor sevov *C. jejuni* in *C. coli*

Sev	Vrsta	Izvor		Restriksijski vzorec
VC 7114	<i>C. coli</i>	Belgija, 2006	piščančji	10
VC 110722	<i>C. coli</i>	Belgija, 2006	piščančji	11
VC 110725	<i>C. coli</i>	Belgija, 2006	piščančji	11
803	<i>C. coli</i>	Bosna, 2004-2006	vodni	12
809	<i>C. coli</i>	Bosna, 2004-2006	vodni	13
944	<i>C. coli</i>	Bosna, 2004-2006	vodni	14
807	<i>C. jejuni</i>	Bosna, 2004-2006	vodni	
850	<i>C. jejuni</i>	Bosna, 2004-2006	vodni	
652/1	<i>C. coli</i>		vodni	
653	<i>C. jejuni</i>		vodni	
2782	<i>C. jejuni</i>		vodni	
1845	<i>C. jejuni</i>		vodni	

Večina restriksijskih vzorcev, kateri ustrezajo večjemu številu sevov, so značilni za po izvoru različne seve. Le trije vzorci so značilni za po izvoru istim sevom. Četrty restriksijski vzorec je značilen le za piščančje seve, ki so bili izolirani v Sloveniji leta 2001. Enajsti restriksijski vzorec vključuje dva piščančja seva, izolirana leta 2006 v Belgiji in deveti restriksijski profil, ki vključuje humana seva, izolirana v Gorici, vendar ne v istem letu.

Tretji restriksijski vzorec je značilen za največ sevov. Od tega so štirje piščančjega izvora, izolirani leta 2001 v Sloveniji, 5 humanih kliničnih izolatov, izoliranih leta 2006 v Sloveniji, 2 humana klinična izolata, izolirana v Bosni in Hercegovini in en vodni izolat ravno tako izoliran v Bosni in Hercegovini. Ti rezultati nakazujejo, da restriksijski vzorci analiziranega gena nimajo nobene povezave z izvorom seva.

Prvi restriksijski vzorec je značilen za 4 seve od tega sta dva referenčna *C. jejuni*, ostala dva pa sta živilski in humani izolat.

Šesti restriksijski vzorec je izvorno zelo raznolik saj vključuje dva piščančja seva, od katerih je bil eden izoliran v Avstriji leta 2006, drugi pa v Belgiji istega leta in humani sev, izoliran leta 2002 v Gorici. Glede morebitne zveze med strukturo analiziranega gena in izvorom sevov so rezultati podobni, kot smo že zapisali pri tretjem restriksijskem vzorcu.

Podobno velja za enajsti restriksijski vzorec, saj ravno tako vključuje piščančji sev, izoliran v Belgiji leta 2006, in humani sev, izoliran v Gorici leta 2002.

Dvanajsti, trinajsti in štirinajsti restriksijski vzorec pa vsak vključuje po en vodni sev, ki pa imajo vsi isti izvor. Izolirani so bili v Bosni in Hercegovini iz vzorcev vode, kar spet potrjuje, da isti izvor lahko daje zelo raznolike seve glede na njihovo strukturo gena *cmeB*.

4.4.3 Analiza restrikcijskih vzorcev glede na odpornost na protimikrobna sredstva

Restrikcijske vzorce testiranih sevov *Campylobacter* smo primerjali med sabo glede na stopnjo odpornosti (preglednica 8) na različna protimikrobna sredstva (preglednica 9). Stopnja odpornosti je bila določena z mikrodilucijsko metodo v bujonu.

Preglednica 8: Definicija stopnje odpornosti na protimikrobne snovi pri bakterijah vrste *C. jejuni* in *C. coli* (Mavri in sod., 2011)

Protimikrobna snov	MIC ^a	Nivo odpornosti
Eritromicin	≤2 µl/ml	S ^e
	4–8 µl/ml	LLR ^d
	≥512 µl/ml	HLR ^b
Triklosan	≤8 µl/ml	LLR
	16–32 µl/ml	MLR ^c
	>32 µl/ml	HLR
BC	≤2 µl/ml	S
	>2 µl/ml	R ^f
CPC	≤2 µl/ml	S
	>2 µl/ml	R
TSP	≤4 mg/ml	LLR
	8 mg/ml	MLR
	≥16 mg/ml	HLR
SDS	128–256 µg/ml	LLR
	≥512 µg/ml	HLR

^aMIC – Minimalna inhibitorna koncentracija

^bHLR – visoka stopnja odpornosti

^cMLR – srednja stopnja odpornosti

^dLLR – nizka stopnja odpornosti

^fR – odporen

^eS – občutljiv

Preglednica 9: Nivoji odpornosti na protimikrobne snovi in restrikcijski vzorci testiranih sevov *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* (Mavri in sod., 2011)

Število	Vrsta	Izvor	Eritromicin	Triklosan	BC ^a	CPC ^b	TSP ^c	SDS ^d	Rest. vzorec ^e
K34/1	<i>C. jejuni</i>	piščančji	S	MLR	S	S	HLR	MLR	1
6272-05	<i>C. jejuni</i>	humani	S	MLR	S	S	S	HLR	1
ATCC 33560	<i>C. jejuni</i>	goveji	S	MLR	S	S	MLR	MLR	1
NCTC 11168	<i>C. jejuni</i>	humani	S	HLR	S	S	MLR	HLR	1
ATCC 33559	<i>C. coli</i>	prašičji feces	S	MLR	S	S	HLR	MLR	2

... se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 9: Nivoji odpornosti na protimikrobne snovi in restrikcijski vzorci testiranih sevov *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* (Mavri in sod., 2011)

Število	Vrsta	Izvor	Eritromicin	Triklosan	BC ^a	CPC ^b	TSP ^c	SDS ^d	Rest. vzorec ^e
137	<i>C. coli</i>	piščančji	HLR	MLR	S	S	HLR	MLR	3
171	<i>C. coli</i>	piščančji	HLR	MLR	S	S	HLR	MLR	3
140	<i>C. coli</i>	piščančji	HLR	HLR	S	S	MLR	MLR	3
137	<i>C. coli</i>	piščančji	HLR	MLR	S	S	HLR	MLR	3
2235	<i>C. coli</i>	humani	HLR	MLR	S	S	MLR	MLR	3
3341-05	<i>C. coli</i>	humani	S	MLR	S	S	MLR	HLR	3
10162	<i>C. coli</i>	humani	S	HLR	S	S	HLR	MLR	3
10522	<i>C. coli</i>	humani	S	HLR	S	S	HLR	HLR	3
375-06	<i>C. jejuni</i>	humani	S	S	R	S	MLR	MLR	3
3552	<i>C. jejuni</i>	humani	S	MLR	S	S	HLR	MLR	3
413-06	<i>C. jejuni</i>	humani	S	MLR	S	S	HLR	HLR	3
655	<i>C. coli</i>	vodni	S	HLR	S	S	MLR	MLR	3
K27/4	<i>C. coli</i>	piščančji	S	HLR	S	S	HLR	MLR	4
K32/2	<i>C. coli</i>	piščančji	S	MLR	S	S	MLR	MLR	4
K45/4	<i>C. jejuni</i>	piščančji	S	MLR	S	R	HLR	HLR	4
K50/4	<i>C. jejuni</i>	piščančji	S	MLR	S	S	MLR	HLR	4
K33/1	<i>C. coli</i>	piščančji	S	MLR	S	S	S	HLR	5
M37	<i>C. coli</i>	piščančji	HLR	HLR	S	S	S	HLR	6
557	<i>C. coli</i>	humani	S	MLR	S	S	MLR	MLR	6
VC 11076	<i>C. coli</i>	prašičji	HLR	MLR	S	S	MLR	MLR	6
158	<i>C. jejuni</i>	piščančji	S	MLR	S	S	MLR	HLR	7
K49/4	<i>C. jejuni</i>	piščančji	S	MLR	S	S	MLR	HLR	8
1080	<i>C. coli</i>	humani	S	MLR	S	S	MLR	MLR	9
6553-05	<i>C. coli</i>	humani	HLR	MLR	S	S	MLR	MLR	9
481	<i>C. jejuni</i>	humani	S	MLR	S	S	HLR	MLR	10
VC 7114	<i>C. coli</i>	prašičji	S	MLR	S	S	MLR	HLR	10
VC 110722	<i>C. coli</i>	prašičji	LLR	MLR	S	S	MLR	MLR	11
VC 110725	<i>C. coli</i>	prašičji	S	MLR	S	S	MLR	HLR	11
803	<i>C. coli</i>	vodni	S	HLR	S	S	HLR	HLR	12
809	<i>C. coli</i>	vodni	HLR	MLR	S	S	MLR	HLR	13

... se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 9: Nivoji odpornosti na protimikrobne snovi in restrikcijski vzorci testiranih sevov *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* (Mavri in sod., 2011)

Število	Vrsta	Izvor	Eritromicin	Triklosan	BC ^a	CPC ^b	TSP ^c	SDS ^d	Rest. vzorec ^e
944	<i>C. coli</i>	vodni	S	MLR	S	S	MLR	MLR	14
653	<i>C. jejuni</i>	vodni	S	MLR	S	S	S	HLR	/
807	<i>C. jejuni</i>	vodni	S	MLR	S	S	S	HLR	/
850	<i>C. jejuni</i>	vodni	S	S	S	S	MLR	HLR	/
2782	<i>C. jejuni</i>	vodni	S	MLR	S	S	MLR	MLR	/
1845	<i>C. jejuni</i>	vodni	S	MLR	S	S	MLR	MLR	/
652/1	<i>C. coli</i>	vodni	S	MLR	S	S	HLR	HLR	/

^a BC – benzalkonijev klorid

^b CPC – cetilpiridinijev klorid

^c TSP – trinatrijev fosfat

^d SDS – natrijev dodecil sulfat

^e Rest. vzorec – restrikcijski vzorec

Iz podatkov v preglednici 9 ni mogoče sklepati, da obstaja povezava med restrikcijskim vzorcem in odpornostjo na protimikrobna sredstva.

Restrikcijski vzorec 3, ki je značilen za večje število sevov, vsebuje tako HLR, MLR, odporne in občutljive seve na testirane snovi (preglednica 9). Vključuje sicer le seve, ki so občutljivi na cetilpiridinijev klorid, ampak to so skoraj vsi sevi vključeni v raziskavo razen seva K45/4, ki je odporen.

Podobno je tudi z odpornostjo na benzalkonijev klorid, na katerega je odporen le sev 375-06, ostali sevi pa so nanj občutljivi. Zato ne moremo trditi, da je ta občutljivost povezana z restrikcijskim vzorcem.

Prvi in četrti restrikcijski vzorec vključujeta samo na eritromicin občutljive seve, občutljivost na ostala protimikrobna sredstva pa je mešana.

Ostali restrikcijski vzorci vključujejo premajhno število sevov, da bi lahko iskali povezavo z odpornostjo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V skladu z delovno hipotezo smo preverili ali je pri bakterijah *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* iz živil, vode, humanih in kliničnih vzorcev prisotna genetska raznolikost na genu *cmeB*, ki kodira transportni protein izlivne črpalke CmeABC in ali vpliva na odpornost sevov na razkužila in antibiotike. Preverili smo tudi, če je genska raznolikost gena *cmeB* odvisna od izvora sevov in ali je vrstno značilna.

Z metodo PCR-RFLP (polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov pomnoženih s PCR) smo ugotovili, da je pri bakterijah vrste *C. coli* in *C. jejuni* prisotna velika genetska raznolikost na genu *cmeB*. Pomnožke gena *cmeB*, velikosti 3213 bp, smo razrezali z različnimi restrikcijskimi encimi ter tako dobili 14 različnih restrikcijskih vzorcev med 42 analiziranimi izolati. Najpogosteje se je pojavil tretji restrikcijski vzorec. Šestim vodnim sevom restrikcijske karte s to metodo nismo mogli izdelati. Restrikcijski vzorci teh sevov so bili tako različni, da jih nismo mogli primerjati z nobeno restrikcijsko karto gena *cmeB* sevov z znanim nukleotidnim zaporednjem. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Cagliero in sod. (2006) saj so pri analizi 21 različnih sevov bakterij *C. jejuni* in *C. coli* določili 18 različnih restrikcijskih vzorcev.

Trinajst od 14-ih restrikcijskih vzorcev je bilo značilnih le za vrsto *C. coli* ali le za vrsto *C. jejuni*. To ni držalo le za restrikcijski vzorec 10, ki je bil značilen tako za vrsto *C. coli* kot za vrsto *C. jejuni*. Pri tem gre najverjetneje za kontaminacijo seva VC7114 vrste *C. coli* s sevom vrste *C. jejuni*. Pri restrikcijskih vzorcih, ki so značilni za vrsto *C. jejuni*, je opaziti značilno skupino na koncu karte z štirimi restrikcijskimi mesti, ki se nahajajo zelo blizu skupaj. Oblikujejo jo fragmenti velikosti 2721 bp, 2870 bp, 2901 bp in 3002 bp. V podobni raziskavi, ki so jo izvedli Cagliero in sod. (2006) pa je bila ta skupina, s štirimi restrikcijskimi mesti na koncu karte, prisotna tudi pri dveh *C. coli* sevih in odsotna pri enem od *C. jejuni* sevov. Ta *C. jejuni* sev (154KU) se je od ostalih sevov razlikoval tudi v drugih restrikcijskih mestih. Pri naši raziskavi so bile takšno razlike prisotne pri sevu ATCC 33559 vrste *C. coli*, saj je imel dve restrikcijski mesti, za encima *PstI* in *EcoRI*, katerih pri ostalih sevih ni. Restrikcijska mesta za ta dva encima pa ima tudi že omenjeni sev 154KU, pri ostalih sevih iz te raziskave pa teh restrikcijskih mest ni prisotnih (Cagliero in sod. 2006).

S primerjavo naše raziskave in raziskave Cagliero in sod. (2006) je mogoče opaziti podobnost med nekaterimi restrikcijskimi vzorci, le da smo v naši raziskavi namesto encima *HinfI* uporabili encim *BsmAI*. Restrikcijski vzorec 6 se ujema z restrikcijskim vzorcem seva A11511 vrste *C. coli*, restrikcijski vzorec 7 z vzorcem seva NCTC 81116 vrste *C. jejuni*, restrikcijski vzorec 9 z vzorcem seva 21 vrste *C. coli* in restrikcijski vzorec 11 z vzorcem seva 721 vrste *C. coli*, če pri tem ne upoštevamo restrikcijskih mest za encim *HinfI*. Restrikcijskih mest je bilo, tako kot v naši raziskavi, več pri vrstah *C. jejuni*.

Analiza restrikcijskih vzorcev glede na izvor sevov ni pokazala povezanosti med izvorom in njihovo strukturo gena *cmeB*, ki je razvidna iz opravljene restrikcijske analize. Le trije restrikcijski vzorci vključujejo seve istega izvora, vsi ostali vzorci vključujejo seve različnih izvorov. Glede na to, da je za posamezen restrikcijski vzorec značilno malo število sevov ali celo samo eden, ne morem zaključiti, da je genetska raznolikost povezana z izvorom sevov.

Z raziskavo tudi nismo mogli dokazati, da genetska raznolikost gena *cmeB* vpliva na odpornost sevov na razkužila in antibiotike. Večina restrikcijskih vzorcev vključuje po en ali dva seva in zato ne moremo trditi o vplivu na odpornost. Vzorci, ki vključujejo večje število sevov, kot so prvi, tretji in četrti restrikcijski vzorec, pa vključujejo precej mešano populacijo sevov glede na odpornost.

5.2 SKLEPI

Iz dobljenih rezultatov eksperimentalnega dela lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Pri bakterijah *Campylobacter jejuni* in *Campylobacter coli* iz živil, vode, humanih in kliničnih vzorcev se pojavlja velika genetska raznolikost gena *cmeB*, ki kodira transportni protein izlivne črpalke CmeABC.
- Z analizo PCR-RFLP (polimorfizmom dolžin restrikcijskih fragmentov, pomnoženih s PCR) smo določili 14 različnih restrikcijskih vzorcev med 42 analiziranimi sevi.
- S primerjavo rezultatov genetske variabilnosti gena *cmeB*, ugotovljene na osnovi restrikcijske analize, in odpornosti analiziranih sevov proti razkužilom in antibiotikom nismo našli neposredne zveze. Prav tako nismo našli povezave med strukturo analiziranega gena in izvorom sevov.

6 POVZETEK

Bakterije rodu *Campylobacter* so znane kot zoonozne, patogene bakterije. Največ infekcij povzročita *C. jejuni* in *C. coli* (Humphrey in sod., 2007). Do okužbe najpogosteje pride pri rokovanju s piščanci ali uživanjem toplotno slabo obdelanega piščančjega mesa. Okužba je možna tudi z uživanjem nepasteriziranega mleka in kontaminirane vode (Konkel in sod., 2001). Odpornost bakterij na antibiotike je čedalje pogostejša, medtem ko je proizvodnja novih antibiotikov čedalje počasnejša. Povečuje se tudi zmanjšana občutljivost na biocide. Skrb vzbujajoča je predvsem verjetnost, da je široka uporaba biocidov kriva za selekcijo in vzdrževanje na antibiotike odpornih bakterij (Russell, 2002a). Do zadnjih nekaj let nazaj so bili fluorokinoloni prva izbira za zdravljenje kampilobakterioze. Zaradi velike uporabe teh antibiotikov v humani in veterinarski medicini se je nanje razvila odpornost (Allos, 2001; Moore in sod., 2006).

Za bakterije rodu *Campylobacter* je značilna črpalka CmeABC, ki je energijsko odvisen izlivni sistem. Sodeluje pri intrinzični odpornosti bakterij *Campylobacter* na različna protimikrobna sredstva. Sestavljena je iz periplazmatskega fuzijskega proteina CmeA, transportnega proteina CmeB na notranji celični membrani in proteina CmeC na zunanji celični membrani. Vsi trije proteini skupaj oblikujejo membranski kanal, skozi katerega se izločajo protimikrobne snovi in ostale toksične komponente. Kodirani so s tremi geni: *cmeA*, *cmeB* in *cmeC*, ki so organizirani v operon s skupnim promotorjem (Lin in sod., 2002, 2003).

Z nalogo smo poskušali dokazati, da je prisotna genetska raznolikost gena *cmeB*, ki kodira transportni protein izlivne črpalke CmeABC pri bakterijah vrste *C. jejuni* in *C. coli*. PCR pomnožke gena *cmeB*, velikosti 3213 bp, smo razrezali z različnimi restrikcijskimi encimi in tako dobili različne restrikcijske vzorce. Med 42 sevi različnega izvora smo določili 14 različnih restrikcijskih vzorcev in s tem dokazali veliko genetsko raznolikost med njimi.

Za restrikcijske vzorce se je izkazalo, da so z izjemo enega od štirinajstih restrikcijskih profilov vrstno značilni, torej pripadajo vrsti *C. coli* ali *C. jejuni*. Obstaja pa tudi podobnost restrikcijskih vzorcev znotraj vrste, kar smo prikazali z dendrogramom (slika 31). Za vse seve vrste *C. jejuni* je značilna skupina štirih restrikcijskih mest na koncu karte. Oblikujejo jo fragmenti velikosti 2721 bp (*PvuII*), 2870 bp (*HaeII*), 2901 bp (*PvuII*) in 3002 bp (*XmnI*).

Izvor sevov ne vpliva na genetsko raznolikost. Restrikcijski vzorci, ki so zastopani z večjim številom sevov, vključujejo seve različnega izvora. Restrikcijski vzorci z manjšim številom sevov so sicer značilni za seve istega izvora, vendar je število teh sevov prenizko, da bi lahko trdili o vplivu izvora na genetsko raznolikost.

Do podobnih ugotovitev smo prišli pri analizi vpliva genetske raznolikosti na odpornost na razkužila in antibiotike. Vzorci, ki so zastopani z večjim številom sevov, vključujejo seve, ki so različno odporni na protimikrobna sredstva. Ostali vzorci pa vključujejo prenizko število sevov, da bi lahko trdili o vplivu na odpornost.

7 VIRI

AcaClone software. 2011. pDRAW32 DNA analysis software. AcaClone software.
<http://www.acaclone.com> (31.8.2011)

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

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

Allos B. M. 2001. *Campylobacter jejuni* infections: Update on emerging issues and trends. Food Safety, 32: 1201–1206

Ayling R. D., Woodward M. J., Evans S., Newell D. G. 1996. Restriction fragment length polymorphisms of polymerase chain reaction products applied to the differentiation of poultry campylobacters for epidemiological investigations. Research in Veterinary Science, 60: 168–172

Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Sayers E. W. 2010. GenBank. Nucleic Acid Research, 39: D32–D37
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (31.8.2011)

Burlage R. S. 1998. Molecular techniques. V: Techniques in microbial ecology. Burlage R. S., Atlas R., Stahl D., Geesey G., Saylor G. (eds.). New York, Oxford University Press: 289–336

Butzler J. P. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clinical Microbiology and Infection, 10: 868–876

Cagliero C., Cloix L., Cloeckaert A., Payot S. 2006. High genetic variation in the multidrug transporter *cmeB* gene in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 58: 168–172

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, 5: 948–950

Čadež N., Štorman A. 2004. Metodologija mikrobiološke analitike s poudarkom na novejših mikrobioloških metodah. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi, Radenci, 18. in 19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81–92

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

de Boer E., Beumer R. R. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 119–130

De Cesare A., Sheldon B.W., Smith K.S., Jaykus L-A. 2002. Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 66, 9: 1587–1594

ECDC. 2007. Enter-net quarterly *Campylobacter* report Apr-Jun 2007/1. Stockholm, ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control: 5 str.
http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0709_SUR_Enter-net_Quarterly_Campylobacter_Report_07_2.pdf (20.8.2010)

ECDC. 2006. Enter-net quarterly *Campylobacter* report Apr-Jun 2005/2. Stockholm, ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control: 2 str.
http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0607_SUR_Enter-net_Quarterly_Campylobacter_Report_05_2.pdf (20.8.2010)

ECDC. 2005. Enter-net annual report: 2005 – “Surveillance of enteric pathogens in Europe and beyond”. Stockholm, ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control: 194 str.
http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/316_annual_report2005.pdf (20.8.2010)

EFSA. 2010a. EFSA evaluates factors contributing to *Campylobacter* in chicken. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 2 str.
<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/zoonoses100805.htm> (19.8.2010)

EFSA. 2010b. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU, 2008. Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. *EFSA Journal* 8, 8: 1522, doi:10.2903/j.efsa.2010.1522: 132 str.
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1522.pdf> (19.8.2010)

EFSA. 2010c. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008. Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates, *EFSA Journal*, 8, 3: 1503, doi:10.2903/j.efsa.2010.1503: 99 str.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1503.pdf> (19.8.2010)

EFSA. 2010d. Scientific opinion on quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. *EFSA Journal*, 8, 1:1437, doi:10.2903/j.efsa.2010.1437: 89 str.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1437.pdf> (19.8.2010)

EFSA. 2010e. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA Journal, 8, 1:1496, doi:10.2903/j.efsa.2010.1496: 370 str.

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1496.pdf> (19.8.2010)

EFSA. 2010f. The community summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. EFSA Journal, 8, 7:1658: doi:10.2903/j.efsa.2010.1658: 261 str.

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1658.pdf> (4.8.2010)

Eswaran J., Koronakis E., Higgins M. K., Hughes C., Koronakis V. 2004. Three's company: Component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. Current Opinion in Structural Biology, 14: 741–747

Fath M. J., Kolter R. 1993. ABC transporters: Bacterial exporters. Microbiological Reviews, 57, 4: 995-1017

Fermentas. 2011a. GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100-10,000 bp. Glen Burnie, Fermentas: 1 str.

<http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/generuler-dna-ladders/sm033-generuler-mix> (31.8.2011)

Fermentas. 2011b. GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, 100-1000 bp. Glen Burnie, Fermentas: 1 str.

<http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/generuler-dna-ladders/sm024-generuler-100bp> (31.8.2011)

Foley S. L., Lynne A. M., Nayak R. 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. Infection, Genetics and Evolution, 9: 430–440

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*. Antimicrobial Agents and 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. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 7: 2753–2759

Gibreel A., Wetsch N. M., Taylor D. E. 2007. Contribution of the CmeABC efflux pump to macrolide and tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51, 9: 3212–3216

Gomez Escalada M., Russell A. D., Maillard J. Y., D. Ochs D. 2005. Triclosan–bacteria interactions: single or multiple target sites? Letters in Applied Microbiology, 41: 476–481

Han K., Jang S. S., Choo E., Heu S., Ryu S. 2007. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. *International Journal of Food Microbiology*, 114: 50–59

Herman L., Heyndrickx M., Grijspeerdt K., Vandekerchove D., Rollier I., De Zutter L. 2003. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiologically study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection* 131, 1169–1180.

Higgins C. F. 2001. ABC transporters: Physiology, structure and mechanism – an overview. *Research in Microbiology*, 152: 205–210

Holešova S., Valaškova M., Plevova E., Pazdziora E., Matějova K. 2010. Preparation of novel organovermiculites with antibacterial activity using chlorhexidine diacetate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 342: 593–597

Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 237–257

IVZ RS. 2010. Epidemiološko spremljanje prijavljenih nalezljivih bolezniv Sloveniji, 2009. Ljubljana, IVZRS – Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 98 str.
http://www.ivz.si/nalezljive_bolezni_aktualno?pi=5&_5_Filename=2491.pdf&_5_MediaId=2491&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (29.7.2011)

Keener K. M., Bashor M. P., Curtis P. A., Sheldon B. W., Kathariou S. 2004. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3: 105–116

Kelly D. J. 2001. The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Journal of Applied Microbiology*, 90, Suppl. 6: 16S–24S

Klančnik A. 2006. Odziv bakterij *Campylobacter jejuni* na temperaturni in oksidativni stres. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 110–116

Konkel M. E., Monteville M. R., Rivera-Amill V., Joens L. A. 2001. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2, 2: 55–71

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

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

- Levin R. E. 2010. Rapid detection and characterization of foodborne pathogens by molecular techniques. Boca Raton, CRC Press: 1–1
- Li X. Z., Nikaido H. 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64, 2: 159–204
- Lin J., Michel L. O., Zhang Q. 2002. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 7: 2124–2131
- Lin J., Matrinez A. 2006. Effect of efflux pump inhibitors on bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 966–972
- Lin J., Sahin O., Michel L. O., Zhang Q. 2003. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 71, 8: 4250–4259
- Lin J., Akiba M., Sahin O., Zhang Q. 2005. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 3: 1067–1075
- Lomovskaya O., Watkins W. 2001. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3, 2: 225–236
- Luo N., Sahin O., Lin J., Michel L. O., Zhang Q. 2003. *In vivo* selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 1: 390–394
- Marquez B. 2005. Bacterial efflux system and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, 87: 1137–1147
- Mavri A., Kurinčič M., Smole Možina S. 2011. The prevalence of antimicrobial resistance among *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from different sources. *Food Technology and Biotechnology* (poslano v objavo)
- McDonnell G., Russell A. D. 1999. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 1: 147–179
- McMurry L. M., Oethinger M., Levy S. B. 1998. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature*, 394: 531–532
- Mishu B., Ilyas A. A., Koski C. L., Vriesendorp F., Cook S. D., Mithen F. A., Blaser M. J. 1993. Serologic evidence of previous *Campylobacter jejuni* infection in patients with the Guillain-Barre syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 118: 947–953

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

Moore J. E., Barton M. D., Blair I. S., Corcoran D., Dooley J. S. G., Fanning S., Kempf I., Lastovica A. J., Lowery C. J., Marsuda M., McDowell D. A., McMahon A., Millar B. C., Rao J. R., Rooney P. J., Seal B. S., Snelling W. J., Tolba O. 2006. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. Microbes and Infections, 8: 1955–1966

Nachamkin I., Bohachick K., Patton C. M. 1993. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. Journal of Clinical Microbiology, 31, 6: 1531–1536

Nekrep F. V. 1996. Bakterije in arheje. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 15–49

Nester E. W., Anderson D. G., Roberts C. E., Nester M. T. 2009. Microbiology: a human perspective. 6th ed. Boston, McGraw Hill: 603–603

Nishimura M., Nukina M., Yuan J. M., Shen B. Q., Ma J. J., Ohta M., Saida T., Uchiyama T. 1996. PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheic patients in China and Japan. FEMS Microbiology Letters, 142: 133–138

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

Pao S. S., Paulsen I. T., Saier M. H. 1998. Major facilitator superfamily. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 1: 1–34

Payot S., Avrain L., Magras C., Praud K., Cloeckaert A., Chaslus-Dancla E. 2004. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. International Journal of Antimicrobial Agents, 23: 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: 1967–1971

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

Pitkänen T., Pönkä A., Pettersson T., Kosunen T. U. 1983. *Campylobacter enteritis* in 188 hospitalized patients. Archives of Internal Medicine, 143, 2: 215–219

Pohlman F. W., Stivarius M. R., McElyea K. S., Waldroup A. L. 2002. Reduction of *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, coliforms, aerobic bacteria, and improvement of ground

beef color using trisodium phosphate or cetylpyridinium chloride before grinding. *Meat Science*, 60: 349–356

PolyAcrylamide Gel Electrophoresis. 1997. Davidson, Davidson College: 1 str.
<http://www.davidson.edu/academic/biology/courses/molbio/sdspage/sdspage.html>
(18.1.2011)

Poole K. 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 92, Suppl. 1: 55S–64S

Qiagen. 2007. QIAamp[®] DNA mini and blood mini hand book. Hilden, Qiagen: 71 str.

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: 1230–1236

Quondamcarlo C., Valentini G., Ruggeri M., Forlini G., Fenderico P., Rossi Z. 2003. *Campylobacter jejuni* enterocolitis presenting as inflammatory bowel disease. *Techniques in Coloproctology*, 7: 173–177

Randall L.P., Ridley A.M., Cooles S.W., Shama M., Sayers A.R., Pumbwe L.m Newell D. G., 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

Russell A. D. 2002a. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: Introduction. *Journal of Applied Microbiology*, 92, Suppl. 1: 1S–3S

Russell A. D. 2002b. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: Comments and conclusions. *Journal of Applied Microbiology*, 92, Suppl. 1: 171S–173S

Sandberg M., Bergsjø B., Hofshagen M., Skjerve E., Kruse H. 2002. Risk factors for *Campylobacter* infection in Norwegian cats and dogs. *Preventive Veterinary Medicine*, 55: 241–253

Schuldiner S., Lebendiker M., Yerushalmi H. 1997. EmrE, the smallest ion-coupled transporter, provides a unique paradigm for structure-function studies. *Journal of Experimental Biology*, 200: 335–341

Sefton A. M. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance. *Drugs*, 62, 4: 557–566

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

Shi F., Chen Y. Y., Wassenaar T. M., Woods W. H., Coloe P. J., Fry B. N. 2002. Development and application of a new scheme for typing *Campylobacter jejuni* and

Campylobacter coli by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 5: 1791–1797

Shin E., Lee Y. 2007. Antimicrobial resistance of 114 porcine isolates of *Campylobacter coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 118: 223 – 227

Smole Možina S., Kurinčič M., Klančnik A., Mavri A. 2011. *Campylobacter* and multi-resistance in the food chain. *Trends in Food Science & Technology*, 22: 91–98

Smole Možina S., Kurinčič M., Kramar A., Uršič S., Katalinić V. 2009. Prevalence and resistance against different antimicrobial compounds of *Campylobacter* spp. in/from retail poultry meat. *Tehnologija mesa*, 50: 112–120

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

Sorvillo F. J., Lieb L. E., Waterman S. H. 1991. Incidence of campylobacteriosis among patients with AIDS in Los Angeles country. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 4: 598–602

Stern N. J., Kotula A. W. 1982. Survival of *Campylobacter jejuni* inoculated into ground beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 5: 1150-1153

Takata T., Fujimoto S., Amako K. 1992. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. *Infection and Immunity*, 60, 9: 3596-3600

Taremi M., Dallal M.M.S., Gachkar L., MoezArdalan S., Zolfagharian K., Zali M.R. 2007. prevalence and antinicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from retail raw chicken and beef neat, Teheran, Iran. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 401 – 403

Teale C. J. 2002 Antimicrobial resistance and food chain. *Journal of Applied Microbiology*, 92, Suppl. 1: 85S–89S

Van Bambeke F., Balzi E., Tulkens P. M. 2000. Antibiotic efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*, 60: 457–470

Van Bambeke F., Glupczynski Y., Plésiat P., Pechère J. C., Tulkens P. M. 2003. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: Occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 1055–1065

van Belkum A. 1994. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clinical Microbiology Reviews*, 7, 2: 174-184

Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60, 2: 407–438

- van Vliet A. H. M., Ketley J. M. 2001. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 90, Suppl. 6: 45S–56S
- Vellinga A., Van Loock F. 2002. The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related *Campylobacter* enteritis. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 19–22
- Verhoeff-Bakkenes L., Hazeleger W. C., de Jonge R., Zwietering M. H. 2009. *Campylobacter jejuni*: A study on environmental conditions affecting culturability and in vitro adhesion/invasion. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 924–931
- Villalain J., Reyes Mateo C., Aranda F. J., Shapiro S., Micol V. 2001. Membranotropic effects of the antibacterial agent Triclosan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 390, 1: 128–136
- Wassenaar T. M. 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 3: 466–476
- Wassenaar T. M., Newell D. G. 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1: 1–9
- Webber M. A., Piddock L. J. V. 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 9–11
- Wieland B., Regula G., Danuser J., Wittwer M., Burnens A. P., Wassenaar T. M., Stärk K. D. C. 2005. *Campylobacter* spp. in dogs and cats in Switzerland: Risk factor analysis and molecular characterization with AFLP. *Journal of Veterinary Medicine B*, 52: 183–189
- Wolfe J. 2006. Biochemical genetics 2: Tools for detection genetic variation. London, UCL - University College London: 5 str.
http://www.ucl.ac.uk/~ucbhjow/b241/biochemical_2.html (29.9.2010)
- Wooldridge K. G., Ketley J. M. 1997. *Campylobacter*-host cell interactions. *Trends in Microbiology*, 5, 3: 96–102
- Yoshida H., Bogaki M., Nakamura S., Ubukata K., Konno M. 1990. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. *Journal of Bacteriology*, 172, 12: 6942–6949
- Yuk H. G., Marshall D. L. 2006. Effect of trisodium phosphate adaptation on changes in membrane lipid composition, verotoxin secretion, and acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 39 – 44
- Zirnstein G., Helsel L., Li Y., Swaminathan B., Besser J. 2000. Characterization of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter coli* by DNA sequence analysis and MAMA PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 190: 1–7

Zorman T., Smole Možina S. 2002. Classical and molecular identification of termotolerant campylobacters form poultry meat. Food Technology and Biotechnology, 40: 117–183

ZAHVALA

Za strokovno pomoč in vse spodbude se zahvaljujem mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina. Hvala recenzentu doc. dr. Blažu Cigiću za strokoven pregled diplomskega dela.

Za pomoč pri praktični izvedbi diplomskega dela in vse koristne nasvete se zahvaljujem Ani Mavri.

Zahvala gre tudi Lini Burkan Makivić za pregled in pomoč pri urejanju literature.

Hvala staršema za vso pomoč in podporo tekom študija ter bratu Jaku za številne tehnične napotke.

Hvala sošolkam, Tanji, sostanovalki Juditi in fantu Urošu za vse spodbude in moralno podporo.