

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mojca VEK

**OPTIMIZACIJA METOD ODKRIVANJA IN
SHRANJEVANJA TERMOTOLERANTNIH
BAKTERIJ RODU *Campylobacter* V RUTINSKEM
LABORATORIJU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mojca VEK

**OPTIMIZACIJA METOD ODKRIVANJA IN SHRANJEVANJA
TERMOTOLERANTNIH BAKTERIJ RODU *Campylobacter* V
RUTINSKEM LABORATORIJU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**OPTIMIZATION OF METHODS FOR DETECTION AND LONG-
TERM PRESERVATION OF THERMOTOLERANT BACTERIA OF
THE GENUS *Campylobacter* IN THE ROUTINE LABORATORY**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo in v Laboratoriju za raziskovalno dejavnost Zavoda za zdravstveno varstvo, Maribor.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina, za somentorico prof. dr. Majo Rupnik in za recenzenta prof. dr. Petra Rasporja.

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Somentorica: prof. dr. Maja RUPNIK

Recenzent: prof. dr. Peter RASPOR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Somentorica: prof. dr. Maja RUPNIK
Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta

Recenzent: prof. dr. Peter RASPOR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca Vek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24 + 579.26 + 579.8 (043) = 163.6
KG	patogeni/ <i>Campylobacter</i> /mikrobiološke metode/verižna reakcija s polimerazo/ mikroorganizmi/PCR/potrditev prisotnosti/meja detekcije/dolgotrajno shranjevanje/temperatura zamrzovanja
AV	VEK, Mojca
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/RUPNIK, Maja (somentorica) /RASPOR, Peter (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	OPTIMIZACIJA METOD ODKRIVANJA IN SHRANJEVANJA TERMOTOLERANTNIH BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i> V RUTINSKEM LABORATORIJU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 60 str, 20 pregl., 13 sl., 59 vir.
IJ	sl
JJ	sl / en
AI	Odkrivanje in izolacija termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i> s klasičnimi metodami kultivacije na selektivnih gojiščih in identifikacije z biokemijskimi testi je dolgotrajna, nezanesljiva in zahtevna. Zaradi tega so rezultati lahko odvisni od subjektivne ocene analitika. Pri delu v rutinskem laboratoriju se zato pojavlja potreba po hitrejši, zanesljivejši in objektivnejši metodi. Ker se na vseh področjih mikrobiologije uveljavljajo metode molekularne biologije, smo se odločili preveriti, kako bi vpeljava takšnih metod v rutinsko delo vplivala na uspešnost odkrivanja termotolerantnih kampilobaktrov v vzorcih površinske vode. V sklopu raziskovalnega dela smo za odkrivanje termotolerantnih kampilobaktrov uporabili verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Metoda omogoča potrditev prisotnosti kampilobaktrov, vključno z nekultivabilnimi kokoidnimi oblikami, ki jih s klasičnimi metodami ni mogoče potrditi. Z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov OT-1559 in 18-1 smo po obogatitveni kultivaciji v bujonu Preston pomnoževali odsek znotraj 16S rRNA, značilen za termotolerantne kampilobakte. Za razlikovanje med vrstama <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i> smo uporabili mnogokratno PCR. Dobljene rezultate smo primerjali z rezultati, pridobljenimi s klasično kultivacijsko metodo po mednarodnem standardu ISO. Ugotovili smo, da se med seboj ujemajo. Hkrati smo določili tudi spodnjo mejo občutljivosti reakcije PCR in klasične metode ter ugotovili, da le-ta znaša 10^2 CFU/ml vzorca vode za klasično metodo oz. 10^1 CFU/ml vzorca za molekularno metodo, vendar je odvisna od kompetitivne bakterijske populacije v vzorcu. Prav tako smo želeli optimizirati dolgotrajno shranjevanje termotolerantnih kampilobaktrov. Med seboj smo primerjali metodo zamrzovanja s komercialnim sistemom Microbank in metodi, ki sta temeljili na hranilnem bujonu št.2. V prvi primerjalni metodi smo osnovnemu gojišču dodali dodatek za rast kampilobaktrov (FBP), v drugi pa glicerol. Glede na preživelost kampilobaktrov in enostavnost metode smo kot najprimernejšo označili metodo, pri kateri smo hranilnemu bujonu št.2 dodali 15 % glicerola.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579.24 + 579.26 + 579.8 (043) = 163.6
- CX pathogens/*Campylobacter*/microbiology/mikrobiological methods /
polymerase chain reaction/PCR/detection/limit of detection/long-term
preservation
- AU VEK, Mojca
- AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/RUPNIK, Maja (co-advisor)
/RASPOR, Peter (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme
in Microbiology
- PY 2008
- TI OPTIMIZATION OF METHODS FOR DETECTION AND LONG-TERM
PRESERVATION OF THERMOTOLERANT BACTERIA OF THE GENUS
Campylobacter IN THE ROUTINE LABORATORY
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 60 p., 20 tab., 13 fig., 59 ref.
- LA sl
- AL sl / en
- AB Detection and isolation of thermotolerant *Campylobacters* with classical methods on different selective media and identification with biochemical tests has long been time consuming, unreliable and difficult. There is a growing interest to develop more reliable method, with which we would be able to detect thermotolerant bacteria in shorter time. Since there is continous growth of molecular biology methods on all fields of microbiology we also wanted to check how affective would it be to use them in routine procedures for detecting thermotolerant *Campylobacters* in water samples. Polymerase chain reaction (PCR) was used in our study to detect thermotolerant bacteria of the genus *Campylobacter*. When using PCR method, rapid detection of campylobacters, including non-culturable, coccoid forms is possible. This is not the case when using classical detection methods. We used specific OT-1559 and 18-1 oligo-primers which enables us to amplify region inside of 16S rRNA gene, specific for thermotolerant *Campylobacters*. For distinction between *C. jejuni* and *C. coli* we used multiplex PCR. Results are comperable with the results of classical method. We also defined limit of detection of both classical (10^2 CFU/ml of water sample) and molecular (10^1 CFU/ml of water sample) method. In addition, we also wanted to optimize the method for long-term preservation of thermotolerant campylobacters. The method in use did not suit requirements of the routine laboratory. We compared three different methods, one of which was long-term preservation using Microbank commercial kit that was already in use for routine preservation of *Campylobacter* strains. The other two methods were based on Nutrient broth No.2. In one case we added *Campylobacter* growth factor (FBP) and in the other glycerol. Based on the survival of campylobacter cells and simplicity of the method, we established that the method based on the Nutrient broth No.2 with added 15 % of glycerol was the most suitable for routine use.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI EKSPERIMENTALNEGA DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Campylobacter</i> V ZGODOVINI.....	3
2.2 ZNAČILNOSTI TERMOTOLERANTNIH KAMPILOBAKTROV	3
2.3 EPIDEMIOLOGIJA KAMPILOBAKTROV.....	4
2.4 ODKRIVANJE PRISOTNOSTI IN IDENTIFIKACIJA TERMOTOLERANTNIH BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i>	7
2.4.1 Klasična postopka odkrivanja termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i> v živilih in vodi.....	7
2.4.1.1 Klasičen postopek odkrivanja prisotnosti bakterij v živilih.....	7
2.4.1.2 Klasičen postopek odkrivanja prisotnosti bakterij v vodi	9
2.4.2 Molekularne metode odkrivanja prisotnosti termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i> v živilih in vodi	11
2.4.2.1 Razvoj različnih metod na osnovi PCR za odkrivanje kampilobaktrov v vzorcih hrane in vode.....	11
2.4.2.2 Določanje meje občutljivosti metode PCR.....	13
2.4.3 Trajno shranjevanje izolatov termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i>.....	13
3 MATERIALI IN METODE DELA.....	16
3.1 MATERIALI.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3.1.1 Mikroorganizmi	Error! Bookmark not defined.
3.1.2 Mikrobiološka gojišča	Error! Bookmark not defined.
3.1.2.1 Hranilni bujon št. 2 (Oxoid, CM 0067)	Error! Bookmark not defined.
3.1.2.2 Bujon FBP	Error! Bookmark not defined.
3.1.2.3 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Preston	Error! Bookmark not defined.
3.1.2.4 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Bolton	Error! Bookmark not defined.
3.1.2.5 Agar CCDA	Error! Bookmark not defined.
3.1.2.6 Krvni agar Kolumbija.....	Error! Bookmark not defined.
3.1.2.7 Brucella bujon	Error! Bookmark not defined.
3.1.3 Reagenti in raztopine	Error! Bookmark not defined.
3.1.3.1 Reagenti za izolacijo DNA s pomočjo QIAamp Mini Kit-a (Qiagen).	Error! Bookmark not defined.
3.1.3.2 Reagenti za pripravo mešanice PCR.....	Error! Bookmark not defined.
3.1.3.3 Elektroforeza	Error! Bookmark not defined.
3.2 METODE	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3.2.1 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i> v vodi z molekularnimi metodami	Error! Bookmark not defined.
3.2.1.1 Odvzem vzorcev in priprava peletov za izolacijo DNA	17

3.2.1.2	Izolacija DNA s setom QIAamp Mini Kit (Qiagen)	17
3.2.1.3	Pomnoževanje odseka 16S rRNA (Luebeck, 2006).....	18
3.2.1.4	Mnogokratna PCR.....	18
3.2.1.5	Dokazovanje pomnožkov PCR z gelsko elektroforezo.....	19
3.2.2	Določanje meje občutljivosti z umetno kontaminacijo površinske vode 20	
3.2.2.1	Priprava suspenzije celic s specifično težo 0,5 po McFarlandu.....	21
3.2.2.2	Priprava razredčin celic	21
3.2.2.3	Membranska filtracija.....	21
3.2.2.4	Zaznavanje kampilobaktrov s klasično in molekularno metodo	22
3.2.3	Trajno shranjevanje izolatov termotolerantnih bakterij rodu	
	<i>Campylobacter</i>.....	23
3.2.3.1	Izolacija termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i> iz perutnine (ISO 10272-1)	24
3.2.3.2	Zamrzovanje sevov, izoliranih iz perutnine.....	25
3.2.3.2.1	Zamrzovanje z glicerolom	25
3.2.3.2.2	Zamrzovanje v bujonu FBP	25
3.2.3.2.3	Zamrzovanje s pomočjo seta Microbank	25
3.2.3.3	Odmrzovanje sevov, izoliranih iz perutnine	26
3.2.3.3.1	Odmrzovanje s cepljenjem na trdno gojišče krvni agar	26
3.2.3.3.2	Odmrzovanje s cepljenjem v obogatitveno tekoče gojišče Bolton.....	26
3.2.3.3.3	Odmrzovanje s cepljenjem v tekoče gojišče Brucella bujon.....	26
3.2.3.4	Pregledovanje plošč in barvanje po Gramu	27
4	REZULTATI.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.1	ODKRIVANJE PRISOTNOSTI TERMOTOLERANTNIH BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i> V VODI Z MOLEKULARNIMI METODAMI	33
4.2	UMETNA KONTAMINACIJA VZORCEV POVRŠINSKE VODE ZA DOLOČANJE MEJE OBČUTLJIVOSTI	36
4.2.1	Umetna kontaminacija vzorcev vode s sevom <i>C. jejuni</i> ATCC 33291 ..	36
4.2.2	Umetna kontaminacija vzorcev vode s sevom <i>C. coli</i> ATCC 43477.....	40
4.3	TRAJNO SHRANJEVANJE IZOLATOV TERMOTOLERANTNIH BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i>	44
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	48
5.1	RAZPRAVA	48
5.1.1	Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i> v vodi z molekularnimi metodami	48
5.1.1.1	Primerjava horizontalne metode po mednarodnem standardu ISO z verižno reakcijo s polimerazo ...	49
5.1.1.2	Potrditev in identifikacija vzorcev pozitivnih na termotolerantne kampilobakte z mnogokratno PCR in primerjava s klasično metodo	49
5.1.1.3	Vpliv trajanja preobogatitve na uspešnost določanja kampilobaktrov z verižno reakcijo s polimerazo.....	50
5.1.2	Določanje meje občutljivosti z umetno kontaminacijo površinske vode50	
5.1.2.1	Določanje meje občutljivosti metod za ugotavljanje prisotnosti <i>C. jejuni</i>	51
5.1.2.2	Določanje meje občutljivosti metod za ugotavljanje prisotnosti <i>C. coli</i>	51
5.1.3	Trajno shranjevanje izolatov termotolerantnih bakterij rodu	
	<i>Campylobacter</i>.....	52
5.1.3.1	Učinkovitost shranjevanja izolatov v odvisnosti od načina zamrzovanja	52
5.2	SKLEPI	54
6	POVZETEK.....	55
7	LITERATURA.....	56

ZAHVALA

KAZALO SLIK

Slika 1: Značilna spiralno zavita oblika bakterij rodu <i>Campylobacter</i> (Alterkruse in sod. 1999)	4
Slika 2: Primerjava incidenc najpogostejših zoonoz pri prebivalcih Evropske unije (EFSA, 2007).....	5
Slika 3: Poti infekcije s <i>Campylobacter jejuni</i> (Konkel in sod., 2001)	6
Slika 4: Agar CCDA z razmazom kolonij, značilnih za <i>Campylobacter</i>	8
Slika 5: Hodogram poteka eksperimenta določanja termotolerantnih kampilobakrov v vodi z molekularnimi metodami.....	Error! Bookmark not defined.
Slika 6: Hodogram poteka eksperimenta določanja meje občutljivosti z umetno kontaminacijo površinske vode	20
Slika 7: Hodogram poteka eksperimenta trajnega shranjevanja izolatov termotolerantnih bakterij rodu <i>Campylobacter</i>	23
Slika 8: Primer gelske elektroforeze pomnožkov odseka 16S rRNA šestih različnih vzorcev vod po 24 in 48 urni inkubaciji v bujonu Preston (vzorci številka 154, 155, 156, 157, 158 in 1772).....	34
Slika 9: Gelska elektroforeza mnogokratne PCR, uporabne za razlikovanje med <i>C. jejuni</i> in <i>C. coli</i>	34
Slika 10: Gelska elektroforeza prve ponovitve poizkusa določitve meje občutljivosti po umetni kontaminaciji s <i>C. jejuni</i> ATCC 33291.	36
Slika 11: Gelska elektroforeza druge ponovitve poizkusa določitve meje občutljivosti po umetni kontaminaciji s <i>C. jejuni</i> ATCC 33291.....	38
Slika 12: Gelska elektroforeza prve ponovitve poizkusa določitve meje občutljivosti po umetni kontaminaciji s <i>C. coli</i> ATCC 43477.....	40
Slika 13: Gelska elektroforeza druge ponovitve poizkusa določitve meje občutljivosti po umetni kontaminaciji s <i>C. coli</i> ATCC 43477	42

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava osnovnega medija hranilni bujon št. 2	Error! Bookmark not defined.
Preglednica 2 : Sestava dodatka za rast <i>Campylobacter</i> Growth Supplement.....	Error! Bookmark not defined.
Preglednica 3: Sestava dodatka za selektivnost <i>Campylobacter</i> Selective Supplement	Error! Bookmark not defined.
Preglednica 4: Sestava osnovnega medija za gojišče Bolton.....	Error! Bookmark not defined.
Preglednica 5: Sestava dodatka za selektivnost Bolton Broth Selective Supplement.	Error! Bookmark not defined.
Preglednica 6: Sestava osnovnega medija CCDA.....	Error! Bookmark not defined.
Preglednica 7: Sestava dodatka za selektivnost CCDA Selective Supplement	Error! Bookmark not defined.
Preglednica 8: Sestava osnovnega medija za krvni agar Kolumbija.	Error! Bookmark not defined.
Preglednica 9: Sestava dodatka za selektivnost <i>Campylobacter</i> Selective Supplement	Error! Bookmark not defined.
Preglednica 10: Sestava <i>Brucella</i> bujona	Error! Bookmark not defined.
Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje odseka 16S rRNA.....	18
Preglednica 12: Sestava reakcijske mešanice za mnogokratno PCR	19
Preglednica 13: Rezultati identifikacije izolatov, pridobljenih iz perutninskega mesa	44
Preglednica 14: Vpliv postopkov zamrzovanja pri temperaturi -20 °C na rast odmrznjenih izolatov	45
Preglednica 15: Vpliv postopkov zamrzovanja pri temperaturi -70 °C na rast odmrznjenih izolatov	46
Preglednica 16: Rezultati preiskave vzorcev vode, pridobljeni s klasično metodo po mednarodnem standardu ISO 17995 in molekularnima metodama).....	35
Preglednica 17: Primerjava rezultatov klasične (ISO 17995) in molekularne metode prve ponovitve poskusa določanja meje občutljivosti po umetni kontaminaciji vzorcev vode s <i>C. jejuni</i>	37
Preglednica 18: Primerjava rezultatov klasične (ISO 17995) in molekularne metode druge ponovitve poskusa določanja meje občutljivosti po umetni kontaminaciji vzorcev vode s <i>C. jejuni</i>	39
Preglednica 19: Primerjava rezultatov klasične (ISO 17995) in molekularne metode prve ponovitve poskusa določanja meje občutljivosti po umetni kontaminaciji vzorcev vode s <i>C. coli</i>	41
Preglednica 20: Primerjava rezultatov klasične (ISO 17995) in molekularne metode druge ponovitve poskusa določanja meje občutljivosti po umetni kontaminaciji vzorcev vode s <i>C. coli</i>	43

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
ATTC.....	American Type Culture Collection
bp.....	bazni par
CBA.....	(Columbia blood agar) Krvni agar Kolumbija
CCDA agar.....	(Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar)
CFU.....	(Colony Forming Units per milliliter), število živih celic, ki so sposobne tvoriti kolonije, v mililitru vzorca
DNA.....	deoksiribonukleinska kislina
dNTP.....	2'-deoksinukleozid trifosfat
EDTA.....	Etilen Diamino-Tetraocetna kislina
EFSA.....	(European Food Safety Authority) Evropska agencija za varnost hrane
EtBr.....	Etidijev Bromid
FBP.....	mešanica železovega sulfata, natrijevega metabisulfata in natrijevega piruvata, ki nevtralizira toksične produkte kisika
kb.....	kilobaza, tisoč baznih parov
NCTC.....	National Collection of Type Cultures
PCR.....	(Polymerase Chain Reaction), verižna reakcija s polimerazo
rRNA.....	ribosomska ribonukleinska kislina
TBE.....	puferska raztopina, sestavljena iz Tris baze, borove kisline in EDTA
Tris.....	trishidrksimetilaminometan
VBNC.....	(Viable But Non-Culturable), živo, vendar nekultivabilno stanje celic

1 UVOD

Termotolerantne bakterije rodu *Campylobacter* so nesporogene, po Gramu negativne, gibljive bakterije, ki rastejo v ozkem temperaturnem območju med 30 °C in 45 °C in ne prenesejo koncentracije kisika nad 5 % (Park, 2002).

V razvitem svetu predstavljajo *Campylobacter jejuni* in njemu sorodne vrste termotolerantnih kampilobaktrov najpogostejše povzročitelje bakterijskih enteritisev pri ljudeh (Moore in sod, 2005; Alterkruse in sod. 1999). Prav taka je situacija tudi v državah Evropske unije, kjer je bilo v letu 2006 prijavljenih 175.561 primerov kampilobakterioz, tem pa so z 160.649 prijavljenimi primeri sledile salmoneloze (EFSA, 2007). V Sloveniji pa so, po podatkih Inštituta za varovanje zdravja, na drugem mestu, takoj za salmonelami (Epidemiološko..., 2005).

Visoka incidenca, nizka infektivna doza in potencialno resni bolezenski zapleti, povezani z okužbo potrjujejo pomembnost te bakterije, ko govorimo o tveganjih za javno zdravstvo (Moore in sod, 2005).

Prav zaradi tega je hitra in zanesljiva diagnostika pomemben del vzpostavljanja učinkovitega nadzora, preprečevanja in zdravljenja kampilobakterioze. Tradicionalno se kot najpomembnejši vir okužbe smatra perutninsko meso. V zadnjem času pa se kot pomembni viri izkazujejo tudi okoljska voda, mleko in govedo. Perutnina in druge ptice pa lahko služijo tudi kot rezervoar različnih sevov, ki izvirajo iz okolja (Champion in sod., 2005).

Kontrola patogenih bakterij, ki se prenašajo z živali, temelji predvsem na odkrivanju izvora in poti preko katerih se bakterije prenašajo. Ker pa so bakterije rodu *Campylobacter* večinoma ubikvitarne v naravi, primeri bolezni večinoma sporadični, izbruhi pa redki, je izvor okužbe zelo težko najti (Wassenaar in Newell, 2000).

V Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor (v besedilu ZZV Maribor) sta v rutinskem delu v uporabi standardni horizontalni metodi določanja termotolerantnih kampilobaktrov po mednarodnem ISO standardu 10272-1 za vzorce živil oz. 17995 za vzorce vode. V težnji po čim hitrejšem in hkrati učinkovitem odkrivanju teh infektivnih bakterij smo poskušali najti primerno molekularno metodo za detekcijo kampilobaktrov v vzorcih površinske vode.

1.1 CILJI EKSPERIMENTALNEGA DELA

Namen našega dela je bil izboljšanje detekcije termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* z molekularno metodo, hkrati pa smo želeli izboljšati sledljivost vzorcev z izboljšanjem metod shranjevanja teh občutljivih bakterij. Postavili smo si naslednje naloge:

- Vpeljati molekularne metode za odkrivanje termotolerantnih kampilobaktrov v vzorcih vode;
- Določiti najnižjo mejo občutljivosti molekularne metode in jo primerjati mejo občutljivosti klasične mikrobiološke metode po mednarodnem ISO standardu 17995;
- Poiskati najprimernejšo metodo shranjevanja sevov, ki bi izboljšala sledljivost vzorcev in s tem pripomogla k razreševanju morebitnih epidemioloških problemov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo:

Da bomo z uvedbo molekularnih metod odkrivanja kampilobaktrov v predobogatitvenih kulturah izboljšali spodnjo mejo občutljivosti metode, ki je v uporabi Laboratorija za sanitarno mikrobiologijo ZZV Maribor, predvsem pa čas, potreben za preiskavo.

Da bomo s preizkusom različnih metod trajnega shranjevanja bakterij rodu *Campylobacter* lahko izbrali tisto, ki bo glede na preživelost celic, glede na razpoložljivo opremljenost laboratorija in glede na časovno zahtevnost postopka najustreznejša za uporabo v rutinskem laboratoriju.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *Campylobacter* V ZGODOVINI

Dolgo časa so kampilobaktre povezovali le z različnimi veterinarskimi boleznimi, kot so na primer diareja pri govedu in septični abortusi pri govedu in ovcah. Šele v poznih 50. letih prejšnjega stoletja so se pojavile prve povezave s človeškimi hemokulturami, vendar so jih zaradi njihove redkosti smatrali za oportunistične človeške patogene. Kot enega glavnih povzročiteljev človeških bolezni jih obravnavamo šele zadnjih 30 let. (Moore in sod., 2005) Iz humanega blata bolnika z akutnim enterokolitisom so namreč *Campylobacter jejuni* prvič uspešno izolirali leta 1971 (Franco, 1988).

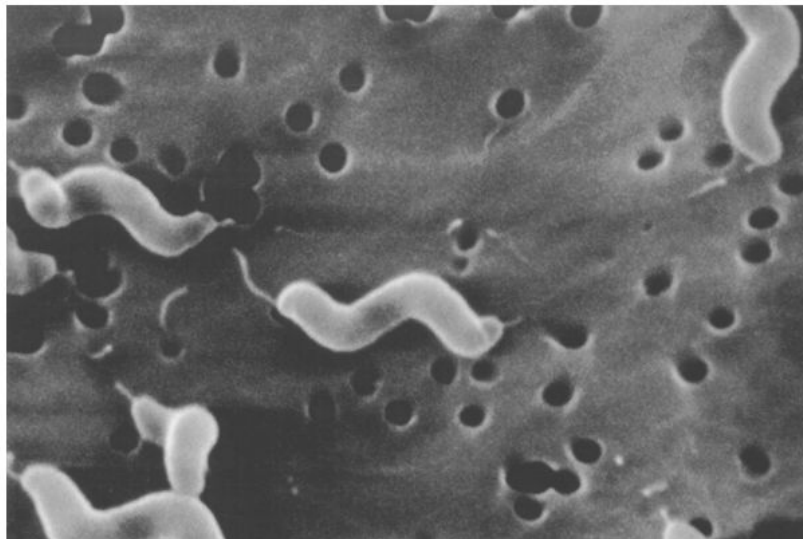
Sprva so bili organizmi zaradi njihove spiralne oblike uvrščeni v rod *Vibrio*. Ker so jih takrat povezovali predvsem s splavi pri različnih domačih živalih, jih je Smith poimenoval *Vibrio fetus*. V letu 1957 pa je Elizabeth King predlagala dve skupini mikroorganizmov. Prva skupina je imela lastnosti, ki so bile enake bakterijam rodu *Vibrio*, druga skupina pa se je od prve razlikovala predvsem po svojih termofilnih lastnostih. Skupini bakterij, ki jih je opredelila Elizabeth King, sta se razlikovali tako biokemijsko kot tudi serološko. To razliko sta leta 1963 dokazala tudi Veron in Sebald, ki sta ugotovila, da termofilne bakterije ne morejo fermentirati ogljikovih hidratov, da imajo drugačen delež gvanina in citozina in da rastejo le v mikroaerofilni atmosferi. Tako sta predlagala uvrstitev bakterij v nov rod z imenom *Campylobacter*, kar pomeni ukrivljena palička (Moore in sod., 2005; Franco, 1988).

Pomemben korak za odkrivanje kampilobaktrov pa se je zgodil šele čez slabih 10 let, leta 1972, ko so Dekeyser in sodelavci razvili prve metode za izolacijo termotolerantnih kampilobaktrov (Moore in sod., 2005). Različne metode so se nato razvijale vse do danes, ko je njihovo izpopolnjevanje vedno večjega pomena, saj so kampilobaktri v večini razvitih držav na prvem mestu povzročiteljev bolezni, ki se prenašajo s hrano.

2.2 ZNAČILNOSTI TERMOTOLERANTNIH KAMPILOBAKTROV

Kampilobaktri so gibljive, ukrivljene, po Gramu negativne palčke, ki imajo obliko črke S ali pa so spiralno zavite. V dolžino merijo od 0,5 do 5 μm , v širino pa od 0,2 do 0,8 μm . V nekaterih starih kulturah bakterije spremenijo obliko in postanejo kokoidne oblike. Vendar to ni pravilo, saj tako morfologijo razvije le omejeno število izolatov (Park, 2002).

Sprva so med termotolerantne kampilobaktre, ki najbolje rastejo med 42 °C in 43 °C, prištevali le dve vrsti, in sicer *C. jejuni* in *C. coli*. Kasneje pa so zaradi podobnosti in sorodnosti k tej skupini dodali še dve vrsti. Poimenovali so ju *C. lari* in *C. upsaliensis*. *C. lari* se od *C. jejuni* in *C. coli* razlikuje po rezistenci proti nalidiksični kislini, *C. upsaliensis* pa po negativni katalazni reakciji in občutljivosti na cefalotin in nalidiksično kislino (Penner, 1988).



Slika 1: Značilna spiralno zavita oblika bakterij rodu *Campylobacter* (Alterkruse in sod., 1999)

2.3 EPIDEMIOLOGIJA KAMPILOBAKTROV

Prenos opredelimo kot pot, po kateri se patogeni mikroorganizem razširi od vira do gostitelja. Kampilobaktri se lahko prenesejo na človeka po različnih poteh.

Najpogostejša in najbolj tradicionalna pot prenosa je z uživanjem premalo toplotno obdelanega mesa, predvsem perutnine. Piščanci se običajno okužijo v drugem tednu svojega življenja, in ostanejo asimptomatski nosilci do zakola. Pomemben vir okužbe piščancev je kontaminirana voda, ki jo piščanci pijejo. Kampilobaktri se nato razmnožujejo in živijo v prebavilih piščancev (Moore in sod. 2005).

Ob zakolu se lahko bakterije prenesejo na meso predvsem s hladilno vodo ter opremo in orodjem, ki je kontaminirano s črevesno vsebino piščancev. Pogosto pa se bakterije prenašajo tudi kasneje, z navzkrižno kontaminacijo pri pripravi jedi, ko pride toplotno že obdelano živilo v stik s surovim, kontaminiranim živilom (Galaniš, 2007; Smole Možina in Uzunović-Kamberović, 2005).

S kampilobaktri pa je lahko okuženo tudi drugo meso. Prebavila goveda, ovac in prašičev so lahko prav tako kot piščančja kolonizirana s temi bakterijami. Kot vir okužbe so se pokazale celo školjke, ki živijo v vodi, kontaminirani s kampilobaktri. Vendar prenos s kontaminiranim mesom ni edini način, ki je pogojen z živalmi. Okužimo se lahko namreč tudi z direktnim stikom z živaljo. Tovrsten prenos je pogost predvsem na farmah, kjer imajo kmetje direkten stik z živalskimi iztrebki, nezadostna higiena pa posledično privede do okužbe (Moore in sod., 2005).

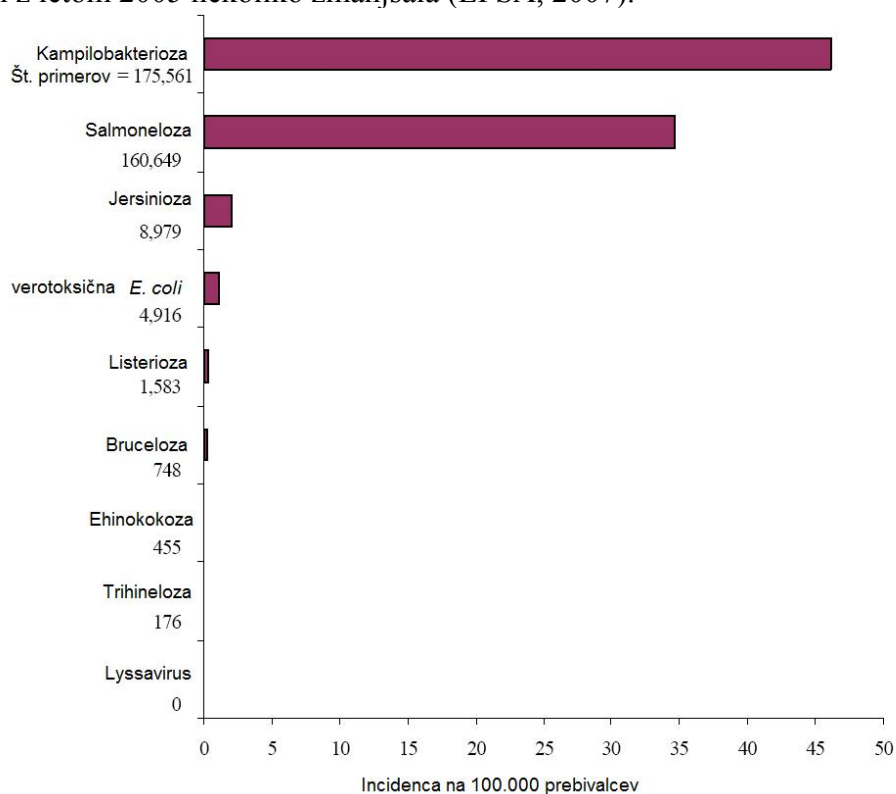
Prav tako je prenos mogoč z uživanjem kontaminiranega in nepasteriziranega mleka ter z uživanjem sadja in zelenjave, ki se lahko kontaminira ob kontaktu s kontaminirano zemljo (Hunt in sod., 2001).

V zadnjem času pa se vse več pozornosti posveča prenosu kampilobaktrov preko okoljskih virov. Filogenetske študije so pokazale, da večina človeških izolatov spada v skupino, ki ne izvira iz živali, ampak iz okolja (Champion in sod., 2005). Do podobnih rezultatov so prišli tudi Kwan in sod. (2008), ki so ugotovili, da se je šest od osmih izolatov iz okoljskih vzorcev skladalo z izolati, ki so pri ljudeh povzročili kampilobakteriozo.

Najpomembnejša med temi viri okužbe je okoljska voda. Ljudje se lahko okužijo s pitjem neobdelane vode ter s plavanjem v jezerih in drugih površinskih vodah (Moore in sod., 2005). Prav tako pa je kontaminirana voda na piščančjih farmah pogost vzrok prenosa kampilobaktrov v živilsko prehransko oskrbovalno verigo (Johnsen, 2006).

Bakterije rodu *Campylobacter* so zelo infektivne. Njihova infektivna doza se namreč giblje od 500 do 10.000 celic in je odvisna od dovzetnosti gostitelja, njegove imunske odpornosti in zdravstvenega stanja ter od vrste in stanja bakterijskih celic (Hunt in sod., 2001).

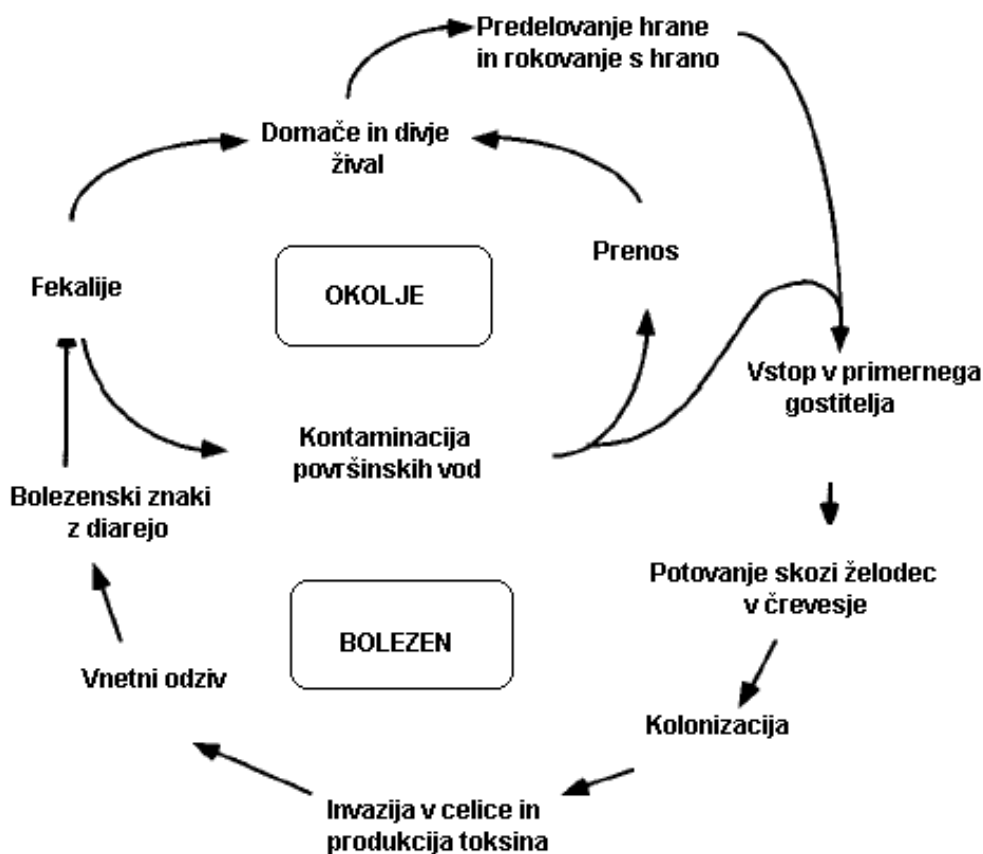
Pri ljudeh se okužba s kampilobaktri sprva odraža kot diareja, ki je lahko vodena ali celo krvava. Pojavijo pa se lahko tudi bolečina v trebuhu, povišana telesna temperatura in glavobol. Ponavadi se prvi bolezenski znaki pojavijo od dva do tri dni po okužbi in sami minejo po približno enem tednu (Moore in sod., 2005). Postinfekcijski zapleti so redki, lahko pa pride do reaktivnega artritisa ali Guillain-Barrejevega sindroma. Približno 5-10 % okužb zahteva bolnišnično zdravljenje, 5 od 10.000 ljudi pa zaradi okužbe umre (Galanis, 2007; Smole Možina in Uzunović-Kamberović, 2005). Kampilobakterioza ostaja najbolj pogosto prijavljena zoonoza pri prebivalcih Evropske unije, čeprav se je incidenca v primerjavi z letom 2005 nekoliko zmanjšala (EFSA, 2007).



Slika 2: Primerjava incidenc najpogostejših zoonoz pri prebivalcih Evropske unije (EFSA, 2007).

Rizični faktorji za okužbo s kampilobaktri so: starost manjša od 5 let ali med 20 in 29 leti, moški spol, rokovanje s surovim perutninskim in drugim mesom, uživanje surovega mesa, nepasteriziranega mleka in mlečnih izdelkov, kontakt z domačimi živalmi ter uživanje neobdelane vode (Galanis, 2007).

Da bi preprečili infekcijo, se moramo držati nekaterih pravil. Z redno veterinarsko oskrbo moramo skrbeti za zdravje živali, v hlevih pa moramo poskrbeti za čistočo, primerno ventilacijo, varno ravnanje z iztrebki in za odstranjevanje stoječe vode. Ob zakolu moramo vzdrževati higieno, postaviti moramo kontrolne točke po sistemu HACCP in ločiti kontaminirane živali in meso od nekontaminiranih. V kuhinji je pomembno, da meso hranimo v hladilniku, da se izogibamo navzkrižni kontaminaciji in da dovolj termično obdelamo meso. Vsak posameznik pa mora paziti na zadostno higieno rok (Galanis, 2007).



Slika 3: Poti infekcije s *Campylobacter jejuni* (Konkel in sod., 2001)

2.4 ODKRIVANJE PRISOTNOSTI IN IDENTIFIKACIJA TERMOTOLERANTNIH BAKTERIJ RODU *Campylobacter*

2.4.1 Klasična postopka odkrivanja termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* v živilih in vodi

Odkrivanje kampilobaktrov v vzorcih hrane, vode, okolja in kliničnih vzorcih je v preteklih letih temeljilo na selektivni obogatitvi, ki ji je sledila kultivacija pod različnimi pogoji rasti (Jelenik in sod., 2005). Prvo učinkovito gojišče za izolacijo teh bakterij iz človeškega fecesa je začel uporabljati Martin Skirow, leta 1977. To gojišče je bistveno pripomoglo k ugotavljanju vloge kampilobaktrov kot povzročiteljev bolezni. Pred njegovim delom je detekcija temeljila na filtraciji vzorcev blata na neselektivno gojišče. Čeprav je bila metoda Skirowa učinkovita za klinične vzorce, se za okoljske vzorce in vzorce hrane ni obnesla, saj so ti vzorci vsebovali tudi druge bakterije, ki so motile detekcijo (Moore in sod., 2005). Zaradi tega sta Bolton in Robertson leta 1982 razvila selektivno gojišče, primerno za izolacijo kampilobaktrov iz hrane in okolja. Poimenovala sta ga gojišče Preston (Bolton in sod., 1982). V letih, ki so sledila, so različni avtorji opisovali izboljšave selektivnih gojišč, vendar se je v diagnostiki gojišče Preston ohranilo vse do danes.

2.4.1.1 Klasičen postopek odkrivanja prisotnosti bakterij v živilih

V rutinskih diagnostičnih laboratorijih poteka odkrivanje in identifikacija vseh mikroorganizmov po mednarodnih standardih, kar omogoča primerljivost, sledljivost in ponovljivost rezultatov. V živilih termotolerantne bakterije rodu *Campylobacter* odkrivajo v skladu z mednarodnim standardom ISO 10272-1.

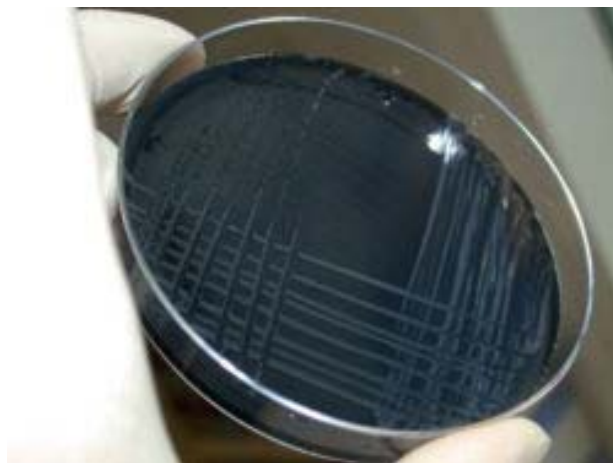
V živilih je število kampilobaktrov v primerjavi z drugo, kompetitivno floro, pogosto nizko. Zato je potrebna predobogatitev oz. obogatitvena kultivacija. Predobogatitev poteka v tekočem gojišču, pri optimalni temperaturi za rast kampilobaktrov (42 °C) in v mikroaerofilni atmosferi (5 % kisika, 10 % ogljikovega dioksida in 85 % dušika).

Po mednarodnem standardu ISO 10272-1 sta v uporabi dve predobogatitveni gojišči. Najpogosteje se uporablja gojišče Preston, kadar pa je bil vzorec izpostavljen razmeram, ki bi na kampilobaktrah lahko delovale stresno, npr. zamrzovanju, uporabimo gojišče Park in Sanders. Preobogatitveno gojišče Preston vsebuje polimiksin B, rifampicin, trimetoprim, cikloheksimid ter sterilno, lizirano, defibrinirano konjsko kri. Bujon Park in Sanders pa vankomicin, trimetoprim, cefoperazon, cikloheksimid, sterilno, lizirano, defibrinirano konjsko kri ter FBP, ki je sestavljen iz železovega sulfata, natrijevega metabisulfita in natrijevega piruvata. Gojišči se torej med seboj razlikujeta po vsebnosti antibiotikov in dodatku za rast FBP (ISO 10272-1). Konjska kri in FBP nevtralizirata toksične produkte kisika, hkrati pa povečata toleranco organizmov na kisik.

Predobogatitvi sledi izolacija na selektivnih gojiščih, ki nam omogoča izolacijo čiste kulture kampilobaktrov. Na različnih selektivnih gojiščih opazujemo značilno rast in morfologijo kolonij. Iz čiste kulture nato naredimo tudi preparat in ga pobarvamo po Gramu.

Gojišče za izolacijo kampilobaktrov še ni optimalno razvito in za sedaj še ni splošnega strinjanja o tem, katero gojišče je najprimernejše. Najpogosteje se uporabljajo gojišča Karmali agar, modificiran Bulzer agar, Skirrow agar, ogljeni cefoperazon deoksilat agar (CCDA) ali Preston agar (Corry, 1995). Ti se med seboj razlikujejo predvsem po sestavi osnovnega medija ter v selektivnih dodatkih, ki jih vsebujejo. Dodani so lahko hemin, oglje, FBP, lizirana konjska kri ter različni antibiotiki.

V laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo ZZV Maribor je v uporabi agar CCDA. Ta agar ne vsebuje krvi, njegova osnova pa je oglje. Omogoča dobro rast kampilobaktrov, na njem pa iščemo kolonije sive ali rjave barve, sploščene, vlažne, podobne kapljicam rose. Zrastejo lahko zelo drobne okrogle kolonije s kovinskim leskom. Drugi tip pa so večje kolonije, ki merijo v premeru od 2 do 3 mm, z nazobčanim robom. Lahko so sive s kovinskim sijajem ali pa rjavo-sivo svetleče (ISO 10272-1).



Slika 4: Agar CCDA z razmazom kolonij, značilnih za *Campylobacter*.

Značilne kolonije, ki smo jih pridobili s kultivacijo pri 42 °C v mikroaerofilnih pogojih, potrdimo najprej z mikroskopsko preiskavo morfologije celic. Če v mikroskopskem preparatu opazimo ukrivljene, paličaste bakterije, spiralne ali S oblike, nadaljujemo s postopkom identifikacije. Izolirano kulturo tako testiramo še z dodatnimi testi. Preverimo gibljivost, rast v aerobni atmosferi, rast pri 25 °C, prisotnost katalaze in oksidaze, fermentacijo sladkorjev, hidrolizo hipurata ter rast ob prisotnosti naldiksične kisline in cefalotina. Vsi ti testi nam omogočajo potrditev termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* (Microorganisms in foods, 1996).

Najpogosteje za razlikovanje med *C. jejuni* in ostalimi vrstami termotolerantnih kampilobaktrov (predvsem *C. coli*) uporabljamo test hidrolize hipurata. Pozitivno reakcijo namreč opazimo le pri *C. jejuni*. Vendar v zadnjem času tudi pri nas opažamo vse več lažno negativnih rezultatov. Iz perutninskega mesa je bil v Sloveniji izoliran posebno velik delež hipurat negativnih izolatov *C. jejuni* (Zorman in Smole Možina, 2002b). Princip

hidrolize hipurata temelji na cepitvi N-benzoglicina (hipurične kisline) na glicin in benzojsko kislino. Nastanek glicina lahko detektiramo z dodatkom ninhidrina, ki povzroči nastanek vijolične barve. Hipurikazni (*hipO*) gen je specifičen za bakterije vrste *C. jejuni* in ga do sedaj niso odkrili pri nobeni drugi vrsti. Lažno negativen rezultat *C. jejuni* bi lahko bil posledica defekta v tem genu ali pa je gen prisoten, vendar ni izražen (Chan in Hani, 1995).

Do lažno negativnega rezultata lahko med drugim privede nezadostno pufranje reakcijske mešanice ali pa premajhen inokulum (Kolackova, 2005). Lažno pozitivne reakcije *C. coli* pa so verjetno posledica delovanja drugih aminokislin ali peptidov, ki so preneseni iz gojišča ali pa jih bakterije izdelajo med inkubacijo (Denis in sod., 1999). Zorman in Smole Možina sta v svoji študiji pokazali, da se lahko lažno negativnim rezultatom izognemo, če namesto fenotipskih testov za identificiranje uporabimo genotipske teste (2002b).

Eno izmed molekularnih metod opisujejo tudi Caner in sod. (2008). S PCR v realnem času so pomnoževali gen *hipO*, ki je značilen za bakterije vrste *C. jejuni*. Izmed 156 izolatov, ki niso bili zmožni hidrolizirati hipurata, so gen *hipO* odkrili pri sedemnajstih izolatih. Prav tako so gen *hipO* odkrili pri 56 % izolatov, ki so ob hidrolizi hipurata dali šibko pozitiven rezultat. Zaključili so, da bi lahko PCR, s katero pomnožujemo gen *hipO*, uporabili za natančnejšo identifikacijo kampilobaktrov.

Fenotipske značilnosti, na katerih temeljijo klasične mikrobiološke metode, so torej odvisne od ekspresije genov in so zato podvržene določeni stopnji variabilnosti, zaradi vplivov okolja. Problem pri klasičnih metodah pa predstavljajo tudi metabolno poškodovane celice, ki jih s klasičnimi metodami odkrivanja prisotnosti in identifikacije mikroorganizmov ne moremo določiti, saj so celice žive, vendar jih ne moremo kultivirati (VBNC stanje) (Moore in sod., 2005).

2.4.1.2 Klasičen postopek odkrivanja prisotnosti bakterij v vodi

Mednarodni standard, ki predpisuje metode, s katerimi naj bi v rutinskih laboratorijih določali in identificirali termotolerantne bakterije rodu *Campylobacter* v vzorcih vod, najdemo pod oznako ISO 17995.

Voda predstavlja potencialno zelo pomemben vir kampilobaktrov in je že prepoznana kot pomembno sredstvo prenosa teh organizmov na človeka in domače živali. O izbruhih kampilobakterioze, ki so jo povzročili prav organizmi v vodi poročajo iz različnih držav. Okužena je lahko tudi pitna voda, vendar največjo nevarnost predstavljajo površinske vode, ki jih ljudje uporabljamo v rekreacijske namene. Glede na to, da je *Campylobacter* eden najpogostejših, če ne celo najpogostejši povzročitelj gastroenteritisov, je reden nadzor površinskih voda ključnega pomena pri ohranjanju javnega zdravja (Moore, 2001).

Za detekcijo nizkega števila kampilobaktrov, ki jih najdemo v vzorcih vode, je ključnega pomena filtriranje, ki skoncentrira bakterijske celice. Mathewson in sod. so leta 1983 primerjali tri tipe filtrov z 0,45 µm porami (Millipore HA, Gelman GN& in pozitivno nabit Zetapor). Za najboljše so se izkazali filtri Zetapor. Primerjali so tudi filtre z različnimi velikostmi por, in sicer velikosti 0,65 µm, 0,45 µm in 0,22 µm. Ugotovili so, da dajo filtri s

porami velikosti 0,45 μm zadovoljive rezultate. Kasneje, leta 1986, pa sta Blaser in Cody ugotavljala ali dvojna filtracija vzorcev (najprej filtriramo skozi večje pore, nato pa še skozi manjše) izboljša rezultate detekcije. Ugotovila sta, da je najboljša detekcija dosežena s filtracijo skozi filter z 0,45 μm porami, in sicer brez predhodnega filtriranja. Po filtriranju naj bi filter z zgornjo stranjo navzdol položili na selektivni agar. Ta metoda ni omogočala štetja bakterij, zato je bilo logično nadaljevanje raziskav v tej smeri. Tako je Dousse s sodelavci leta 1993 filtriral odpadno vodo skozi 0,45 μm Milliporove HA filtre in primerjal detekcijo kampilobaktrov, če je bil filter po filtraciji na selektivno gojišče položen s spodnjo, oziroma zgornjo stranjo navzdol. Kot vmesno fazo so uporabili tudi predobogatitev v gojišču Preston pri 42 °C, 6 ur. Najboljšo detekcijo so ugotovili, po predobogatitvi, ki ji je sledila inkubacija filtrov na agarju Preston. Filtre so na gojišče položili z zgornjo stranjo navzdol (Donnison, 2003).

Mednarodni standard predvideva po filtraciji skozi 0,45 μm filter predobogatitev v gojišču Preston in inkubacijo v mikroaerofilni atmosferi na 42 °C, 44 \pm 4 h. Po predobogatitvi je potrebno na selektivno, trdo gojišče prenesti 10 μl bogatitvenega gojišča in ga razmazati na ploščo. Kot selektivno gojišče je v uporabi agar mCCDA, ki se od osnovnega CCDA agarja razlikuje po vsebnosti dveh antibiotikov, ki sta mu dodana (cefoperazon in amfotericin B). Po inkubaciji na selektivnem gojišču iščemo kolonije, značilne za kampilobakte. V kolikor tako kolonijo odkrijemo, jo prenesemo na dve neselektivni gojišči (npr. krvni agar). Eno ploščo inkubiramo aerobno, drugo pa mikroaerofilno. V kolikor po inkubaciji ne opazimo aerobne rasti, lahko naredimo preparat po Gramu, test gibljivosti, oksidazni in katalazni test (ISO 17995).

V vodnih okoljih je prisotnih veliko mikroorganizmov, ki so po svojih lastnostih podobni kampilobaktrom. Najpogosteje kampilobakte zamenjamo z bakterijami rodu *Arcrobacter* spp., ki se sicer od kampilobaktrov razlikujejo predvsem po zmožnosti aerobne rasti pri 30 °C, vendar lahko pride do izjem, ko aerobne rasti ne opazimo (Diergaardt in sod, 2003). Problem pri identifikaciji pa lahko predstavljajo tudi morebitne metabolno poškodovane celice, ki jih s klasičnimi metodami odkrivanja prisotnosti in identifikacije mikroorganizmov ne moremo določiti, saj so te celice žive, a nekultivabilne (Reezal in sod., 1998).

S klasičnimi protokoli poškodovanih celic ne moremo določiti, oziroma dobimo lažno negativen rezultat. V ugodnih pogojih, ob prehodu na človeškega gostitelja, pa si celice opomorejo in so znova sposobne razmnoževanja. To povzroči bolezenske znake (Moore in sod., 2005).

Naraščajoče število kampilobakterioz in ugotavljanje pomembnosti okoljske vode kot vira okužbe kažejo potrebo po čim hitrejših in učinkovitejših metodah za odkrivanje čim manjšega števila bakterij rodu *Campylobacter*. Danes, v izjemnem porastu molekularnih metod v rutinskih laboratorijih, je uvedba le-teh na čim več področjih nujen korak naprej.

2.4.2 Molekularne metode odkrivanja prisotnosti termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* v živilih in vodi

Omejitve klasičnih metod izolacije in identifikacije kampilobaktrov so kmalu privedle k razvoju alternativnih metod za detekcijo teh mikroorganizmov v različnih vzorcih. Razvoj poli- in monoklonskih protiteles, specifičnih za kampilobaktr, je sprva privedel do razvoja velikega števila imunskih testov. Ti testi so se pokazali za učinkovite pri odkrivanju bolezni ljudi, ko je potrebna hitra diagnoza (Moore in sod., 2005). Njihova pomanjkljivost pa je, da lahko z njimi določamo le nekatere vrste kampilobaktrov, medtem ko podvrste mikroorganizmov največkrat ne moremo določiti (On, 1996). Kot bolj učinkovite pa se vedno znova izkazujejo molekularne metode.

2.4.2.1 Razvoj različnih metod na osnovi PCR za odkrivanje kampilobaktrov v vzorcih hrane in vode

Leta 1992 je Giesendorf s sod. objavil prvo poročilo o reakciji PCR za odkrivanje bakterij rodu *Campylobacter* v vzorcih hrane. Kot vzorce so uporabili tako naravno, kot tudi umetno kontaminirane vzorce kože piščancev. Metoda je temeljila na pomnoževanju variabilne regije znotraj gena 16S rRNA. PCR so kombinirali s kratko predobogatitvijo, kar je prineslo dve pomembni prednosti. Prva prednost je bila povečanje občutljivosti metode. Vzorce, ki so bili inokulirani z vsaj 25 CFU/g, so privedli do pozitivnega rezultata PCR, saj je bilo po 18-urni predobogatitvi minimalno število odkritih bakterij 500 CFU/ml bogatitvenega gojišča. Ena izmed možnosti, s katero lahko povečamo občutljivost reakcije PCR je tudi uporaba rRNA namesto DNA, kot matrične molekule. Vsaka celica namreč vsebuje najmanj 10^3 do 10^4 kopij rRNA, kar bi lahko povečalo občutljivost PCR ali pa skrajšalo čas predobogatitve. Kot drugo pa kombinacija PCR s kratko predobogatitvijo poveča število živih celic in s tem razredči število mrtvih in VBNC celic. Vzorce, vzeti pred zaključeno 18-urno predobogatitvijo, niso dali pozitivnega rezultata PCR. Iz tega so sklepali, da tudi kadar so mrtve in VBNC celice prisotne, rezultati PCR niso pozitivni. Primerjava metode PCR s klasično metodo je pokazala, da obe metodi detektirata enako število pozitivnih in negativnih vzorcev (Giesendorf in sod., 1992).

V sledečih letih so raziskovalci razvijali številne različice PCR za detekcijo kampilobaktrov v različnih vzorcih. Te metode so sicer koristne, kot dodatek h klasični metodi, saj skrajšajo čas, potreben za pridobitev rezultata za dva ali več dni, a so še vedno omejene zaradi neučinkovitih metod, s katerimi pripravimo vzorec. Veliko različic PCR lahko detektira že eno samo celico v reakciji, vendar je nezmožnost ločitve majhnega števila celic od vzorčnega matriksa omejevalna okoliščina pri vpeljavi metod, ki temeljijo na PCR, v rutinski laboratorij. Večina metod tako še vedno izhaja iz predobogatitve ali pa vključuje še izolacije na trdnih, selektivnih gojiščih (Moore in sod., 2005).

Direktno določanje ter kvantifikacijo kampilobaktrov omogoča novejša različica PCR, imenovana PCR v realnem času (angl. real time PCR) oz. kvantitativni PCR (Moore in sod., 2005). Metoda temelji na sposobnosti polimeraze, da v fazi podaljševanja izpodrine fluorescentno označen oligonukleotid, ki se prilega v notranje zaporedje pomnoževanega odseka DNA. Posledica tega je nastajanje fluorescentnega signala, ki z vsakim nadaljnim

ciklom narašča (Dorak, 2007). S to metodo lahko kvantitativno ali kvalitativno ovrednotimo rezultat mikrobiološke analize, zato je metoda med najbolj obetavnimi za direktno odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* v različnih vzorcih.

Da bi poiskali najprimernejšo metodo za standardno odkrivanje bakterij *C. jejuni*, *C. coli* in *C. lari* v vzorcih živil, so Lübeck in sod. leta 2003, v sklopu projekta FOOD-PCR razvili metodo PCR, ki temelji na detekciji odseka gena 16S rRNA. Primerjali so petnajst različnih začetnih oligonukleotidov, ki se prilegajo različnim odsekom znotraj 16S rRNA gena in dva začetna oligonukleotida, ki se prilegata odsekoma znotraj 23S rRNA gena. Najpomembnejši kriterij, ki bi naj odlikoval PCR test primeren za hitro in učinkovito detekcijo v rutinskih laboratorijih, je selektivnost metode. Kot selektiven se je izkazal le en par, in sicer začetni oligonukleotid OT1559 v kombinaciji z 18-1 začetnim oligonukleotidom (Lübeck in sod., 2003).

Metodo so preverili tudi v krožnem poskusu, v katerega je bilo vključenih dvanajst evropskih laboratorijev. Občutljivost metode je bila višja od 90 %, prav tako pa se je metoda izkazala z dobro ponovljivostjo. Kljub temu pa za potrditev pozitivnih rezultatov priporočajo klasično metodo v skladu z mednarodnim standardom (Josefsen in sod., 2004).

Ena izmed omejitev metod PCR je, da s temi metodami ne moremo razlikovati med živimi in mrtvimi bakterijskimi celicami, saj je DNA prisotna tudi če so celice mrtve (Lazcka in sod., 2007). Prednost klasične metode je tudi v tem, da lahko z njo identificiramo termotolerantne kampilobaktrije do vrste. Vendar lahko pride do napak zaradi subjektivnih ocen rezultatov, nekateri izolati pa imajo netipičen fenotip, kar znova privede do napačnega rezultata (Denis in sod. 1999).

Razlikovanje med *C. jejuni* in *C. coli* na primer temelji na sposobnosti *C. jejuni*, da hidrolizira hipurat, vendar nekateri sevi tega niso sposobni. Lažno negativen rezultat privede do lažne interpretacije (Denis in sod., 1999). Da bi se lažno negativnim rezultatom razlikovanja med tema dvema vrstama izognili, so poskušali različne molekularne strategije, ki so ciljale na različne genske tarče (Persson in Olsen, 2005). Zorman in sod., so kot sredstvo za razlikovanje med *C. jejuni* in *C. coli* uporabili analizo profilov PFGE in tipiziranje *fla*-RFLP, pri čemer se je kot bolj učinkovita izkazala analiza profilov PFGE (2006).

Kot ena izmed najučinkovitejših metod za razlikovanje med *C. jejuni* in *C. coli* se je pokazala metoda mnogokratne PCR, ki cilja na hipurikazni (*hipO*) gen, značilen za *C. jejuni* in na regijo, specifično za *C. coli* (odsek, ki se delno prekriva z genom za aspartokinazo) (Linton in sod., 1997; Zorman in Smole-Možina, 2002a; Persson in Olsen, 2005). V zadnjem času se je metoda mnogokratne PCR pokazala kot primerna za odkrivanje različnih vrst mikroorganizmov v različnih ekoloških nišah. Posebej primerna je za razlikovanje med ozkosrodnimi vrstami (Settani in Corsetti, 2007).

Pri tej metodi uporabljamo dva para začetnih oligonukleotidov, kar omogoča hkratno pomnoževanje dveh različnih tarč v eni reakciji DNA. Mnogokratna PCR se je pokazala za zelo učinkovito pri identifikaciji sevov *C. jejuni*, ki niso sposobni hidrolizirati hipurata,

saj je kot *C. jejuni* prepoznala tudi tiste seve, ki so bili po klasični fentotipski identifikaciji uvrščeni med *C. coli* (Zorman in Smole Možina, 2002a).

Uporaba samo ene identifikacijske metode za razlikovanje med *C. jejuni* in *C. coli* ne zadostuje vedno za pravilno identifikacijo. Zaradi tega je poleg klasične metode smiselno uporabiti še primerno molekularno metodo (Kos in sod., 2006). Čeprav je metoda z mnogokratno PCR primerna za razlikovanje med *C. jejuni* in *C. coli*, z njo ni mogoče identificirati ostalih vrst termotolerantnih kampilobaktrov.

2.4.2.2 Določanje meje občutljivosti metode PCR

Kadar želimo novo metodo uvesti v stalno laboratorijsko prakso mora le-ta izpolnjevati določene pogoje. Ključnega pomena za uspešno validacijo so selektivnost, specifičnost in meja občutljivosti metode (Sartory, 2005). Meja občutljivosti je definirana kot najnižje število mikrobov, ki ga lahko zaznamo z izbrano metodo (Moldenhauer, 2002).

Metoda PCR naj bi imela nizko mejo občutljivosti. Mednarodni standardi, ki izhajajo iz tradicionalnih metod, zahtevajo odkritje ene celice v 25 g vzorca. Teoretična meja občutljivosti ene celice na reakcijo PCR v praksi pomeni 10^3 - 10^4 celic v mililitru predobogatene vzorca. Metoda PCR bi tako morala odkriti najmanj 10-100 kopij tarčnega odseka DNA v reakciji (Malorny in sod., 2003).

Jelenik in sod. (2005) so z umetno kontaminacijo piščančje solate z majonezo primerjali dve metodi za hitro identifikacijo *C. jejuni* in *C. coli*. Singlepath® *Campylobacter* test so primerjali z metodo PCR pri kateri pomnožujemo 287 bp dolg odsek 16S rRNA. V fiziološki raztopini so pripravili desetkratne razredčine bakterijske suspenzije, s katerimi so kontaminirali svežo piščančjo solato. Ker so z reakcijo PCR pomnoževali odsek 16S rRNA so predvidevali, da bodo tako *C. jejuni* kot tudi *C. coli* odkrili z enako natančnostjo. Meja občutljivosti metode PCR je za oba seva znašala 10^2 CFU/ml, medtem ko z Singlepath® *Campylobacter* testom prisotnosti *C. coli* niso mogli določiti, meja občutljivosti za *C. jejuni* pa je znašala 10^3 CFU/ml.

2.4.3 Trajno shranjevanje izolatov termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter*

Bakterije lahko shranjujemo na različne načine. Kadar vzroce shranjujemo za kratek čas hranimo nekatere pri sobni temperaturi, druge v hladilniku na hranilnem agarju, spet tretje v zamrzovalniku. Kratkotrajno hranjenje bakterij na agarju je za tiste vrste, ki takšno hranjenje prenesejo, zelo priročno. Ker pa s staranjem mikroorganizmov pride do spreminjanja genetskega materiala, ta metoda ni primerna za vse bakterije. Tudi shranjevanje v zamrzovalniku ni primerno za vse bakterijske vrste, saj lahko pride do različnih odstopanj v procesu odtajanja pa tudi odstotek preživelih bakterij se med vrstami razlikuje (Mateczun in Peruski, 2003).

Trajno shranjevanje je pomembno predvsem za shranjevanje kvalitetnih kontrolnih sevov, za izobraževalne in raziskovalne namene, epidemiološke študije ter kvantitativne in

kvalitativne analize (Rogol in sod, 1990). Učinkovito trajno shranjevanje izolatov termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* ovira njihova občutljivost na kisik in izsuševanje ter nastanek VBNC oblike mikroorganizmov (Moore in Stanley, 2000). Prehod v VBNC obliko pa lahko sproži tudi znižanje temperature pod 25 °C, oksidativen stres in stradanje (Klančnik in sod., 2008).

Prav zaradi tega je bilo preizkušenih že veliko metod, ki bi po dolgotrajnem shranjevanju pokazale čim boljšo oživitev bakterij (Moore in Stanley, 2000). Sprva so za shranjevanje uporabljali bogaten brucella medij, ki je poleg brucella bujona vseboval še 0,5 % agarja in 10 % defibrinirane ovčje krvi. V tem mediju so bakterije vrste *C. jejuni* dokazano preživele 27 dni (Wang in sod., 1980). Balakrish Nai in sod. (1984), so poskušali izboljšati medij za shranjevanje, z dodatkom substrata na jajčni osnovi in dodatka za rast kampilobaktrov (FBP). V hladilniku so vsi sevi preživeli več kot 3 mesece in čeprav je nekaj sevov po tem obdobju odmrlo, so lahko po dodatnem mesecu in pol shranjevanja še vedno oživel 70 % sevov.

Kasneje je bilo opisanih še več različnih gojišč, ki naj bi omogočila čim učinkovitejše shranjevanje kampilobaktrov. Moore in Stanley (2000) sta opisala postopek, pri katerem svežo kulturo kampilobaktrov, ki jih gojimo na krvnem agarju Kolumbija, s pomočjo vrtničnega mešalnika premešamo z defibrinirano konjsko krvjo, nato pa suspenzijo takoj zamrzujemo pri -80 °C. Kulturo oživimo z inokulacijo na sveže plošče krvnega agarja Kolumbija. Prav tako sta predlagala še dve metodi za dolgotrajno shranjevanje. Prva je bila sestavljena iz 1 ml hranilnega bujona št.2 (Oxoid), kateremu je bilo primešano 20 % glicerola in dodatek za rast kampilobaktrov (FBP). Kulturo kampilobaktrov sta pomešala z gojiščem in jo shranila v tekočem dušiku. Druga metoda pa je temeljila na komercialno dostopnem sistemu za trajno shranjevanje bakterijskih kultur Protec®. Tudi te seve so shranili v tekočem dušiku. Kot najbolj učinkovito metodo navajata shranjevanje v defibrinirani konjski krvi, saj s to metodo v desetih letih shranjevanja niso izgubili niti enega kliničnega izolata.

Primerjavo petih različnih metod trajnega shranjevanja sta naredila tudi Gorman in Adley (2003). Poiskati sta hotela enostavno in poceni metodo, ki bi omogočala hitro in učinkovito okrevanje kampilobaktrov po dolgotrajnem zamrzovanju. Učinkovitost vseh metod so preizkusili pri dveh izbranih temperaturah, in sicer pri -20 °C in -85 °C. Pri dveh metodah so uporabili komercialno dostopen sistem za shranjevanje bakterijskih kultur Cryobank, vendar so pri eni izmed njiju nadomestili hipertonično krioprotektorsko raztopino z defibrinirano konjsko krvjo. Pri tretji metodi so gojišče sestavili iz hranilnega bujona št.2, 0,12 % bakteriološkega agarja, 15 % glicerola, 0,1 % kvasnega ekstrakta in FBP. Gojišču so nato dodali bakterijsko kulturo in ga shranili v zamrzovalnikih. Četrta metoda je temeljila na gojišču, sestavljenem iz 15 % glicerola in 85 % hranilnega bujona št.2, ki mu je bila dodana sveža kultura *C. jejuni*. Pri zadnji, peti metodi pa so razmerje spremenili, tako da je gojišče vsebovalo 50 % glicerola in 50 % hranilnega bujona št.2, z dodano svežo kulturo *C. jejuni*. Po inkubaciji so poskušali seve obnoviti s kultivacijo na krvnem agarju Kolumbija. Učinkovitost metod so preverjali v 12 mesečnem obdobju.

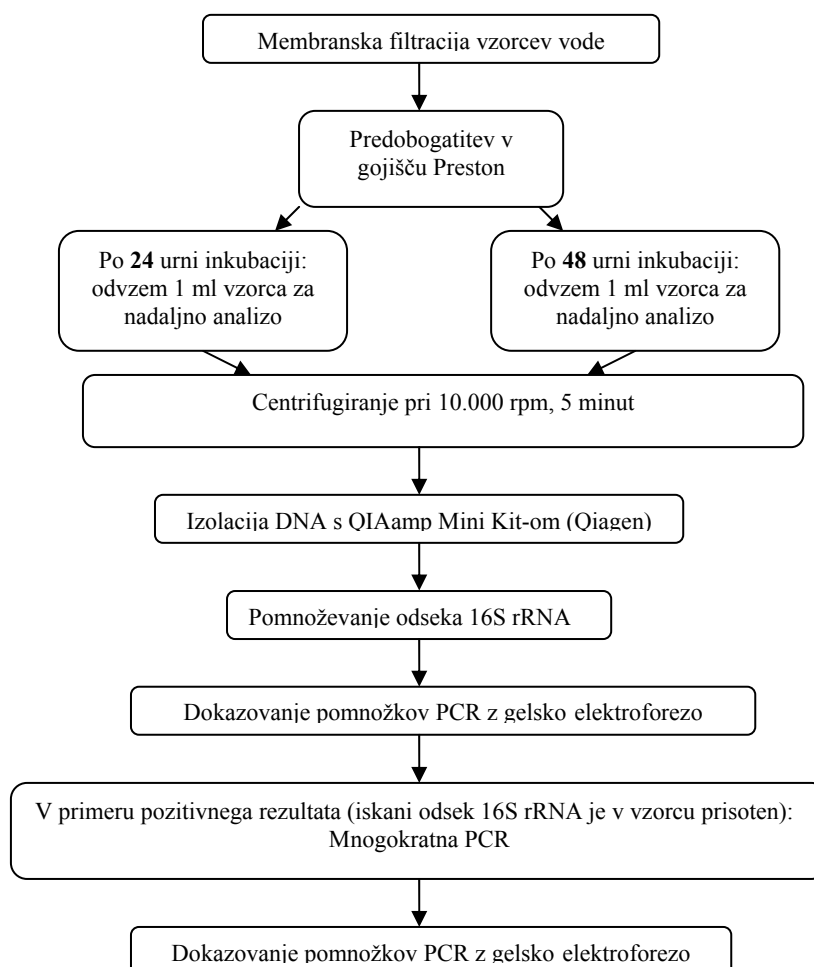
Ugotovili so, da je kri odličen dodatek, kadar želimo izboljšati rast in okrevanje bakterij rodu *Campylobacter*. Kri je nedefiniran medij, ki vsebuje železo ter razne encime, kot so katalaza, peroksidaza in superoksid dismutaza. Te snovi zmanjšajo toksičnost medija in pomagajo kampilobaktrom pri premagovanju oksidativnega stresa. Vendar so želeli poiskati snov, ki bi ustrezno nadomestila funkcijo krvi. Prav zaradi tega so preizkusili shranjevanje z dodatkom FBP, ki uspešno ohranja preživetje kampilobaktrov pri različnih načinih shranjevanja. Ugotovili so, da je od vseh petih preizkušenih metod najboljša metoda, pri kateri so hranilnemu bujonu št.2 dodali dodatek za rast FBP. Kampilobaktri so v tem gojišču preživel 20 mesecev, in sicer pri temperaturi -20°C .

3 MATERIALI IN METODE DELA

Laboratorijsko delo je bilo sestavljeno iz treh med seboj ločenih eksperimentov. Kot prvi cilj smo si zastavili optimizacijo odkrivanja termotolerantnih bakterij iz rodu *Campylobacter*. V skladu s tem ciljem smo v prvem eksperimentalnem delu primerjali učinkovitost molekularnih metod napram klasični metodi (ISO 17995:2005), v drugem eksperimentalnem delu pa smo določili spodnjo mejo občutljivosti molekularne (pomnoževanje odseka 16S rRNA) in klasične metode (po ISO standardu 17995:2005). V tretjem delu smo z namenom optimizacije dolgotrajnega shranjevanja termotolerantnih bakterij iz rodu *Campylobacter* med seboj primerjali tri različne tehnike zamrzovanja, ki smo jih kombinirali s tremi različnimi tehnikami odmrzovanja.

3.1 METODE

3.1.1 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* v vodi z molekularnimi metodami



Slika 5: Hodogram poteka eksperimenta določanja termotolerantnih kampilobakrov v vodi z molekularnimi metodami

3.1.1.1 Odvzem vzorcev in priprava peletov za izolacijo DNA

Vzorci smo pridobili na Oddelku za sanitarno mikrobiologijo ZZV Maribor. Vzorce so bili v tem laboratoriju obdelani po klasični metodi (ISO 17995:2005), mi pa smo jih analizirali s pomočjo molekularnih metod. Odvzemali smo jih po drugi stopnji detekcije s klasičnimi metodami, in sicer po 24 in 48 urni inkubaciji v bogatitvenem bujonu Preston.

Iz bogatitvenega bujona Preston smo odpipetirali 1 ml vzorca in ga prenesli v mikrocentrifugirko. Vzorec smo centrifugirali 5 minut pri 10.000 rpm.

V kolikor takojšnja izolacija DNA ni bila mogoča, smo vzorce shranili na -20 °C do nadaljnje obdelave.

3.1.1.2 Izolacija DNA s setom QIAamp Mini Kit (Qiagen)

Uporabili smo postopek, ki ga priporoča proizvajalec:

- Pelet smo po potrebi odtajali in ga resuspendirali v 180 µl pufra ATL. Nato smo dodali 20 µl proteinaze K ter inkubirali mikrocentrifugirko pri 56 °C 1 uro (občasno smo vzorec premešali z vrtinčnikom).
 - Po inkubaciji smo vzorec na kratko centrifugirali in dodali 200 µl pufra AL, premešali na vrtinčniku, da je nastala homogena raztopina, ter ga inkubirali 10 minut na 70 °C.
 - Po inkubaciji smo vzorec na kratko centrifugirali in dodali 200 µl ledeno hladnega etanola (96-100 %). Vzorec smo premešali na vrtinčniku in na kratko centrifugirali.
 - Vsebino smo nato iz mikrocentrifugirke prenesli v kolono za izolacijo DNA in centrifugirali 1 minuto pri 8.000 rpm. Po centrifugiranju smo kolono prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko, filtrat pa zavrgli.
 - Dodali smo 500 µl pufra AW1 ter centrifugirali 1 minuto pri 8.000 rpm. Po centrifugiranju smo kolono prenesli v novo zbiralno mikrocentrifugirko, filtrat pa zavrgli.
 - Nato smo dodali 500 µl pufra AW2 ter centrifugirali 3 minute pri 14.000 rpm.
 - Kolono smo po centrifugiranju prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko, filtrat pa zavrgli. Dodali smo 200 µl PCR H₂O, inkubirali 3 minute na sobni temperaturi ter centrifugirali 1 minuto pri 8.000 rpm.
 - Po centrifugiranju smo kolono prenesli v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko. Dodali smo 200 µl PCR H₂O, inkubirali 3 minute na sobni temperaturi ter centrifugirali 1 minuto pri 8.000 rpm. Filtrat smo nato uporabili za nadaljnje analize.
-

3.1.1.3 Pomnoževanje odseka 16S rRNA (Lübeck in sod., 2006)

- Priprava mešanice za pomnoževanje

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje pripravimo za vse vzorce ter pozitivno (*C. jejuni* ATCC 33291) in negativno (brez DNA) kontrolo hkrati. Sestavo prikazuje preglednica 11:

Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje odseka 16S rRNA

Reagent	Koncentracija	Količina
PCR H ₂ O		17,7 µl
PCR pufer z MgCl ₂	10x	2,5 µl
MgCl ₂	25 mM	0,5 µl
dNTPs	20 µg/µl	1,0 µl
BSA	10 mg/ml	0,13 µl
zač. oligonukleotid OT - 1559	10 pg/µl	0,55 µl
zač. oligonukleotid 18-1	10 pg/µl	0,6 µl
polimeraza Taq	1U/µl	1,0 µl

24 µl PCR mešanice odpipetiramo v reakcijske posodice PCR in ji dodamo 1 µl izolirane mikrobne DNA. Dobro premešamo in reakcijske posodice vstavimo v PCR aparat.

- Temperaturni režim reakcije

⇒ Začetna inkubacija na 94 °C za 1 minuto.

⇒ Ciklično pomnoževanje fragmentov DNA v 35 ciklih

Denaturacija: 94 °C, 15 sekund

Prileganje: 45 °C, 15 sekund

Pomnoževanje DNA: 72 °C, 30 sekund

⇒ Program smo zaključili s končno inkubacijo na 72 °C za 4 minute in pomnožke shranili na 4 °C.

3.1.1.4 Mnogokratna PCR (Linton in sod., 1997)

Vzorce, pri katerih smo s pomočjo pomnoževanja odseka 16S rRNA dokazali prisotnost bakterij rodu *Campylobacter*, smo testirali še s pomočjo mnogokratnega PCR, ki loči med prisotnostjo vrst *C. jejuni* oz. *C. coli*.

- Priprava mešanice za pomnoževanje

Reakcijsko mešanico za pomnoževanje pripravimo za vse vzorce ter pozitivno in negativno (brez DNA) kontrolo hkrati. Sestavo prikazuje preglednica 12:

Preglednica 12: Sestava reakcijske mešanice za mnogokratno PCR

Reagent	Koncentracija	Količina
PCR H ₂ O		2,5 µl
PCR pufer z MgCl ₂	10x	2,5 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 µl
dNTPs	20 µg/µl	1,25
Tween 60	5 % [v/v]	2,5 µl
zač. oligonukleotid COL4.4	1 µg/µl	0,25 µl
zač. oligonukleotid COL3.3	1 µg/µl	0,25 µl
zač. oligonukleotid JEJ4.4	1 µg/µl	0,25 µl
zač. oligonukleotid JEJ3.3	1 µg/µl	0,25 µl
polimeraza Taq	5 U/µl	0,2 µl

24 µl PCR mešanice odpipetiramo v reakcijske posodice PCR in ji dodamo 1 µl izolirane mikrobne DNA. Dobro premešamo in reakcijske posodice vstavimo v PCR aparat.

○ Temperaturni režim reakcije

⇒ Začetna inkubacija na 95 °C za 1 minuto.

⇒ Ciklično pomnoževanje fragmentov DNA v 35 ciklih

Denaturacija: 95 °C, 15 sekund

Prileganje: 63 °C, 15 sekund

Pomnoževanje DNA: 72 °C, 30 sekund

⇒ Program smo zaključili s končno inkubacijo na 72 °C za 8 minut in pomnožke shranili na 4 °C.

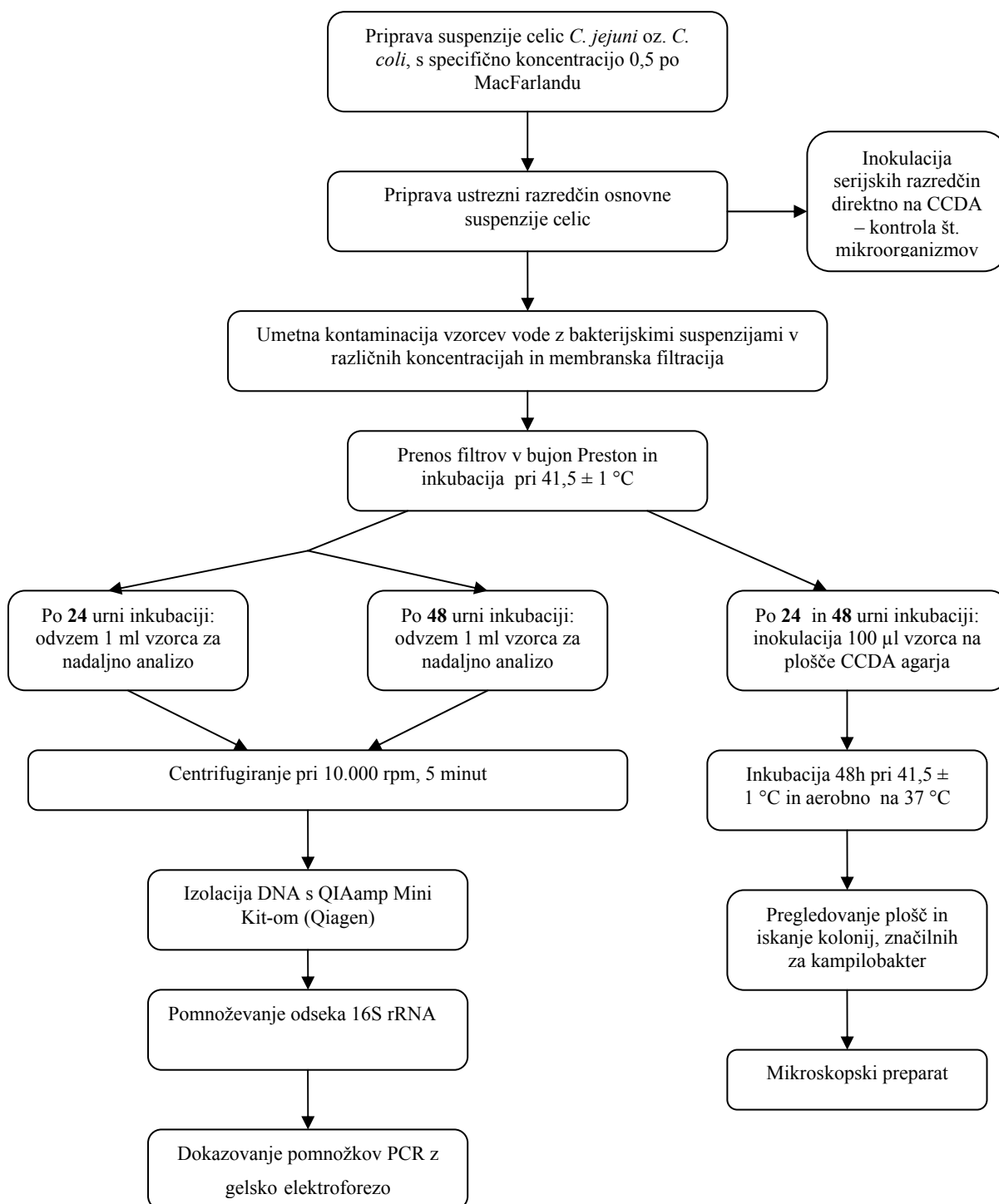
3.1.1.5 Dokazovanje pomnožkov PCR z gelsko elektroforezo

Prisotnost domnevno pomnožene DNA smo preverili na agaroznem gelu.

Pripravili smo 1 % agarozni gel v 0,5x pufri TBE.

Po elektroforezi smo gel oz. DNA barvali v destilirani vodi z etidijevim bromidom (10 minut), ter razbarvali v destilirani vodi (10 minut). Obarvane fragmente smo opazovali s pomočjo UV transluminatorja. Iskani fragmenti, ki smo jih preverjali s pomočjo vzporedno nanešenega molekulskega označevalca (100 bp ladder), so imeli dolžino 287 bp (pomnoževanje odseka 16S rRNA).

3.1.2 Določanje meje občutljivosti z umetno kontaminacijo površinske vode



Slika 6: Hodogram poteka eksperimenta določanja meje občutljivosti z umetno kontaminacijo površinske vode

Za ta poizkus smo uporabili tri različne vzorce (površinsko vodo iz Pekrskega potoka, površinsko vodo iz Drave – Limbuška laguna in namizno vodo znamke Spar), ki smo jih umetno kontaminirali s tremi različnimi koncentracijami bakterijskih suspenzij (10^2 , 10^1 in 10^0 CFU/ml). Tako smo določili spodnjo mejo občutljivosti standardne metode (ISO 17995) in molekularne metode.

3.1.2.1 Priprava suspenzije celic s specifično težo 0,5 po McFarlandu

Kontrolni sev *C. jejuni* ATCC 33291 oz. *C. coli*, ki je rasel na plošči s CCDA agarjem smo s pomočjo vatene palčke posneli s plošče in ga prenesli v epruveto s fiziološko raztopino. S pomočjo nefelometra (Densimat, bioMérieux) smo pripravili suspenzijo celic s specifično težo 0,5 po McFarlandu, ki ustreza koncentraciji 10^8 CFU/ml.

3.1.2.2 Priprava razredčin celic

Suspenzijo celic smo redčili do koncentracije 10 CFU/ml. Uporabili smo fiziološko raztopino. V 9 ml fiziološke raztopine smo s pomočjo vrtinčnika vmešali 1 ml suspenzije celic. Ta korak smo ponavljali tako dolgo, dokler ni bila dosežena koncentracija 10 CFU/ml. Za nadaljnje korake smo uporabili suspenzije celic s koncentracijami 10^2 , 10^1 in 10 CFU/ml.

Kot kontrolo števila mikroorganizmov v razredčinah smo serijske razredčine inokulirali tudi direktno na agar CCDA in plošče inkubirali v mikroaerofilni atmosferi, 48 ur pri $41,5 \pm 1$ °C.

3.1.2.3 Membranska filtracija

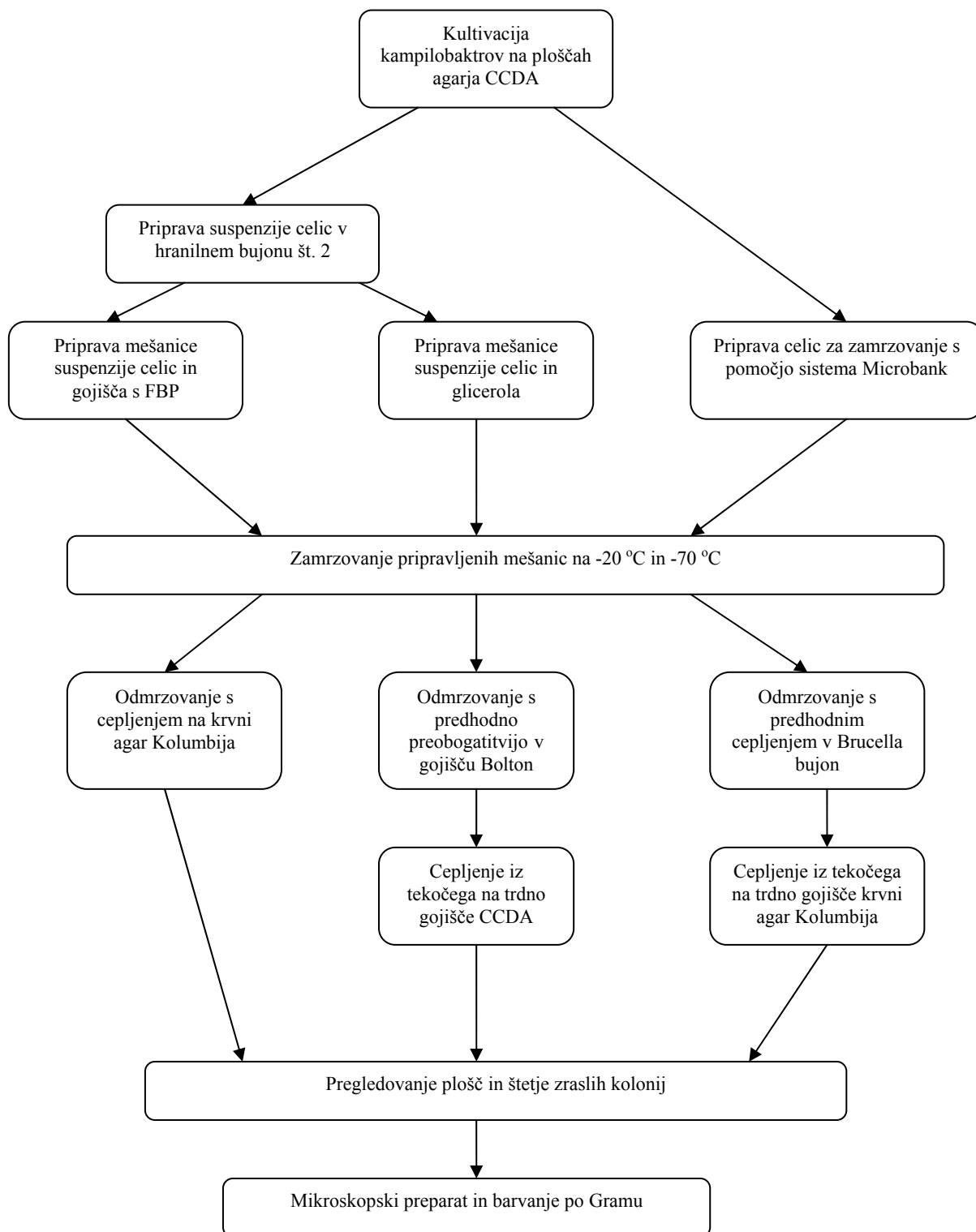
Pred začetkom dela smo si pripravili aparat za membransko filtracijo (odprli smo plin, nastavili steklenico za odpadno vodo in prižgali laminarij). Nastavke za filtre smo nato razkužili z etanolom in jih ožgali s plamenom. S pinceto smo sterilno nastavili filtre z 0,45 µm porami na nastavke in pritrdili lijake. V lijake smo vlili 100 ml vzorčne vode in dodali po 1 ml suspenzije celic (pred dodatkom smo suspenzijo premešali s pomočjo vrtinčnika). Prižgali smo aparat in počakali, da se voda prefiltrira. Filtre smo s sterilno pinceto prenesli v 100 ml bogatitvenega bujona Preston, ki smo si ga pripravili v sterilnih vrečkah. Vrečke smo zaprli v anaerobne lonce, dodali vrečke za vzpostavitev mikroaerofilne atmosfere in inkubirali 24 oz. 48 ur pri $41,5 \pm 1$ °C.

Tako smo dobili tri različne podlage, umetno kontaminirane z različnimi koncentracijami kampilobaktra. Kot kontrolo smo prefiltrirali tudi vzorce vode, katerih nismo umetno kontaminirali s *C. jejuni* ATCC 33291 oz. *C. coli* ATCC 43477.

3.1.2.4 Zaznavanje kampilobaktrov s klasično (ISO 17995:2005) in molekularno metodo (Lübeck in sod., 2006)

Po 24 oz. 48 urah smo odvzeli 1 ml vzorca iz bogatitvenega bujona Preston in ga obdelali po protokolu, ki je opisan v poglavju 3.2.1 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* v vodi z molekularnimi metodami. Hkrati smo odvzeli dvakrat po 100 μ l vzorca iz bogatitvenega bujona Preston in ga s stekleno palčko razmazali na dve plošči z agarjem CCDA. Plošče smo zaprli v anaerobne lonce, dodali vrečke za vzpostavitev mikroaerofilne atmosfere in inkubirali 48 ur pri $41,5 \pm 1$ °C. Po inkubaciji smo pregledali plošče in opazovali ali so zrasle kolonije, značilne za *C. jejuni* oz. *C. coli*. V kolikor smo takšno kolonijo opazili, smo naredili mikroskopski preparat in ga obarvali po Gramu ter mikroskopirali z imerzijo. Hkrati smo preverili še morebitno aerobno rast, in sicer tako, da smo eno ploščo inkubirali 48 ur na 37 °C v aerobnih pogojih. V kolikor po tem času nismo opazili rasti, smo izolat označili za *Campylobacter*.

3.1.3 Trajno shranjevanje izolatov termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter*



Slika 7: Hodogram poteka eksperimenta trajnega shranjevanja izolatov termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter*

3.1.3.1 Izolacija termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* iz perutnine (ISO 10272-1)

Zatehtali smo 10 g perutninskega mesa in ga dali v sterilno vrečko z 90 ml obogatitvenega gojišča Preston. Mešanico smo homogenizirali in jo inkubirali v anaerobnem loncu pri mikroaerobnih pogojih na 37 °C 4 do 6 ur, nato pa pri 41,5 °C 44 ± 4 ure.

Po končani inkubaciji smo kulturo, ki je zrasla v obogatitvenem mediju, nacepili na plošče agarja CCDA (100 µl vzorca smo na gojišče razmazali s stekleno palčko). Plošče smo inkubirali v anaerobnem loncu pri mikroaerobnih pogojih na 41,5 °C 44 ± 4 ure.

Po končani inkubaciji smo pregledali plošče. Opazovali smo ali so zrasle kolonije, ki so značilne za termotolerantne bakterije rodu *Campylobacter*. Kolonije morajo biti sive ali rjave barve, sploščene, vlažne, podobne kapljicam rose. Zrastejo lahko zelo drobne okrogle kolonije s kovinskim leskom. Drugi tip so večje kolonije, ki merijo v premeru od 2 do 3 mm, z nazobčanim robom. Lahko so sive s kovinskim sijajem ali pa rjavo-sivo svetleče. V kolikor smo na ploščah opazili takšne kolonije, smo jih precepili na gojišču CCDA in krvni agar Kolumbija. Plošče smo inkubirali v anaerobnem loncu pri mikroaerobnih pogojih na 41,5 °C 44 ± 4 ure.

Po končani inkubaciji smo naredili mikroskopske preparate kolonij, značilnih za *Campylobacter*, ter jih barvali po Gramu in pregledali z imerzijo.

Značilne kolonije smo tudi precepili na plošče krvnega agarja Kolumbija in jih inkubirali v anaerobnem loncu pri mikroaerobnih pogojih na 25 °C 44 ± 4 ure. Termotolerantne bakterije rodu *Campylobacter* ne rastejo na 25 °C.

Prav tako smo preverili aerobno rast. Značilne kolonije smo precepili na plošče krvnega agarja Kolumbija in jih inkubirali pri aerobnih pogojih na 41,5 °C 44 ± 4 ure. Termotolerantne bakterije rodu *Campylobacter* ne rastejo pri aerobnih razmerah.

Opravili smo tudi oksidazni test. S pomočjo plastične cepilne zanke smo zajeli dobro izolirano kolonijo, ter jo nanесли na filter papir, ki smo ga poprej namočili z oksidaznim reagentom. Če se po 10 s pojavi temno modra ali vijolična barva pomeni, da je reakcija pozitivna. Rezultate smo potrdili s pomočjo negativne (*Escherichia coli* NCTC 9001) in pozitivne (*Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662) kontrole. Pri termotolerantnih bakterijah rodu *Campylobacter* je oksidazni test pozitiven.

Ker smo hoteli določiti tudi vrsto bakterij rodu *Campylobacter*, smo opravili še tri teste, in sicer katalazni test, test občutljivosti na naldiksično kislino in cefalotin ter test hidrolize hipurata.

Za katalazni test potrebujemo raztopino vodikovega peroksida, ki jo kanemo na objektno steklice. S pomočjo plastične cepilne zanke smo zajeli kolonijo in jo pomešali z vodikovim peroksidom. Če so se v roku 30 s pojavili mehurčki smo test smatrali kot pozitiven. Rezultate smo potrdili s pomočjo negativne (*Enterococcus faecalis* NCTC 775) in pozitivne (*Staphylococcus aureus* NCTC 8532) kontrole.

Za določanje občutljivosti na nalidiksično kislino in cefalotin smo s cepilno zanko zajeli kolonijo ter jo mrežno cepili na CCDA agar. Na površino agarja smo postavili diska nalidiksične kisline ter cefalotina in inkubirali plošče v anaerobnem loncu pri mikroaerobnih pogojih na 41,5 °C 44 ± 4 ure. Kot rezistentne smo ocenili tiste seve, ki so rasli v kontaktu z diskom, kot občutljive pa tiste, pri katerih smo zaznali inhibicijsko cono kakršnekoli velikosti.

Za test hidrolize hipurata smo s pomočjo cepilne zanke zajeli kolonijo in jo nacepili v 0,4 ml raztopine natrijevega hipurata. Suspenzijo smo dobro premešali in inkubirali 2 uri v vodni kopeli na 37 °C. Po inkubaciji smo dodali 0,2 ml raztopine ninhidrina in dodatno inkubirali 10 minut na 37 °C. Kot pozitivno reakcijo štejemo temno vijolično barvo, ki se pojavi po končani inkubaciji. Rezultate smo potrdili s pomočjo pozitivne kontrole (*Campylobacter jejuni* ATCC 33291).

3.1.3.2 Zamrzovanje sevov, izoliranih iz perutnine

Kolonije sevov, ki smo jih identificirali kot termotolerantne bakterije rodu *Campylobacter* smo precepili na plošče agarja CCDA, da bi jih lahko trajno shranili s pomočjo zamrzovanja.

3.1.3.2.1 Zamrzovanje z glicerolom

Kolonije z dodatnih šestih plošč pa smo uporabili za pripravo suspenzije s specifično težo 3-4 po McFarlandu. S pomočjo vatene palčke smo kolonije posneli s plošče in jih prenesli v epruveto, v kateri smo si pripravili hranilni bujon št.2. S pomočjo nefelometra (Densimat, bioMérieux) smo pripravili suspenzijo celic s specifično koncentracijo 3-4 po McFarlandu, ki ustreza koncentraciji $\sim 10^9$ CFU/ml.

Volumen 850 μ l suspenzije celic smo s pomočjo vrtinčnika premešali s 150 μ l sterilnega glicerola in suspenzijo razdelili na šest alikvotov. Tri smo shranili pri temperaturi -20 °C, tri pa pri temperaturi -70 °C.

3.1.3.2.2 Zamrzovanje v bujonu FBP

FBP bujon je bil pripravljen kot je navedeno pod točko 3.1.2.2. V mikrocentrifirki smo zmešali 1 ml bujona FBP ter 125 μ l suspenzije celic s specifično koncentracijo 3-4 po McFarlandu, ki smo jo pripravili kot je navedeno pri točki 3.2.3.2.2 in suspenzijo razdelili na šest alikvotov. Tri smo shranili pri temperaturi -20 °C, tri pa pri temperaturi -70 °C.

3.1.3.2.3 Zamrzovanje s pomočjo seta Microbank

Kolonije s šestih plošč smo postrgali s pomočjo cepilne zanke, ter jih nacepili v epruvetke za zamrzovanje iz seta Microbank (Pro-lab diagnostic). Pripravili smo šest epruvetk ter tri shranili pri temperaturi -20 °C, tri pa pri temperaturi -70 °C.

3.1.3.3 Odmrzovanje sevov, izoliranih iz perutnine

Seve smo odmrzovali po enem, dveh in treh mesecih. Uporabili smo tri tehnike odmrzovanja: cepljenje direktno na trdno gojišče krvni agar Kolumbija, cepljenje v tekoče gojišče Brucella bujon in po inkubaciji na trdno gojišče krvni agar Kolumbija ter cepljenje v bogatitveno tekoče gojišče Bolton s precepljanjem na trdno gojišče CCDA (glej Sliko 6).

3.1.3.3.1 Odmrzovanje s cepljenjem na trdno gojišče krvni agar

Pripravili smo si šest plošč krvnega agarja Kolumbija za posamezen sev. Iz mikrocentrifugirk, v katerih smo zamrzovali seve s pomočjo glicerola in iz tistih, v katerih smo zamrzovali v FBP mediju, smo odpipetirali 100 μ l suspenzije ter jo nacepili na plošče s krvnim agarjem Kolumbija. Suspenzijo smo razmazali s pomočjo steklene palčke. Iz epruvetk Microbank pa smo odvzeli po eno kroglico ter jo podrgnili ob agar v vzorcu mreže. Plošče smo inkubirali v anaerobnih loncih pri mikroaerobnih pogojih na $41,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 44 ± 4 ure.

3.1.3.3.2 Odmrzovanje s cepljenjem v obogatitveno tekoče gojišče Bolton

Za vsak sev smo pripravili šest epruvet s po 4 ml obogatitvenega gojišča Bolton. Iz mikrocentrifugirk, v katerih smo zamrzovali seve s pomočjo glicerola in iz tistih v katerih smo zamrzovali v FBP mediju, smo odpipetirali 100 μ l suspenzije ter jo nacepili v tekoče gojišče in premešali s pomočjo vrtinčnika. Iz Microbank epruvetk pa smo odvzeli po eno kroglico ter jo dali v tekoče gojišče. Epruvete smo inkubirali v anaerobnih loncih pri mikroaerobnih pogojih na $41,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 44 ± 4 ure.

3.1.3.3.3 Odmrzovanje s cepljenjem v tekoče gojišče Brucella bujon

Pripravili smo si šest epruvet s 4 ml Brucella bujona za posamezen sev. Iz mikrocentrifugirk v katerih smo zamrzovali seve s pomočjo glicerola in iz tistih, v katerih smo zamrzovali v FBP mediju, smo odpipetirali 100 μ l suspenzije ter jo nacepili v tekoče gojišče in premešali s pomočjo vrtinčnika. Iz Microbank epruvetk pa smo odvzeli po eno kroglico ter jo dali v tekoče gojišče. Epruvete smo inkubirali v anaerobnih loncih pri mikroaerobnih pogojih na $41,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 44 ± 4 ure.

Po inkubaciji smo si pripravili šest plošč agarja CCDA za posamezen sev. Iz epruvet smo po predhodnem mešanju odpipetirali 100 μ l suspenzije ter jo nacepili na plošče z agarjem CCDA. Suspenzijo smo razmazali s pomočjo steklene palčke. Plošče smo inkubirali v anaerobnih loncih pri mikroaerobnih pogojih na $41,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 44 ± 4 ure.

3.1.3.4 Pregledovanje plošč in barvanje po Gramu

Na ploščah krvnega agarja Kolumbija smo iskali majhne kolonije (1 mm v premeru), prozorne do blede rožnate barve, svetleče, s tendenco širjenja, gojišče pod njimi pa je moralo biti rdeče.

Na ploščah agarja CCDA pa smo iskali kolonije sive ali rjave barve, sploščene, vlažne, podobne kapljicam rose. Lahko so zelo drobne okrogle kolonije s kovinskim leskom ali pa večje kolonije, ki merijo v premeru od 2 do 3 mm, z nazobčanim robom.

V kolikor smo opazili takšne kolonije, smo naredili mikroskopski preparat in ga barvali po Gramu. Mikroskopirali smo z imerzijo in iskali drobne, po Gramu negativne, ukrivljene paličaste bakterije, s spiralno ali S obliko. Na podlagi štetja kolonij na ploščah in potrditve s preparatom, barvanim po Gramu, smo ocenili uspešnost odmrzovanja.

3.2 MATERIALI

Pri raziskovalnem delu smo uporabili biološki in potrošni material ter laboratorijsko opremo Oddelka za mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor.

3.2.1 Mikroorganizmi

Delovni mikroorganizmi so bili izolirani iz vzorcev perutnine (glej poglavje Tehnike shranjevanja termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter*) in površinskih vod (glej poglavji Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* v vodi s pomočjo molekularnih metod in Umetna kontaminacija vzorcev površinske vode za določanje meje občutljivosti). V času opravljanja diplomske naloge so bili obdelani v rutinskem laboratoriju Oddelka za sanitarno mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. Kot pozitivno kontrolo smo uporabljali referenčna seva *C. jejuni* ATCC 33291 in *C. coli* ATCC 43477.

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

3.2.2.1 Hranilni bujon št. 2 (Oxoid, CM 0067)

Preglednica 1: Sestava osnovnega medija hranilni bujon št. 2 (Oxoid)

Sestavine	Količina (g/l)
Mesni ekstrakt	10,0
Pepton	10,0
Natrijev klorid	5,0
Agar	1,0

3.2.2.2 Bujon FBP

Sestavine:

- Hranilni bujon št. 2 (Oxoid)
- 0,12 % [w/v] bakteriološkega agarja
- 15 % [v/v] glicerola
- 0,1 % kvasnega ekstrakta
- FBP (*Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, SR232E))

Preglednica 2 : Sestava dodatka za rast *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, SR232E) - FBP

Sestavine	Količina (mg/l)
Natrijev piruvat	250,0
Natrijev metabisulfat	250,0
Železov sulfat	250,0

3.2.2.3 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Preston

Sestavine:

- 12,5 g osnovnega hranilnega bujona št. 2 (Oxoid)
- 25 ml defibrilirane konjske krvi (Oxoid, SR048C)
- 1 steklenička dodatka za rast *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid)
- 1 steklenička dodatka za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid)

Preglednica 3: Sestava dodatka za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid SR069E)

Sestavine	Količina
Plimiksin B	5000 I.U. /l
Rifampicin	10,0 mg/l
Trimetoprim	10,0 mg/l
Amfotericin	10,0 mg/l

3.2.2.4 Tekoče selektivno obogatitveno gojišče Bolton

Sestava:

- Osnovni medij za gojišče Bolton (Oxoid CM0983)
- Dodatek za selektivnost Bolton Broth Selective Supplement (Oxoid SR0183)
- Defibrilirana konjska kri (Oxoid SR0048)

Preglednica 4: Sestava osnovnega medija za gojišče Bolton (Oxoid CM0983)

Sestavine	Količina (g/l)
Mesni pepton	10,0
Laktalbumin hidrolizat	5,0
Kvasni ekstrakt	5,0
Natrijev klorid	5,0
Alfa-ketoglutarat	1,0
Natrijev piruvat	0,5
Natrijev metabisulfat	0,5
Natrijev karbonat	0,6
Hemin	0,01
pH 7.4 ± 0.2	

Preglednica 5: Sestava dodatka za selektivnost Bolton Broth Selective Supplement (Oxoid SR0183)

Sestavine	Količina (mg/l)
Cefoperazon	20,0
Vankomicin	20,0
Trimetoprim	20,0
Cikloheksimid	50,0

3.2.2.5 Agar CCDA

Sestava:

- Osnovni medij CCDA (Oxoid CM0739)
- Destilirana voda
- Dodatek za selektivnost CCDA Selective Supplement (Oxoid SR0155)

Preglednica 6: Sestava osnovnega medija CCDA (Oxoid CM0739)

Sestavine	Količina (g/l)
Nutrient Broth No.2	25,0
Aktivno oglje	4,0
Kazein hidrolizat	3,0
Natrijev dezoksikolat	1,0
Železov sulfat	0,25
Natrijev piruvat	0,25
Agar	12,0
pH 7.4 ± 0.2	

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

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

3.2.2.6 Krvni agar Kolumbija

Sestavine:

- Osnovni medij Columbia Agar Base (Oxoid, CM 331)
- Destilirana voda
- Sterilna defibrilirana goveja kri
- Dodatek za rast *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid, SR 232E)
- Dodatek za selektivnost *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid, SR069E)

Preglednica 8: Sestava osnovnega medija za krvni agar Kolumbija

Sestavine	Količina (g/l)
Pepton	23,0
Škrob	1,0
Natrijev klorid	5
Agar	8,0-18,0

Preglednica 9: Sestava dodatka za selektivnost Campylobacter Selective Supplement (Oxoid, SR069E)

Sestavine	Količina
Vankomicin	10 mg/l
Polimiksin B	2500 I.U. /l
Trimetoprim	5 mg/l

3.2.2.7 Brucella bujon

Preglednica 10: Sestava Brucella bujona

Sestavine	Količina (g/l)
Trypton	10,0
Mesni peptični pepton	10,0
Glukoza	1,0
Kvasni ekstrakt	2,0
Natrijev klorid	5,0
Natrijev hidrogen sulfit	0,1

3.2.3 Reagenti in raztopine

3.2.3.1 Reagenti za izolacijo DNA s pomočjo QIAamp Mini Kit-a (Qiagen).

- Pufer ATL
- Proteinaza K
- Pufer AL
- Etanol (96 – 100 %)
- Pufer AW1
- Pufer AW2
- PCR H₂O

3.2.3.2 Reagenti za pripravo mešanice PCR

- 16 S PCR s Taq polimerazo
 - PCR H₂O
 - 10 x PCR pufer z Mg
 - MgCl₂
 - dNTPs
 - BSA 10 mg/ml (Biolabs)
 - Specifična začetna oligonukleotida za bakterije rodu *Campylobacter* (Luebeck in sod., 2003):
 - OT1559: 5' – CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GG – 3'
 - 18-1 : 5' – TTC CTT AGG TAC CGT CAG AA – 3'
 - Taq polimeraza
-

- Mnogokratna PCR
 - PCR H₂O
 - 10 x PCR pufer z Mg
 - MgCl₂
 - dNTPs
 - Tween 60
 - Specifični začetni oligonukleotidi za bakterije vrste *Campylobacter jejuni* (Linton in sod., 1997):
 - JEJ3.3: 5' – GAA GAG GGT TTG GGT GGT G – 3'
 - JEJ 4.4: 5' – AGC TAG CTT CGC ATA ATA ACT TG – 3'
 - Specifični začetni oligonukleotidi za bakterije vrste *Campylobacter coli* (Linton in sod., 1997):
 - COL3.3: 5' – GGT ATG ATT TCT ACA AAG CGA G – 3'
 - COL4.4: 5' – ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG – 3'
 - Taq polimeraza

3.2.3.3 Elektroforeza

- Agaroz (Sigma)
- 0,5x pufer TBE
- 100 bp molekularni označevalec dolžin fragmentov (Biolab)
- Nanašalni pufer
- Etidijev bromid (0,5 µg/µl v destilirani vodi)
- Destilirana voda

- Agarozni gel (1 %)

Priprava:

- 0,8 g agaroze
- 80 ml 0,5x pufera TBE

Sestavini premešamo in raztopimo agarozo v mikrovalovni pečici. Agarozo nato ohladimo na ~50 °C ter jo zlijemo v prej pripravljen model za razlivanje gela.

- 5 x pufer TBE

Priprava:

- 45g Tris baze
- 24,5 g Barijeve kisline
- 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
- Destilirana voda do 1000 ml

Sestavine premešamo in steriliziramo z avtoklaviranjem 15 minut pri 121 °C. Za elektroforezo uporabljamo 0,5 x pufer TBE.

- Nanašalni pufer

Priprava:

- 0,25 % bromfenol modro
 - 40 % saharoza v H₂O
 - 100 bp molekularni označevalec
-

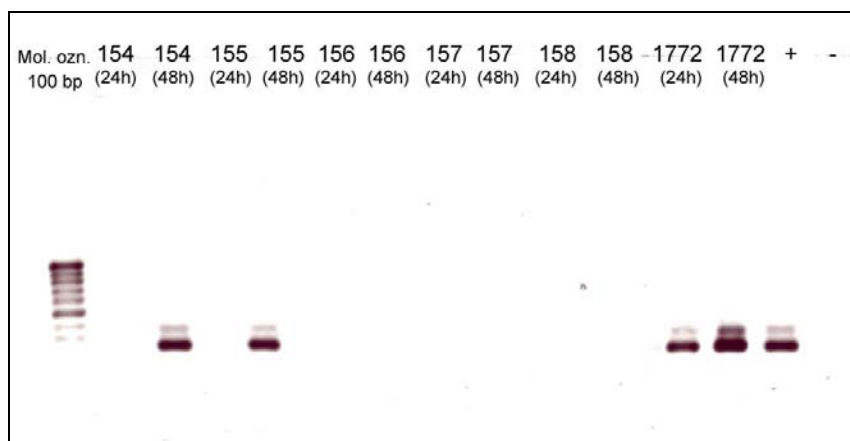
4 REZULTATI

Eksperimentalni del naloge je bil opravljen v obdobju od avgusta 2006 do maja 2007. Delo je potekalo v Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo in Laboratoriju za raziskovalno dejavnost Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor. V skladu s cilji naloge smo preverili primernost molekularnih metod odkrivanja termotolerantnih kampilobaktrov za uporabo v rutinskem laboratoriju, določili mejo občutljivosti le-te in jo primerjali z mejo občutljivosti klasične mikrobiološke metode po mednarodnem ISO standardu 17995. Hkrati pa smo izmed treh metod zamrzovanja izbrali tisto, ki je najprimernejša za uporabo v rutinskem laboratoriju.

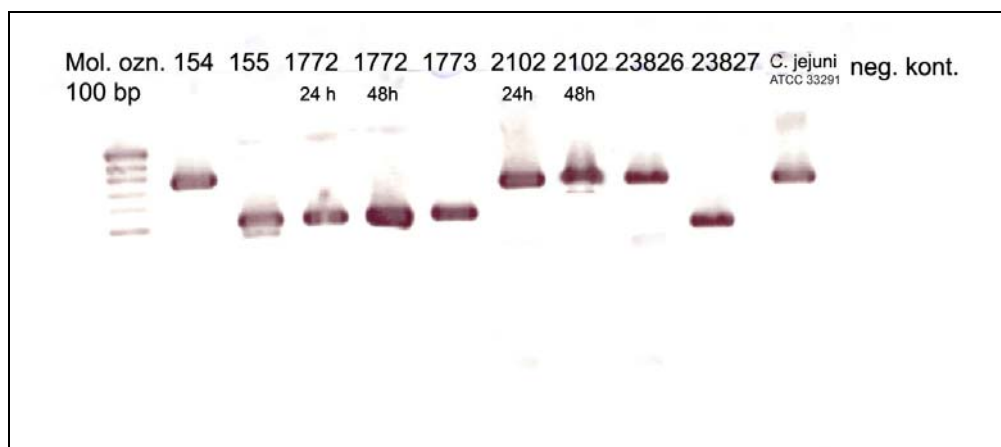
4.1 ODKRIVANJE PRISOTNOSTI TERMOTOLERANTNIH BAKTERIJ RODU *Campylobacter* V VODI Z MOLEKULARNIMI METODAMI

Za odkrivanje prisotnosti termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo (PCR), pri čemer smo pomnoževali 287 bp dolg odsek 16S rRNA, značilen za termotolerantne kampilobakte. Uporabili smo začetna oligonukleotida OT-1559 in 18-1 (Lübeck in sod., 2003). Vzorce, pri katerih smo s pomočjo pomnoževanja odseka 16S rRNA dokazali prisotnost bakterij rodu *Campylobacter*, smo testirali še s pomočjo mnogokratne PCR, ki loči med prisotnostjo vrst *C. jejuni* oz. *C. coli*. Pomnoževali smo fragment gena *hipO* *C. jejuni* (735 bp) oziroma fragment gena *aspA* *C. coli* (500bp) (Linton in sod., 1997; Zorman in Smole Možina, 2002).

Obdelali smo 22 vzorcev površinskih vod, ki so v laboratorij za sanitarno mikrobiologijo prispeli v roku dveh mesecev (oktober in november 2006), in sicer po 24 in 48 urni inkubaciji v bujonu Preston. Rezultate, pridobljene z molekularnimi metodami, smo primerjali z rezultati, ki so jih v laboratoriju Oddelka za sanitarno mikrobiologijo Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor pridobili po klasični, horizontalni metodi določanja kampilobaktrov v vodi (ISO 17995). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili referenčni sev *C. jejuni* ATCC 33291, negativna kontrolo pa je predstavljala mešanica PCR brez dodane DNA.



Slika 8: Primer gelske elektroforeze pomnožkov odseka 16S rRNA šestih različnih vzorcev vod po 24 in 48 urni inkubaciji v bujonu Preston (vzorci številka 154, 155, 156, 157, 158 in 1772) ter pozitivne (*C. jejuni* ATCC 33291) in negativne (PCR mešanica brez dodane DNA) kontrole. Na sliki je viden primer negativnega rezultata po 24-urni (154, 155, 156, 157, 158) in 48-urni inkubaciji (156, 157, 158), primer pozitivnega rezultata po 24-urni (1772) in 48-urni (154, 155, 1772) inkubaciji.



Slika 9: Gelska elektroforeza mnogokratne PCR, uporabne za razlikovanje med *C. jejuni* in *C. coli*. V poštev so prišli vzorci, pri katerih smo s pomnoževanjem odseka 16S rRNA ugotovili prisotnost bakterij rodu *Campylobacter* (številke 154, 155, 1773, 23826 in 23827 po 48 urni inkubaciji ter 1772 in 2101 po 24 in 48 urni inkubaciji).

Rezultati, pridobljeni z molekularno metodo, se niso bistveno razlikovali od rezultatov, pridobljenih s klasično metodo določanja termotolerantnih kampilobaktrov. Po 48-urni inkubaciji v bujonu Preston smo tako s klasično kot tudi z molekularno metodo določili prisotnost bakterij iz rodu *Campylobacter* v sedmih vzorcih izmed dvaindvajsetih obdelanih. V štirih vzorcih smo določili prisotnost bakterij vrste *C. coli*, v treh pa prisotnost bakterij vrste *C. jejuni*. Po 24-urni inkubaciji pa je prišlo do razlik v občuljivosti metode. S klasično metodo nam po 24-urni inkubaciji ni uspelo določiti prisotnosti termotolerantnih kampilobaktrov v nobenem primeru, medtem ko nam je s pomočjo molekularnih metod to uspelo pri dveh vzorcih. V enem izmed vzorcev smo določili prisotnost *C. jejuni*, v drugem pa *C. coli*. Rezultate prikazuje preglednica 16.

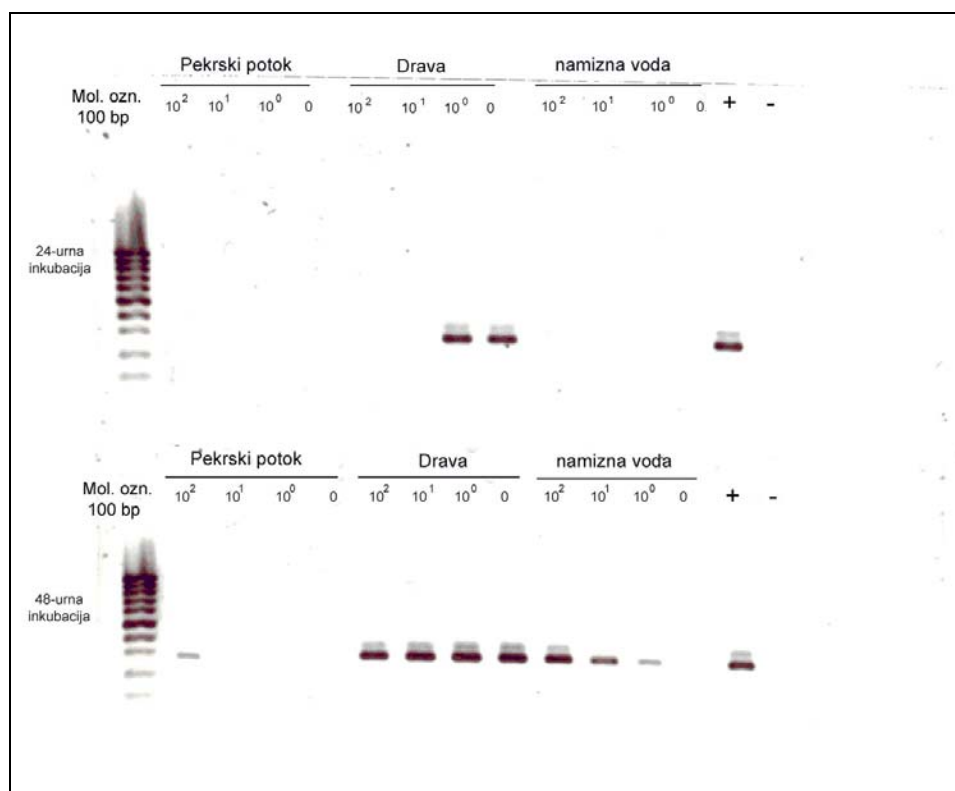
Preglednica 16: Rezultati preiskave vzorcev vode, pridobljeni s klasično metodo po mednarodnem standardu ISO 17995 in molekularnima metodama (pomnoževanje odseka 16S rRNA in mnogokratna PCR).

Vzorčna številka	Čas inkubacije (ure)	Rezultati pridobljeni po klasični metodi	Rezultati pridobljeni z molekularnima metodama
110	24	-	-
	48	-	-
111	24	-	-
	48	-	-
112	24	-	-
	48	-	-
113	24	-	-
	48	-	-
1134	24	-	-
	48	-	-
153	24	-	-
	48	-	-
154	24	-	-
	48	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
155	24	-	-
	48	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>
156	24	-	-
	48	-	-
157	24	-	-
	48	-	-
158	24	-	-
	48	-	-
1772	24	-	<i>C. coli</i>
	48	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>
1773	24	-	-
	48	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>
2101	24	-	-
	48	-	-
2102	24	-	<i>C. jejuni</i>
	48	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
1580	24	-	-
	48	-	-
1582	24	-	-
	48	-	-
1584	24	-	-
	48	-	-
1586	24	-	-
	48	-	-
2770	24	-	-
	48	-	-
23826	24	-	-
	48	<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>
23827	24	-	-
	48	<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>

4.2 UMETNA KONTAMINACIJA VZORCEV POVRŠINSKE VODE ZA DOLOČANJE MEJE OBČUTLJIVOSTI

Za ta poizkus smo uporabili tri različne podlage (površinsko vodo iz Pekrskega potoka, površinsko vodo iz Drave – Limbuška laguna in namizno vodo znamke Spar), ki smo jih umetno kontaminirali s tremi različnimi koncentracijami bakterijskih suspenzij (10^2 , 10^1 in 10^0 CFU/ml). Tako smo določili spodnjo mejo občutljivosti standardne metode (ISO 17995) in molekularne metode (pomnoževanje odseka 16S rRNA). Poizkus smo opravili v dveh ponovitvah. Vzorci za umetno kontaminacijo s *C. jejuni* so bili odvzeti decembra 2006, vzorci za umetno kontaminacijo s *C. coli* pa aprila 2007.

4.2.1 Umetna kontaminacija vzorcev vode s sevom *C. jejuni* ATCC 33291

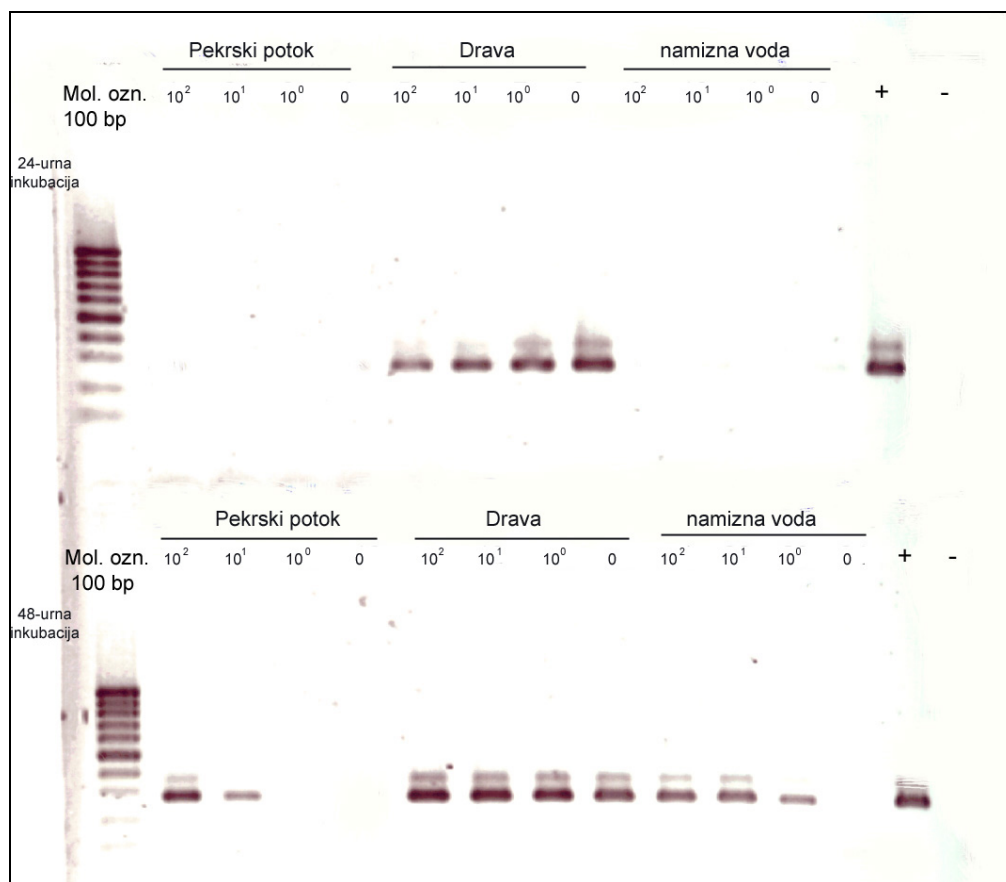


Slika 10: Gelska elektroforeza prve ponovitve poizkusa določitve meje občutljivosti po umetni kontaminaciji s *C. jejuni* ATCC 33291.

Preglednica 17: Primerjava rezultatov klasične (ISO 17995) in molekularne metode prve ponovitve poskusa določanja meje občutljivosti po umetni kontaminaciji vzorcev vode s *C. jejuni* ATCC 33291 (slika 10).

Vzorec vode	Koncentracija susp. za umetno kontaminacijo	Čas inkubacije	Detekcija prisotnosti s klasično metodo - prisoten <i>Campylobacter</i>	Detekcija prisotnosti z molekularno metodo - prisoten <i>Campylobacter</i>
			DA/NE	DA/NE
Pekrski potok	10²	24h	NE	NE
		48h	DA	DA
	10¹	24h	NE	NE
		48h	NE	DA
	10⁰	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	nekontaminirano	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
Drava - Limbuška laguna	10²	24h	NE	DA
		48h	DA	DA
	10¹	24h	NE	DA
		48h	DA	DA
	10⁰	24h	DA	DA
		48h	DA	DA
	nekontaminirano	24h	DA	DA
		48h	DA	DA
namizna voda Spar	10²	24h	NE	NE
		48h	DA	DA
	10¹	24h	NE	NE
		48h	DA	DA
	10⁰	24h	NE	NE
		48h	DA	DA
	nekontaminirano	24h	NE	NE
		48h	NE	NE

V prvi ponovitvi poskusa določitve meje občutljivosti po umetni kontaminaciji vzorcev s *C. jejuni* ACTT 33291 smo tako s klasično, kot tudi z molekularno metodo določili najnižjo mejo občutljivosti, ko smo umetno kontaminirali namizno vodo Spar. Spodnja meja občutljivosti je znašala 10⁰ CFU/ml. V vzorcu Pekrskega potoka smo s klasično metodo določili mejo občutljivosti 10² CFU/ml, z molekularno metodo pa 10¹ CFU/ml. V vzorcu Drave smo z obema metodama določili prisotnost kampilobaktrov v vzorcu, ki ga nismo umetno kontaminirali z referenčnim sevom *C. jejuni*, kar kaže na prisotnost kampilobaktrov v naravnem ekosistemu reke Drave. Z molekularno metodo smo v vzorcih Drave določili prisotnost dednine kampilobaktrov tudi v vseh ostalih vzorcih (po 24 in 48 urni inkubaciji), s klasično metodo pa nam to ni uspelo. Dednine kampilobaktrov nismo zaznali v vzorcih, umetno kontaminiranih z 10² in 10¹ CFU/ml, in sicer po 24 urni inkubaciji.



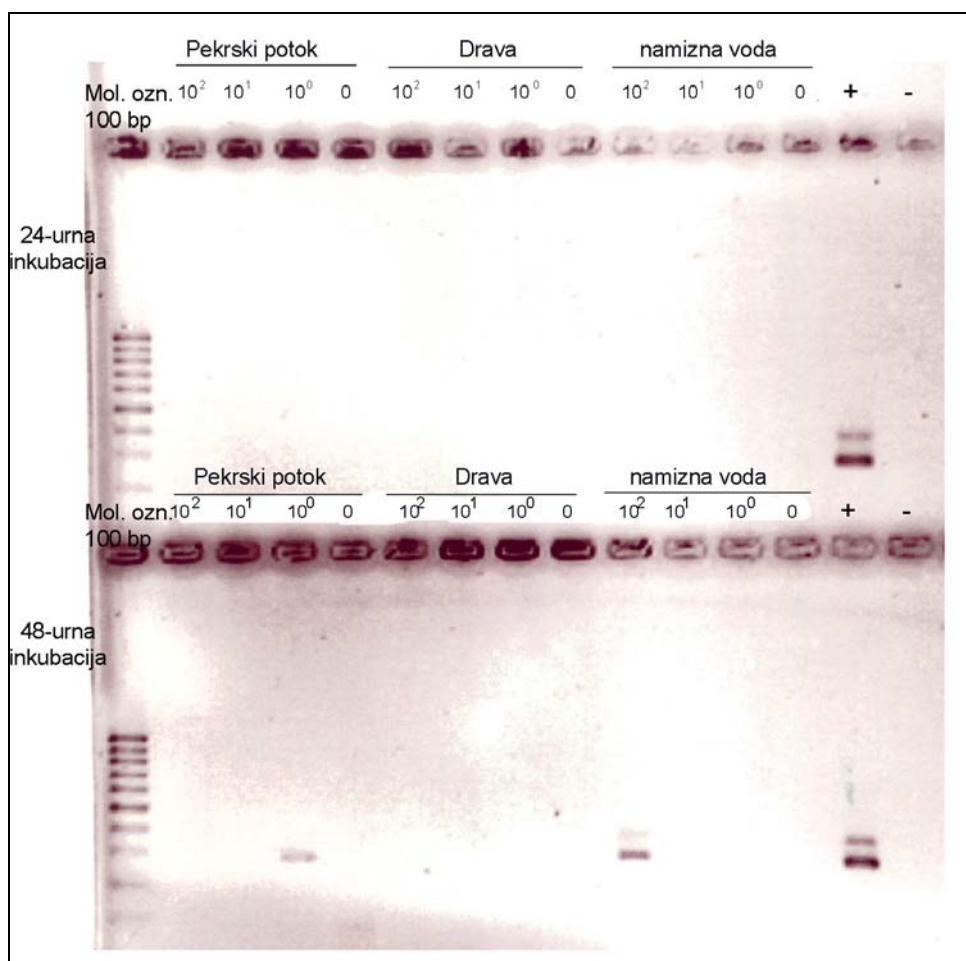
Slika 11: Gelska elektroforeza druge ponovitve poizkusa določitve meje občutljivosti po umetni kontaminaciji s *C. jejuni* ATCC 33291.

Preglednica 18: Primerjava rezultatov klasične (ISO 17995) in molekularne metode druge ponovitve poskusa določanja meje občutljivosti po umetni kontaminaciji vzorcev vode s *C. jejuni* ATCC 33291 (slika 11).

Vzorec	Koncentracija susp. za umetno kontaminacijo	Čas inkubacije	Detekcija prisotnosti s klasično metodo - prisoten <i>Campylobacter</i> DA/NE	Detekcija prisotnosti z molekularno metodo - prisoten <i>Campylobacter</i> DA/NE
Pekrski potok	10²	24h	NE	NE
		48h	DA	DA
	10¹	24h	NE	NE
		48h	NE	DA
	10⁰	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	nekontaminirano	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
Drava - Limbuška laguna	10²	24h	DA	DA
		48h	DA	DA
	10¹	24h	DA	DA
		48h	DA	DA
	10⁰	24h	DA	DA
		48h	DA	DA
	nekontaminirano	24h	DA	DA
		48h	DA	DA
namizna voda Spar	10²	24h	NE	NE
		48h	DA	DA
	10¹	24h	NE	NE
		48h	DA	DA
	10⁰	24h	NE	NE
		48h	DA	DA
	nekontaminirano	24h	NE	NE
		48h	NE	NE

V drugi ponovitvi poskusa določitve meje občutljivosti po umetni kontaminaciji vzorcev s *C. jejuni* ACTT 33291 smo dobili enake rezultate kot v prvi ponovitvi, le da smo v drugi ponovitvi z obema metodama zaznali prisotnost kampilobaktrov v vseh vzorcih vode odvzete iz Drave. V vseh vzorcih smo uspeli z obema metodama in v obeh ponovitvah določiti prisotnost kampilobaktrov šele po 48-urni inkubaciji. V primeru Pekrskega potoka se je meja občutljivosti razlikovala. S pomočjo molekularne metode smo namreč zaznali prisotnost dednine kampilobaktrov tudi v vzorcu, umetno kontaminiranem z 10¹ CFU/ml bakterij, s pomočjo klasične metode pa smo kampilobaktre zaznali le v vzorcu, umetno kontaminiranem z 10² CFU/ml bakterij. V vzorcu namizne vode, kjer ni prisotne kompetitivne flore, pa smo z obema metodama določili mejo občutljivosti 10⁰ CFU/ml.

4.2.2 Umetna kontaminacija vzrocev vode s sevom *C. coli* ATCC 43477

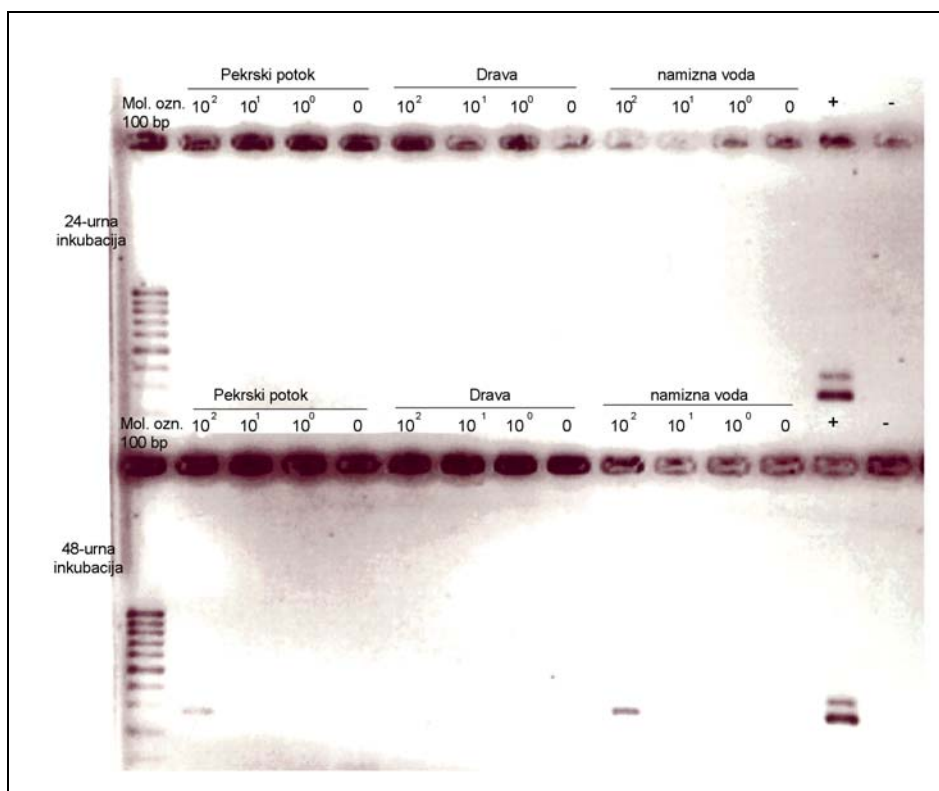


Slika 12: Gelska elektroforeza prve ponovitve poizkusa določitve meje občutljivosti po umetni kontaminaciji s *C. coli* ATCC 43477.

Preglednica 19: Primerjava rezultatov klasične (ISO 17995) in molekularne metode prve ponovitve poskusa določanja meje občutljivosti po umetni kontaminaciji vzorcev vode s *C. coli* ATCC 43477 (slika 12).

Vzorec	Koncentracija susp. za umetno kontaminacijo	Čas inkubacije	Detekcija prisotnosti s klasično metodo - prisoten <i>Campylobacter</i>	Detekcija prisotnosti z molekularno metodo - prisoten <i>Campylobacter</i>
			DA/NE	DA/NE
Pekrski potok	10^2	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	10^1	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	10^0	24h	NE	NE
		48h	NE	DA
	nekontaminirano	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
Drava - Limbuška laguna	10^2	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	10^1	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	10^0	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	nekontaminirano	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
namizna voda Spar	10^2	24h	NE	NE
		48h	DA	DA
	10^1	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	10^0	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	nekontaminirano	24h	NE	NE
		48h	NE	NE

V prvi ponovitvi poskusa določitve meje občutljivosti po umetni kontaminaciji vzorcev s *C. coli* ATCC 43477 smo zaznali prisotnost kampilobaktrov le v treh vzorcih. V vzorcu namizne vode Spar smo tako s klasično, kot tudi z molekularno metodo zaznali prisotnost kampilobaktrov v vzorcu, umetno kontaminiranem z 10^2 CFU/ml, in sicer po 48 urni inkubaciji. V vzorcu Pekrskega potoka smo, prav tako po 48 urni inkubaciji, z molekularno metodo zaznali prisotnost dednine kampilobaktrov v vzorcu, umetno kontaminiranem z 10^0 CFU/ml, medtem ko v vzorcih, kontaminiranih z večjo koncentracijo dednine kampilobaktrov, nismo zaznali. V vzorcih Drave nismo zaznali prisotnosti kampilobaktrov.



Slika 13: Gelska elektroforeza druge ponovitve poizkusa določitve meje občutljivosti po umetni kontaminaciji s *C. coli* ATCC 43477

Preglednica 20: Primerjava rezultatov klasične (ISO 17995) in molekularne metode druge ponovitve poskusa določanja meje občutljivosti po umetni kontaminaciji vzorcev vode s *C. coli* ATCC 43477 (slika 13).

Vzorec	Koncentracija susp. za umetno kontaminacijo	Čas inkubacije	Detekcija prisotnosti s klasično metodo - prisoten <i>Campylobacter</i> DA/NE	Detekcija prisotnosti z molekularno metodo - prisoten <i>Campylobacter</i> DA/NE
Pekrski potok	10^2	24h	NE	NE
		48h	NE	DA
	10^1	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	10^0	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	nekontaminirano	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
Drava - Limbuška laguna	10^2	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	10^1	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	10^0	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	nekontaminirano	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
namizna voda Spar	10^2	24h	NE	NE
		48h	NE	DA
	10^1	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	10^0	24h	NE	NE
		48h	NE	NE
	nekontaminirano	24h	NE	NE
		48h	NE	NE

V drugi ponovitvi poskusa določitve meje občutljivosti po umetni kontaminaciji vzorcev s *C. coli* ACTT 43477 smo zaznali prisotnost kampilobaktrov le z molekularno metodo, in sicer v dveh vzorcih. V vzorcu namizne vode Spar in v vzorcu Pekrskega potoka smo z molekularno metodo zaznali prisotnost dednine kampilobaktrov v vzorcu, umetno kontaminiranem z 10^2 CFU/ml, in sicer po 48 urni inkubaciji. V ostalih vzorcih nismo zaznali prisotnosti dednine kampilobaktrov. Odsotnost kampilobaktrov v vzorcih Drave bi lahko bila posledica letnega časa, saj smo vzorce za umetno kontaminacijo z referenčnim sevom *C. jejuni* odvzeli jeseni, vzorce za umetno kontaminacijo z referenčnim sevom *C. coli* pa spomladi. Do negativnih rezultatov pri umetno kontaminiranih vzorcih bi lahko prišlo zaradi večje občutljivosti *C. coli* na okoljske dejavnike, saj metoda, ki smo jo uporabili, vključuje mešanje na vrtničniku, kar znatno poveča nasičenost gojišča s kisikom.

4.3 TRAJNO SHRANJEVANJE IZOLATOV TERMOTOLERANTNIH BAKTERIJ RODU *Campylobacter*

Za trajno shranjevanje smo uporabili šest izolatov bakterij iz rodu *Campylobacter*. Od tega so bili štiri izolirani iz perutnine v sklopu rutinskega delovanja Laboratorija za sanitarno mikrobiologijo, dva izolata pa sta bila referenčna seva (*Campylobacter jejuni* ATCC 33291 in *Campylobacter coli* ATCC 43477).

Preglednica 13: Rezultati identifikacije izolatov, pridobljenih iz perutninskega mesa; v preglednico so vneseni rezultati oksidaznega, katalaznega testa in testa razgradnje hipurata (+ označuje pozitivno reakcijo, - pa negativno reakcijo) ter podatki o občutljivosti (S) ali odpornosti (R) izolatov na antibiotika.

Št. vzorca	Preparat po Gramu	Aerobna rast	Oksidaza	Katalaza	Hipurat	Nalidiksična kislina	Cefalotin
1670	G-, vibriji	-	+	-	-	S	R
1732	G-, vibriji	-	+	+	-	R	R
1735	G-, vibriji	-	+	-	+	S	R
1827	G-, vibriji	-	+	-	-	R	R
<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	G-, vibriji	-	+	-	+	S	R
<i>C. coli</i> ATCC 43477	G-, vibriji	-	+	-	-	S	R

Glede na dobljene rezultate smo poskušali identificirati izolate do vrste. Vzorec številka 1670 smo identificirali kot *C. coli*, vzorec št 1735 smo identificirali kot *C. jejuni*. Vzorca št. 1732 in 1827 bi lahko zaradi rezistence proti nalidiksični kislini identificirali kot *C. lari*, vendar rezultati niso zanesljivi zaradi obstoja fenotipsko netipičnih sevov (proti nalidiksični kislini odporni sevi *C. coli*). Za natančno določitev vrste bi bila potrebna potrditev z molekularno metodo (npr. mnogokratno PCR), ki pa je nismo izvedli.

Preglednica 15: Vpliv postopkov zamrzovanja pri temperaturi $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ na rast odmrznjenih izolatov. Kadar smo na plošči našteali do 20 kolonij smo zapisali +, od 20 do 100 kolonij ++ in nad 100 kolonij +++.

Št. vzorca	Datum odmrzovanja	23.8.2006			19.9.2006			17.10.2006		
		FBP	Glicerol	Microbank	FBP	Glicerol	Microbank	FBP	Glicerol	Microbank
	Gojišče - zamrzovanje odmrzovanje/									
1670	Krvni agar Kolumbija (direktno)	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	++
	Bolton -> CCDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Brucella -> Krvni agar Kolumbija	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1732	Krvni agar Kolumbija (direktno)	+++	+++	+	++	+++	+	+++	+++	+
	Bolton -> CCDA	+	-	-	+++	-	-	+++	+++	-
	Brucella -> Krvni agar Kolumbija	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
1735	Krvni agar Kolumbija (direktno)	++	++	/	++	-	/	+++	-	/
	Bolton -> CCDA	-	+	/	-	-	/	+	-	/
	Brucella -> Krvni agar Kolumbija	-	-	/	-	-	/	-	-	/
1827	Krvni agar Kolumbija (direktno)	++	+++	+	-	+++	+	-	++	+
	Bolton -> CCDA	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	Brucella -> Krvni agar Kolumbija	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	Krvni agar Kolumbija (direktno)	++	+++	+	++	-	+	++	-	+
	Bolton -> CCDA	-	-	-	-	+++	-	+++	+++	+++
	Brucella -> Krvni agar Kolumbija	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
<i>C. coli</i> ATCC 43477	Krvni agar Kolumbija (direktno)	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+
	Bolton -> CCDA	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-
	Brucella -> Krvni agar Kolumbija	-	-	-	-	-	+++	-	-	-

Iz preglednic 14 in 15 je razviden vpliv različnih postopkov zamrzovanja na okrevanje kampilobaktrov po odmrzovanju. Vzorce smo zamrzovali pri dveh različnih temperaturah. V splošnem so rezultati okrevanja po zamrzovanju pri višji temperaturi slabši kot pri nižji. Predvsem se razlika kaže pri zamrzovanju s pomočjo seta Microbank, kjer je pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ okreval le referenčni sev *C. jejuni*. Pri zamrzovanju v gojišču FBP opazimo razliko predvsem v številu kolonij, saj je okrevanje po zamrzovanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ boljše. Kljub temu pa je okrevanje dobro tudi pri zamrzovanju pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri zamrzovanju v gojišču, sestavljenem iz glicerola in hranilnega bujona št.2, pa je pri dveh sevih opazno boljše okrevanje po zamrzovanju na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri ostalih sevih je okrevanje boljše po zamrzovanju na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Najslabše okrevanje smo ugotovili po zamrzovanju s komercialnim setom Microbank. Del tega seta je tudi tekočina, ki deluje kot krioprotektant, vendar le-ta ni prilagojena potrebam kampilobaktrov. Kot najprimernejše gojišče za zamrzovanje se je izkazal hranilni bujon št. 2 z dodanim glicerolom.

Najboljše okrevanje celic smo zabeležili, ko smo seve odmrzovali s cepljenjem direktno na krvi agar Kolumbija. Odmrzovanje v predobogatitvenem bujonu ni dalo tako dobrih rezultatov, kar je bilo pričakovano, saj vsebuje antibiotike, ki lahko poškodujejo celice, ki med zamrzovanjem postanejo še občutljivejše. Najslabše rezultate smo opazili po odmrzovanju v bujonu Brucella, ki je sicer vir hranljivih snovi za kampilobakte, vendar ne vsebuje nobene snovi, ki bi jih zaščitila pred oksidativnim stresom (npr. FBP).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Skladno z delovnim hipotezama smo skušali z uvedbo molekularnih metod odkrivanja kampilobaktrov v preobogatitvenih kulturah izboljšati spodnjo mejo občutljivosti metode, ki je v uporabi Laboratorija za sanitarno mikrobiologijo ZZV Maribor ter čas potreben za preiskavo, hkrati pa smo želeli s preizkusom različnih metod trajnega shranjevanja izbrati tisto, ki bi bila glede na preživelost celic, opremljenost laboratorija in glede na časovno zahtevnost postopka najustreznejša za shranjevanje termotolerantnih bakterij iz rodu *Campylobacter* v rutinskem laboratoriju.

5.1 RAZPRAVA

Klasične metode, ki vključujejo različne načine kultivacije in identifikacije z biokemičnimi in serološkimi testi, so dolgotrajne, drage, podvržene subjektivnosti in zato manj zanesljive. Iskanje se je zato usmerilo v odkrivanje novih metod, ki bi bile zanesljivejše in hitrejše, kar bi omogočilo pravočasno odkrivanje kampilobaktrov v vzorcih živil in vode. Kot najprimernejše so se, kot že na mnogih področjih mikrobiologije, izkazale molekularne metode ugotavljanja prisotnosti nepoškodovanih nukleinskih kislin, saj omogočajo hitrost, občutljivost in specifičnost. Prav zaradi tega smo v predstavljenem diplomskem delu poskušali izpeljati primerjavo med klasično metodo določanja termotolerantnih kampilobaktrov in novo, molekularno metodo. Končni cilj raziskave je hitra potrditev prisotnosti kampilobaktrov v vzorcih vode, kar bi izboljšalo diagnostiko v rutinskem laboratoriju.

Da bi izboljšali celoten postopek rokovanja z izolati kampilobaktrov, smo poskušali vpeljati tudi novo metodo za dolgotrajno shranjevanje kampilobaktrov, saj do sedaj uporabljana ni dala zelenih rezultatov. Metoda bi naj bila enostavna, poceni, hitro izvedljiva in učinkovita. Ob primerjavi treh metod smo se odločili za najprimernejšo za uporabo v rutinskem laboratoriju.

5.1.1 Odkrivanje termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* v vodi z molekularnimi metodami

V današnjem času se tako v raziskovalnih kot tudi v rutinskih laboratorijih vse pogosteje uporabljajo molekularne metode. Kadar je klasičen postopek dokazovanja bakterij dolgotrajen, je vpeljava hitrejših, molekularnih metod še posebej smiselna. Takšen primer so tudi kampilobaktre. Ker traja postopek identifikacije kampilobaktrov po klasični metodi tudi do 7 dni in ker je predvsem za epidemiološke študije pomembna hitra diagnostika, da bi lahko vir okužbe povezali z obolenjem, smo se odločili za primerjavo dveh molekularnih metod s klasično metodo določanja kampilobaktrov v površinskih vodah.

5.1.1.1 Primerjava horizontalne metode po mednarodnem standardu ISO z verižno reakcijo s polimerazo

Ob primerjavi obeh metod nismo ugotovili odstopanj. Tako z verižno reakcijo s polimerazo, kot tudi s klasično metodo smo izmed 22 vzorcev površinske vode določili 7 vzorcev, ki so vsebovali termotolerantne bakterije rodu *Campylobacter* in 15 vzorcev, pri katerih je bil rezultat negativen (v vzorcu vode nismo določili termotolerantnih kampilobaktrov). Pri obdelavi naših vzorcev se je metoda z verižno reakcijo s polimerazo v primerjavi s klasično metodo izkazala kot 100 % občutljiva in specifična (Preglednica 16). Naši rezultati se skladajo z rezultati, ki so jih Josefsen in sod. (2004) dobili pri medlaboratorijski validaciji te metode za vzorce perutninskega in svinjskega mesa. Pri validaciji je sodelovalo 12 laboratorijev iz različnih evropskih držav, ugotovili pa so več kot 90 % občutljivost in 100 % specifičnost za vzorce perutninskega mesa ter več kot 90 % občutljivost in 94,2 % specifičnost za vzorce svinjskega mesa. Glede na dobljene rezultate so metodo označili kot primerno za uporabo v rutinskih laboratorijih, vendar so kot potrditev pozitivnih rezultatov priporočili hkratno uporabo standardne metode po mednarodnem standardu ISO (Josefsen in sod., 2004).

Velika prednost molekularnih metod se je pokazala predvsem v času, ki preteče od takrat, ko vzorec prispe v laboratorij pa do konca analize. Kadar vzorec obdelujemo s pomočjo klasične metode, lahko rezultat analize izdamo najhitreje v roku petih dni od prejema vzorca, medtem ko rezultat s pomočjo molekularnih metod lahko dobimo že po dveh do treh dneh od prejema vzorca.

5.1.1.2 Potrditev in identifikacija vzorcev pozitivnih na termotolerantne kampilobakte z mnogokratno PCR in primerjava s klasično metodo

Ker smo želeli s pomočjo molekularnih metod pridobiti tudi informacijo o vrsti kampilobaktrov v vzorcih, smo uporabili mnogokratno PCR, ki loči med dvema najpogostejšima vrstama kampilobaktrov. To sta *C. jejuni* in *C. coli*. Z mnogokratno PCR smo testirali le tiste vzorce, pri katerih smo s klasično metodo in s pomnoževanjem odseka 16S rRNA ugotovili prisotnost kampilobaktrov.

Rezultate, pridobljene s pomočjo mnogokratne PCR, smo primerjali z rezultati, ki so jih v Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo pridobili s pomočjo klasične metode. Ugotovili smo, da se rezultati med seboj ujemajo. Med sedmimi vzorci, ki so bili pozitivni na kampilobakter, smo v štirih vzorcih ugotovili prisotnost *C. coli*, pri treh pa prisotnost *C. jejuni* (Preglednica 16). Čeprav smo pri našem eksperimentu dobili skladne rezultate, je potrebna pazljivost predvsem pri sevih *C. jejuni*, ki *in vitro* ne izražajo gena za hidrolizo hipurata. Takšne seve lahko z mnogokratno PCR, pri kateri pomnožujemo odsek gena *hipO*, napačno uvrstimo med *C. coli* (Zorman in Smole Možina, 2002a; Persson in Olsen, 2005).

Metoda je sicer uporabna za razlikovanje med zgoraj naštetima vrstama, vendar z njo ne moremo razlikovati med ostalimi vrstami termotolerantnih kampilobaktrov. Še posebej bi

bil test uporaben, če bi lahko z njim identificirali tudi *C. lari* in *C. upsaliensis*, ki se vse pogosteje pojavljata med povzročitelji gastroenteritsov pri ljudeh.

5.1.1.3 Vpliv trajanja predobogatitve na uspešnost določanja kampilobaktrov z verižno reakcijo s polimerazo

Priporočen čas predobogatitve v bujonu Preston je 44 ± 4 ure (ISO 17995). Odvisen je od koncentracije kampilobaktrov v vzorcu in od kompetitivne flore.

Da bi skrajšali čas, ki ga potrebujemo za potrditev kampilobaktrov v vzorcih vode, smo poskušali skrajšati čas inkubacije za polovico. Vzorce smo tako pregledali po 24 in 48-urni inkubaciji v mikroaerofilnih pogojih. Josefsen in sod. (2004) so v medlaboratorijski validaciji te metode uporabili 20-urno predobogatitev, po kateri so uspešno dokazali prisotnost kampilobaktrov v 90 % vzorcev. V našem primeru se po 24-ih urah kampilobaktri večinoma še niso namnožili dovolj, da bi lahko z izbrano metodo izolacije DNA in pomnoževanjem odseka 16S rRNA potrdili prisotnost kampilobaktrov v vzorcih vode. Pozitiven rezultat smo namreč po skrajšani inkubaciji dobili le pri dveh od sicer sedmih pozitivnih vzorcev. Pri teh dveh vzorcih smo lahko po 24-urni inkubaciji s pomočjo mnogokratne PCR določili tudi vrsto kampilobaktrov (Preglednica 16).

Glede na to, da je 48-urna inkubacija potrebna tudi za potrditev prisotnosti kampilobaktrov v vzorcih vode s pomočjo klasične metode, lahko zaključimo, da je smiselno priporočljiv čas predobogatitve ohraniti.

5.1.2 Določanje meje občutljivosti z umetno kontaminacijo površinske vode

Selektivnost in meja občutljivosti sta kritična parametra, ki določata natančnost verižne reakcije s polimerazo (Sartory, 2005). Prav tako je meja občutljivosti ena izmed ključnih karakteristik pri vključevanju nove metode v stalno laboratorijsko prakso. S klasično metodo (ISO 17995) so v Laboratoriju za sanitarno mikrobiologijo v vzorcih vode uspešno odkrili 10^3 CFU/ml kampilobaktrov. S pomočjo molekularne metode smo želeli mejo občutljivosti znižati.

Jelenik in sod. (2005) so v sklopu medlaboratorijskega poskusa (Josefsen in sod., 2004), opravili primerjavo dveh hitrih diagnostičnih metod za odkrivanje *C. jejuni* in *C. coli* v hrani. Del poskusa je bil tudi določitev meje občutljivosti metode PCR, pri kateri pomnožujemo 287 bp dolg odsek 16S rRNA. Z desetkratnimi redčitvami suspenzij celic *C. jejuni* oz. *C. coli* so umetno kontaminirali piščančje meso in solato z majonezo, pri čemer so uporabili redčitve od 10^5 do 10^2 CFU/ml. Določili so spodnjo mejo občutljivosti metode PCR, ki je znašala 10^2 CFU/ml za obe vrsti.

V našem poizkusu smo primerjali meji občutljivosti klasične metode in metode PCR, pri kateri smo pomnoževali odsek 16S rRNA. Za določanje meje občutljivosti smo uporabili tri različne podlage, ki smo jih umetno kontaminirali z različnimi razredčinami kulture *C. jejuni* oz. *C. coli*.

5.1.2.1 Določanje meje občutljivosti metod za ugotavljanje prisotnosti *C. jejuni*

V namizni vodi, kjer ni prisotne kompetitivne flore in drugih dejavnikov, ki bi ovirali detekcijo, smo s PCR in tudi s klasično metodo določili mejo občutljivosti 1 CFU/ml (Preglednici 17 in 18 ter Sliki 9 in 10). V vodi, kjer ni prisotnih nobenih motečih dejavnikov lahko v mililitru vode odkrijemo 1 bakterijsko celico. Vendar v vsakodnevnih vzorcih takšnih pogojev ni, zato ta meja občutljivosti ni realna.

V primeru Pekrskega potoka, ki je bolj reprezentativen vzorec zaradi prisotne močne kompetitivne flore, rezultati niso bili tako dobri. Pri določanju meje občutljivosti klasične metode smo namreč opazili prisotnost po Gramu negativnih kokov, ki so prerasli kampilobakte. Tako smo pri klasični metodi opazili rast kampilobaktrov le, ko smo vzorec umetno kontaminirali z razredčino kulture, ki je vsebovala 10^2 CFU/ml *C. jejuni*. S PCR so bili rezultati boljši, saj smo določili mejo občutljivosti 10^1 CFU/ml (Preglednici 17 in 18 ter Sliki 9 in 10).

Rezultati, ki smo jih dobili z umetno kontaminacijo vode iz Drave, niso bili koristni pri določanju meje občutljivosti, saj smo že v originalnem, umetno nekontaminiranem vzorcu, določili prisotnost kampilobaktrov (Preglednici 17 in 18 ter Sliki 10 in 11). Kontrola števila mikroorganizmov v serijskih razredčinah je pokazala skladne rezultate, zato smo metodo za določanje meje občutljivosti označili kot uporabno za *C. jejuni*.

Ugotovili smo, da je meja občutljivosti metode s PCR nižja od meje občutljivosti klasične metode. V naši raziskavi smo v primerjavi z raziskavo Jelenika in sod. (2005) dobili boljše rezultate.

5.1.2.2 Določanje meje občutljivosti metod za ugotavljanje prisotnosti *C. coli*

Ko smo vzorce vode umetno kontaminirali s sevom *C. coli*, nismo dobili tako dobrih rezultatov kot pri umetni kontaminaciji s *C. jejuni*. S klasično metodo smo zaznali prisotnost kampilobaktrov le v prvi ponovitvi poskusa, v primeru umetne kontaminacije namizne vode Spar z 10^2 CFU/ml. Z molekularno metodo smo prisotnost kampilobaktrov zaznali v štirih primerih. V obeh ponovitvah poskusa smo prisotnost zaznali pri umetni kontaminaciji namizne vode Spar z 10^2 CFU/ml. V vzorcu, odvzetem iz Pekrskega potoka, smo v prvi ponovitvi poskusa kampilobakte zaznali pri umetni kontaminaciji z 10^0 CFU/ml, v drugi pa pri umetni kontaminaciji z 10^2 CFU/ml *C. coli*. V vzorcih Drave nismo zaznali prisotnosti kampilobaktrov (Preglednici 19 in 20 ter Sliki 12 in 13).

Metoda, ki smo jo uporabili namreč vključuje mešanje na vrtinčniku, kar znatno poveča nasičenost gojišča s kisikom. Povečana koncentracija kisika pa negativno vpliva na preživetje kampilobaktrov, še posebej *C. coli*. Kontrola števila mikroorganizmov v razredčinah je pokazala, da je dejanska koncentracija preživelih bakterij za 10 do 100-krat manjša od pričakovane. Jelenik in sod. (2005) sicer predvidevajo enako natančnost odkrivanja *C. jejuni* in *C. coli*, saj gre pri tej metodi za pomnoževanja odseka 16S rRNA, ki je skupen obema vrstama, vendar v našem primeru temu ni bilo tako. Za določanje meje

občutljivosti za ugotavljanje prisotnosti *C. coli* bi tako bilo smiselno uporabiti drugačno metodo priprave serijskih razredčin kulture.

5.1.3 Trajno shranjevanje izolatov termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter*

Za primerjavo metod za trajno shranjevanje izolatov smo se odločili, ker zamrzovanje s pomočjo seta Microbank, ki so ga na Zavodu za zdravstveno varstvo uporabljali do sedaj, ni dalo ustreznih rezultatov. Iskali smo čim bolj enostavno in učinkovito metodo. Do sedaj uporabljano metodo smo primerjali z dvema novima metodama zamrzovanja pri dveh različnih temperaturah. Primerjali smo tudi tri različne metode odmrzovanja.

5.1.3.1 Učinkovitost shranjevanja izolatov v odvisnosti od načina zamrzovanja

Najslabše rezultate odmrzovanja smo dobili z zamrzovanjem s pomočjo seta Microbank, ki je v stalni uporabi rutinskega laboratorija. Po zamrzovanju pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je okreval le en sev, po zamrzovanju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa so sicer okrevali vsi sevi, vendar je bilo število kolonij, ki smo jih našli na ploščah v večini primerov pod 20 (Preglednici 14 in 15). Del seta Microbank je tudi tekočina, ki deluje kot krioprotektant, vendar ni prilagojena potrebam kampilobaktrov. Njihova občutljiva narava zahteva posebne pogoje zamrzovanja, ki jih komercialni set Microbank ni mogel zadovoljiti. Pri Pro-lab diagnostic so opravili študijo učinkovitosti zamrzovanja z njihovim setom Microbank, ki se je izkazal kot učinkovit za trajno shranjevanje nekaterih vrst bakterij, vendar so ugotovili, da bodo potrebne še dodatne študije, ki bodo vključevale občutlivejše mikroorganizme, kot so *N. gonorrhoeae*, *Campylobacter* spp. in anaerobni organizmi (The Pulse, 2004). Možna rešitev bi bila nadomestitev tekočine, ki deluje kot krioprotektant z lizirano konjsko krvjo. Podobno metodo opisujeta tudi Gorman in Adley (2004). Ko sta tekočino v komercialnem setu Cryobank zamenjala s konjsko krvjo, so kampilobaktri uspešno okrevali tudi po šestih mesecih od dneva zamrzovanja. Učinkovito trajno shranjevanje izolatov termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* ovira njihova občutljivost na kisik in izsuševanje ter nastanek VBNC oblike mikroorganizmov (Moore in Stanley, 2000).

Glede na rezultate okrevanja po zamrzovanju s setom Microbank smo sklenili, da je zamenjava tehnike zamrzovanja smiselna. Kot najučinkovitejša se je izkazala metoda zamrzovanja v gojišču, sestavljenem iz glicerola in hranilnega bujona št.2. Pri tej metodi smo opazili najboljše okrevanje (Preglednici 14 in 15). Priprava je enostavna, hranilni bujon št.2 in glicerol pa sta tudi vedno na zalogi oddelka za pripravo gojišč. Glicerol uporabljamo za zmanjševanje škode, ki bi jo ob zamrzovanju ledeni kristali povzročili bakterijam.

Učinkovita je tudi metoda, pri kateri kot medij za zamrzovanje uporabimo gojišče s FBP, ki jo kot najprimernejšo v svoji študiji opisujeta Gorman in Adley (2004). Vključitev FBP v osnovno gojišče se je v preteklosti izkazalo kot zelo uspešno pri ohranjanju živosti kampilobaktrov pri različnih temperaturah (Rogol in sod., 1990; Humphrey, 1990). FBP nevtralizira toksične produkte kisika, hkrati pa poveča toleranco organizmov na kisik (Rogol in sod., 1990), kar je za okrevanje kampilobaktrov pomembno, saj so ugotovili, da

je za slabo preživelost kampilobaktrov pri temperaturah zamrzovanja odgovoren tudi oksidativni stres (Park, 2002). Pri naši primerjavi različnih tehnik zamrzovanja pa smo pri tej metodi opazili nekoliko slabše preživetje (Preglednici 14 in 15). Poleg tega gojišče vsebuje tudi FBP, kar je povezano z večjimi stroški, pa tudi z dolgotrajnejšo pripravo.

Prav tako se je kot pomemben dejavnik izkazala temperatura zamrzovanja. Temperatura je zelo pomemben dejavnik pri shranjevanju mikroorganizmov. Za shranjevanje kampilobaktrov so bile raziskane različne temperature. Izkazalo se je, da sevi kampilobaktrov veliko bolje okrevali po zamrzovanju pri nižji temperaturi (-70 °C), kot pri višji temperaturi (-20 °C) (Preglednici 14 in 15). Mills in Gherna (1988) sta v svoji študiji seve kampilobaktrov shranjevala v gojišču, sestavljenem iz *Brucella Albimi* gojišča in 10 % glicerola. V rezultatih opisujeta, da je najprimernejše zamrzovanje v tekočem dušiku. Sledi mu zamrzovanje pri -65 °C. Kampilobaktri so po zamrzovanju s tema metodama uspešno preživeli dve leti. Zamrzovanje pri -20 °C je dalo slabše rezultate, saj so kampilobaktri pri tej temperaturi preživeli le sedem mesecev. Podobne rezultate sta v svoji študiji opisali tudi Gorman in Adley (2004). Čeprav se je shranjevanje v tekočem dušiku izkazalo kot zelo uspešno, je običajno shranjevanje pri temperaturah okrog -70 °C bolj priročno, saj vsi laboratoriji ne premorejo opreme, potrebne za shranjevanje v tekočem dušiku.

Kot najprimernejša metoda za zamrzovanje sevov v rutinskem laboratoriju se je tako izkazala metoda, pri kateri uporabimo hranilni bujon št.2 in glicerol (Preglednici 14 in 15). Predvsem je metoda uporabna za shranjevanje pri temperaturi -70 °C (Preglednica 15). Saha in sodelavci (1991) so namreč ugotovili, da pri temperaturi, višji od -10 °C *C. jejuni* preživi le 45 dni. Podobne ugotovitve sta opisali tudi Gorman in Adley (2004), saj so njihovi vzorci po treh mesecih zamrzovanja pri -20 °C okrevali v 100 %, po dvanajstih mesecih pa jih je okrevalo le 20 %. Okrevanje vzorcev, zamrznjenih pri -85 °C, je bilo tudi po dvanajstih mesecih 100 %. Ta metoda je najenostavnejša, zahteva najmanj priprave, pa tudi stroški, povezani z njo, so najmanjši. V vsakem primeru pa je priporočljivo seve zamrzniti s še eno, alternativno metodo, ali shranjevati v več paralelkah.

5.2 SKLEPI

Na osnovi rezultatov opravljenega raziskovalnega dela lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Z uvedbo molekularnih metod odkrivanja kampilobaktrov v predobogatitvenih kulturah smo izboljšali spodnjo mejo občutljivosti klasične metode po mednarodnem ISO standardu 17995 iz 10^3 CFU/ml na 10^1 CFU/ml.
 - Z vpeljavo molekularnih metod v postopek odkrivanja prisotnosti termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter* se čas, potreben za detekcijo, skrajša iz dosedanjih 5 ali več dni na 2-3 dni.
 - S preizkusom različnih metod trajnega shranjevanja bakterij rodu *Campylobacter* smo izbrali tisto, ki je glede na preživelost celic, razpoložljivo opremljenost laboratorija in glede na časovno zahtevnost postopka najustreznejša za uporabo v rutinskem laboratoriju. Kot najučinkovitejša metoda za trajno shranjevanje sevov, sicer zelo občutljivih termotolerantnih bakterij rodu *Campylobacter*, se je izkazala metoda, pri kateri smo uporabili hranilni bujon št. 2 z dodatkom 15 % glicerola.
-

6 POVZETEK

Bakterije rodu *Campylobacter* predstavljajo v razvitem svetu enega izmed najpogostejših povzročiteljev črevesnih obolenj pri ljudeh. Naravni rezervoar kampilobaktrov so ptice, preko katerih se bakterije širijo v okolje. Najpogostejši vir okužbe pri ljudeh je nepravilno, oziroma nezadostno obdelano perutninsko meso, v zadnjem času pa ugotavljamo tudi vse več drugih virov okužbe, kot so okoljska voda in stik z živalmi. Za razvoj bolezni pri človeku je potrebna zelo nizka minimalna infektivna doza. Kampilobaktri so izredno občutljivi na okoljske dejavnike. Ker rastejo v mikroaerofilni atmosferi, so zelo občutljivi na kisikove radikale. Celice postanejo nekultivabilne in jih s klasičnimi metodami ne moremo odkriti. Poleg tega imajo klasične metode še druge pomanjkljivosti - dolgotrajnost, visoka cena, nezanesljivost in zahtevnost dela. Zato je bilo veliko dela vložena v razvoj molekularnih metod. Te omogočajo hitrost in selektivnost, poleg potrditve prisotnosti pa še identifikacijo in tipizacijo kampilobaktrov. Najpogosteje uporabljena molekularna metoda je verižna reakcija s polimerazo (PCR), s katero pomnožujemo specifične odseke DNA v *in vitro* pogojih. Specifičnost reakcije je odvisna od pravilne izbire začetnih oligonukleotidov. Občutljivost metode je teoretično izredno dobra, vendar lahko v praksi pride do inhibicije reakcije. Zato se v postopek odkrivanja kampilobaktrov še vedno vključuje predobogatitev, ki pripomore k povečanju števila mikroorganizmov v vzorcu in zmanjša število inhibitornih snovi. Cilj našega dela je bil z uvedbo molekularnih metod skrajšati čas in izboljšati spodnjo mejo občutljivosti metode odkrivanja kampilobaktrov v vodi. Metoda, pri kateri smo s PCR pomnoževali odsek znotraj gena za 16S rRNA, se je izkazala kot učinkovita. Ob primerjavi te metode s klasično metodo smo ugotovili 100 % občutljivost in 100 % specifičnost. Čas preiskave se je iz 5 ali več dni skrajšal na 2-3 dni. Ugotovili smo tudi nižjo mejo občutljivosti. Najnižja meja detekcije je pri klasični metodi znašala 10^2 CFU/ml, pri molekularni pa 10^1 CFU/ml. Glede na dobljene rezultate smo metodo označili kot primerno za uporabo v rutinskem laboratoriju, vendar je za potrditev pozitivnih rezultatov smiselno hkrati uporabiti tudi klasično metodo po mednarodnem standardu ISO 17995. Kot učinkovita se je izkazala tudi mnogokratna PCR za razlikovanje vrst *C. jejuni* in *C. coli*. Ob primerjavi te metode s klasično metodo smo prav tako ugotovili 100 % občutljivost in 100 % specifičnost. S to metodo pa ni mogoče razlikovati med ostalimi vrstami termotolerantnih kampilobaktrov, kot sta *C. lari* in *C. upsaliensis*, ki pri ljudeh prav tako povzročata gastroenteritise. V laboratoriju je potrebno tudi uspešno dolgotrajno shranjevanje sevov, ki so potrebni v različnih epidemioloških študijah. Preverili smo tri različne metode shranjevanja (komercialni sistem Microbank, hranilni bujon št. 2 z dodanim glicerolom in hranilni bujon št. 2 z dodanim FBP). Glede na preživelost celic, razpoložljivo opremljenost laboratorija in časovno zahtevnost postopka bi uporabi v rutinskem laboratoriju najbolj ustrezala metoda, pri kateri smo kot gojišče uporabili hranilni bujon št.2 s 15 % deležem glicerola.

7 LITERATURA

- Alterkruse S. F., stern N. J., Fields P. I., Swerdlow D. L. 1999. *Campylobacter jejuni* an emerging food borne pathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 28-35
- Balakrish Nair G., Chowdhury S., Das P., Pal S., Pal S. C. 1984. Improved preservation media for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 19, 2: 298-299
- Blaser M. J., Cody H. J. 1986. Methods for isolating *Campylobacter jejuni* from low-turbidity water. *Applied Environmental Microbiology*, 51, 2:312–315
- Bolton F. J., Robertson L. 1982. A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*. *Journal of Clinical Pathology*, 35: 462-467
- Caner V., Cokal Y., Cetin C., Sen A., Karagenc N. 2008. The detection of hipO gene by real-time PCR in thermophilic *Campylobacter* spp. with very weak and negative reaction of hippurate hydrolysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49,4: 527-532
- Champion O. L., Gaunt M. W., Gundogdu O., Elmi A., Witney A. A., Hinds J., Dorrel N., Wren B. W. 2005. Comparative phylogenomics of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals genetic markers predictive of infection source. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 44: 16043-16048
- Chan V. L., Hani E. K. 1995. Expression and characterisation of *Campylobacter jejuni* benzoylglycine amidohydrolase (hippuricase) gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177, 9: 2396-2402
- Corry J. E. L., Post D. E., Colin P., Laisney M. J. 1995. Culture media for the isolation of campylobacters. *International Journal of Food Microbiology*, 26: 43-76
- Dekeyser P., Gossuin-Detrain M., Butzler J. P., Sternon J. 1972. Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *Journal of Infectious Diseases*, 125,4: 390–392
- Denis M., Soumet C., Rivoal K., Ermel G., Blivet D., Salvat G., Colin P. 1999. Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 406-410
- Diergaardt S. M., Venter S. N., Chalmers M., Theron J., Broezel V.S. 2003. Evaluation of the Cape Town protocol for the isolation of *Campylobacter* spp. from environmental waters. *Water SA*, 29, 2: 225-230
<http://www.moh.govt.nz/moh.nsf/pagesmh/2588?Open> (6.11.2007)
- Donnison A. 2003. Isolation of thermotolerant *Campylobacter* – review and methods for New Zealand laboratories. Wellington. New Zealand Ministry of Health.
<http://www.moh.govt.nz/moh.nsf/pagesmh/2588?Open> (6.11.2007)
-

- Dorak T. M. 2006. Real-time PCR. Oxford. Taylor & Francis (01.10.2007)
<http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html> (15.11.2007): 1 str.
- Dousse C., Schneider E., Schwartzbrod J. 1993. Comparison of methods for isolating *Campylobacter* spp. from sewage. *Water, Science and Technology*, 27: 275-278
- EFSA. 2007. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. Parma, EFSA– European Food Safety Authority
http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale1178620753812_1178671312912.html: 58 str.
- Epidemiološko spremljanje nalezljivih boleznih v Sloveniji v letu 2006. 2006. Ljubljana. Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije.
http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/798-Epidemiolosko_spremljanje_NB_2006.pdf: 89 str.
- Franco Don A. 1988. *Campylobacter* species: Considerations for controlling foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 51, 2: 145-153
- Galanis E. 2007. *Campylobacter* and bacterial gastroenteritis. *Canadian Medical Association Journal*, 177, 6: 570-571
- Giesendorf B. A. J., Quint W. G. V., Henkens M. H. C., Stegeman H., Huf F. A., Niesters H. G. M. 1992. Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 12: 3804-3808
- Gorman R., Adley C. C. 2004. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20 °C and -85 °C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 306-310
- Humphrey T. J. 1990. The synergistic inhibition of *Campylobacter jejuni* by rifampicin and hydrogen peroxide. *Letters in Applied Microbiology*, 10, 2: 97-100
- Hunt M. J., Abeya C., Tran T. 2001. *Campylobacter*. V: Bacteriological analytical manual online. Washington. U.S. Food & Drug administration, Center for food safety. (08.03.2001)
<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-7.html> (26.10.2007): 1 str.
- ISO 10272-1. Microbiology of food and animal feed ingredients – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: Detection method. 2006: 16 str.
- ISO 17995. Water quality – Detection and enumeration of thermotolerant *Campylobacter* species. 2005: 14 str.
-

- Jelenik T., Šabatková Z., Demnerova K., Pazlarova J. 2005. Two rapid procedures for the identification of *Campylobacter jejuni/coli* in food matrix. *Czech Journal of Food Science*, 23: 121-125
- Johnsen R. 2006. Transmission routes for the bacterium *Campylobacter*. Oslo. Norwegian School of Veterinary Science (28.10.2006).
<http://www.medicalnewstoday.com/articles/59254.php> (26.10.2007): 1 str.
- Josefsen M. H., Cook N., D'Agostino M., Hansen F., Wagner M., Demnerova K., Heuvelink A. E., Tassios P. T., Lindmark H., Kmet V., Barbanera M., Fach P., Loncarevic S., Hoorfar J. 2004. Validation of a PCR-based method for detection of food-borne thermotolerant campylobacters in a multicenter collaborative trial. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7: 4379-4383
- Klančnik A., Zorman T., Smole Možina S. 2008. Effects of low temperature, starvation and oxidative stress on the physiology of *Campylobacter jejuni* cells. *Croatica Chemica Acta*, 81, 1: 41-46
- Kolackova I., Karpiskova R. 2005. Species level identification of thermotolerant campylobacters. *Veterinarni Medicina*, 50, 12: 543
- 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
- Kos V. N., Gibreel A., Keelan M, Taylor D. E. 2006. Species identification of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates and optimization of a duplex PCR for rapid detection. *Research in Microbiology*, 157, 6: 305-507
- Lazcka O., Javier Del Campo F., Xavier Muñoz F. 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 1205-1217
- Linton D., Lawson A. J., Owen J., Stanley J. 1997. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 10: 2568-2572
- Lübeck P. S., Wolffs P., On S. L. W., Ahrens P., Rådström, Hoorfar J. 2003. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant campylobacters: Assay development and analytical validation. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9: 3664-5669
- Malorny B., Tassios P. T., Rådström P., Cook N., Wagner M., Hoorfar J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 39-48
-

- Mateczun A., Peruski L. 2003. Long term preservation and storage of viable dried bacteria. United States patent 20030044962
<http://www.freepatentsonline.com/20030044965.html> (21.11.2007) : 1 str.
- Mathewson, J. J., Keswick, B. H., DuPont, H. L. 1983. Evaluation of filters for recovery of *Campylobacter jejuni* from water. Applied and Environmental Microbiology, 46: 985-987.
- Microorganisms in foods:5. Microbiological specifications of food pathogens. 1996. Roberts T. A., Baird-Parker A. C., Tompkin R. B.(eds.). London, ICMSF, Blackie Academic & Professional: 45-60
- Mills C.K., Gherna R. L. 1988. Cryopreservation studies of *Campylobacter*. Cryobiology, 25, 2: 148-152
- Moldenhauer J. 2002. Validation of rapid microbiology systems. Washington. Parenteral Drug Association.
http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/ac/02/slides/3901S1_10_Moldenhauer.ppt
(28.8.2008): 31 str.
- Moore J. E., Caldwell P. S., Millar B. C., Murphy P. G. 2001. Occurrence of *Campylobacter* spp. in water in Northern Ireland: implications for public health. The Ulster Medical Journal, 70, 2: 102-107
- Moore J. E., Corcoran D., Dooley J. S. G., Fanning S., Megraud F., Millar B. C., O'Mahony R., O'Riordan L., O'Rourke M., Rao J. R., Rooney P. J., Sails A., Whyte P. 2005. *Campylobacter*. Veterinary Research, 36: 351-382
- Moore J. E., Stanley T. 2000. Long-term preservation of thermophilic *Campylobacter* species: a simple method. British Journal of Biomedicine Science, 57, 3: 214-215
- On S. L. W. 1996. Identification methods for *Campylobacter*, *Helicobacters* and related organisms. Clinical Microbiology Reviews, 9, 3: 405-422
- Park S. F. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. International Journal of Food Microbiology, 74, 3: 177-188
- Penner J. L. 1988. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. Clinical Microbiology Reviews, 1, 2: 157-172
- Persson S., Olsen K. E. P. 2005. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. Journal of Medical Microbiology, 54: 1043-1047
- Reezal A., McNeil B., Anderson J. G. 1998. Effect of low-osmolality nutrient media on growth and culturability of *Campylobacter* species. Applied and Environmental Microbiology, 64, 12: 4643-4649
-

- Rogol M., Schnaidman B., Katzenelson E., Sechter I. 1990. Improved medium for storage and transportation of thermophilic campylobacters. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 9, 10: 760-762
- Saha S. K., Saha S., Sanyal S. C. 1991. Recovery of injured *Campylobacter jejuni* cells after animal passage. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 11: 3388–3389
- Sartory D. P. 2005. Validation, verification and comparison: Adopting new methods in water microbiology. *Water SA*, 31, 3: 393-396
- Settani L., Corsetti A. 2007. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 69: 1-22
- Smole Možina S., Uzunović-Kamberović S. 2005. *Campylobacter* spp. as emerging food-borne pathogen - incidence, detection and resistance. *Medicinski glasnik*, 2, 1: 2-15
- The Pulse. 2004. Ontario. Pro Lab diagnostics.
<http://www.pro-lab.com/newsletter/pulse3.pdf> (29.7.2008): 4 str.
- Wang W. L., Luechtefeld N. W., Reller L. B., Blaser M. J. 1980. Enriched brucella medium for storage and transport of cultures of *Campylobacter fetus* subsp. *Jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 12, 3: 479-480
- Wassenaar T. M., Newell D. G. 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. Minireview. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 7: 2161 – 2165
- Zorman T., Heyndrickx M., Uzunović-Kamberović S., Smole Možina S. 2006. Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. *International Journal of Food Microbiology*, 110: 24-33
- Zorman T., Smole Možina S. 2002a. Classical and molecular identification of thermotolerant campylobacters from poultry meat. *Food Technology and Biotechnology*, 40, 3: 177-184
- Zorman T., Smole Možina S. 2002b. Identifikacija patogenih bakterij iz hrane s klasično in metodologijo PCR – primer *Campylobacter*. V: Pomen mikrobiologije v proizvodnji varnih živil. Raspor P. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 195-208
-

ZAHVALA

Hvala mentorici dr. Sonji Smole Možina za strokovne nasvete in usmerjanje pri pisanju diplomske naloge ter natančen in temeljit pregled le-te.

Iskrena hvala somentorici prof. dr. Maji Rupnik za vso razumevanje in sproščeno vzdušje ter pomoč pri laboratorijskem delu.

Hvala tudi recenzentu prof. dr. Petru Rasporju za natančno recenzijo diplomske naloge.

Zahvaljujem se Oddelku za mikrobiologijo ZZV Maribor, da so mi omogočili delo v njihovih laboratorijih. Hvala vsem sodelavkam Oddelka za sanitarno mikrobiologijo in Oddelka za raziskovalno dejavnost ZZV Maribor, še posebej Mateji, Nataši in Sandri, ki so poskrbele, da je bilo delo v laboratoriju zabavno in polno humorja.

Hvala mojim staršem, ki so mi omogočili študij in me podpirali, tudi ko ni šlo vse kot po maslu.

Hvala vsem prijateljem, zaradi katerih so se mi študentska leta še posebej vtisnila v spomin. Hvala mojim pupam, zato ker so kar so.

Hvala tudi tebi Grega, za vse nasmehе in objeme takrat, ko sem jih najbolj potrebovala.

Hvala vam!
