

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Eva SOBOČAN ZAJC

**SLEDENJE IZVORA IN ŠIRJENJA OKUŽBE  
PIŠČANČJEGA MESA Z BAKTERIJAMI  
*Campylobacter jejuni* VZDOLŽ PROIZVODNE  
VERIGE Z METODO MLST (SEKVENCIRANJEM  
MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Eva SOBOČAN ZAJC

**SLEDENJE IZVORA IN ŠIRJENJA OKUŽBE PIŠČANČJEGA MESA  
Z BAKTERIJAMI *Campylobacter jejuni* VZDOLŽ PROIZVODNE  
VERIGE Z METODO MLST (SEKVENCIRANJEM  
MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ)**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**TRACING THE SOURCE AND THE SPREAD OF CONTAMINATION  
OF CHICKEN MEAT WITH BACTERIA *Campylobacter jejuni*  
THROUGH PRODUCTION CHAIN WITH MULTILOCUS  
SEQUENCE TYPING (MLST)**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina, za somentorico doc. dr. Nežo Čadež in za recenzenta viš. znan. sod. dr. Matjaža Ocepka.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Somentorica: doc. dr. Neža Čadež

Recenzent: viš. znan. sod. dr. Matjaž Ocepak

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA

Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Neža ČADEŽ

Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: viš. znan. sod. dr. Matjaž OCEPEK

Univ. v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Eva Sobočan Zajc

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 579.25:577.2.083:616.993(043)=163.6
KG	<i>Campylobacter jejuni</i> /tipizacija/MLST/ <i>flaA</i> /mPCR/dPCR/sekvenciranje/klonski kompleks/sekvenčni tip/kampilobakterioze/piščančje meso
AV	SOBOČAN ZAJC, Eva, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ČADEŽ, Neža (somentorica)/OCEPEK, Matjaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2014
IN	SLEDENJE IZVORA IN ŠIRJENJA OKUŽBE PIŠČANČJEGA MESA Z BAKTERIJAMI <i>Campylobacter jejuni</i> VZDOLŽ PROIZVODNE VERIGE Z METODO MLST (SEKVENCIRANJEM MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ)
TD	Magistsko delo (Magistrski studij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XII, 59 str., 30 pregl., 14 sl., 93 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Kampilobaktri so od leta 2005 najpogosteji povzročitelji zoonoz v EU. Ker se človek najpogosteje okuži preko kontaminiranega piščančjega mesa, je pomembno sledenje izvora in poti širjenja okužbe. Z magistrsko nalogo smo s tipizacijsko metodo MLST, tipizacijo <i>flaA</i> , ter mPCR žeeli pojasniti izvor in analizirati širjenje kontaminacije z bakterijami <i>C. jejuni</i> vzdolž proizvodne verige piščančjega mesa. Med 159 bakterijskimi sevi smo z metodo dPCR potrdili 56 sevov vrste <i>C. jejuni</i> , ki so se z metodo MLST uvrstili v 12 sekvenčnih tipov in 8 klonskih kompleksov, pri dveh sekvenčnih tipih pa klonski kompleks ni bil določen. Najpogosteji klonski kompleks je bil ST-353, sledil pa mu je ST-354. S tipizacijo <i>flaA</i> so se izolati uvrstili v 10 <i>flaA</i> alelnih tipov in z mPCR v 8 mPCR skupin. Največjo moč diskriminacije je imela metoda MLST (Simpsonov indeks = 0,797), sledila ji je tipizacija <i>flaA</i> (Simpsonov indeks = 0,758), najslabše pa je ločila med izolati mPCR (Simpsonov indeks = 0,511). Ugotovili smo, da klavni proces zveča genetsko pestrost izolatov, ter da voda predstavlja vir in vektor prenosa okužb s kampilobaktri. Poleg izolatov iz proizvodne verige pa smo imeli tudi nekaj izolatov iz površinskih vod, za katere se je izkazala velika genetska pestrost. Med vodnimi izolati pa so se pojavili tudi sevi, ki so že opisani kot povzročitelji gastroenteritisa pri ljudeh.

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Du2
DC	UDC 579.25:577.2.083:616.993(043)=163.6
CX	<i>Campylobacter jejuni</i> /typing/MLST/ <i>flaA</i> /mPCR/dPCR/sequencing/clonal complex/sequence type/campylobacteriosis/chicken meat
AU	SOBOČAN ZAJC, Eva
AA	SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/ČADEŽ, Neža (co-advisor)/OCEPEK, Matjaž (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY	2014
TI	TRACING THE SOURCE AND THE SPREAD OF CONTAMINATION OF CHICKEN MEAT WITH BACTERIA <i>Campylobacter jejuni</i> THROUGH PRODUCTION CHAIN WITH MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO	XII, 59 p., 30 tab., 14 fig., 93 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>Campylobacters are the most common cause for zoonosis in EU since 2005. Humans are often infected by contaminated chicken meat, thereby it is important to track the source and the way of the spread infection. In our study we would like to track the source and analyse the spread of contamination with <i>C. jejuni</i> through production chain of chicken meat, with typing method MLST, typing <i>flaA</i> and mPCR. With method dPCR we confirmed 59 bacteria <i>C. jejuni</i> of 159 bacterial isolates. With MLST we sorted them in 12 sequence type and 8 clonal complexes, but in 2 sequence type clonal complex wasn't define. The most common clonal complex was ST-353, the second was ST-354. With <i>flaA</i> typing we sort isolates in 10 <i>flaA</i> alele types and with mPCR in 8 groups of mPCR types. MLST had the biggest discriminatory power (Simpson's index = 0,797), the second was typing <i>flaA</i> (Simpson's index = 0,758), and mPCR discriminated was the weakest (Simpson's index = 0,511). We found that slaughter process increase diversity of isolates and that the contaminated water is the source and vector of transmission campylobacters. We had also isolates from environmental water, and these isolates were the most genetic diverse. From these strains there was also the strains, which had been identified like a cause of humans gastroenteritis before.</p>

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE MAGISTRSKE NALOGE.....	2
<b>1.1.1 Cilji magistrske naloge.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2 Delovne hipoteze magistrske naloge .....</b>	<b>2</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ROD <i>Campylobacter</i> .....	3
2.2 RASTNI POGOJI KAMPILOBAKTROV .....	3
<b>2.2.1 Temperatura .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2.2 pH.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2.3 Atmosfera .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2.4 Vodna aktivnost (<math>a_w</math>) .....</b>	<b>4</b>
2.3 MEHANIZMI PREŽIVETJA .....	4
2.4 PATOGENEZA.....	5
2.5 EPIDEMIOLOGIJA .....	5
<b>2.5.1 Kolonizacija piščancev med rejo in vzdolž klavne linije.....</b>	<b>6</b>
2.5.1.1 Dejavniki tveganja za kolonizacijo s kampilobaktri med rejo .....	6
2.5.1.2 Dejavniki tveganja za kontaminacijo s kampilobaktri med transportom do klavnice ...	7
2.5.1.3 Dejavniki tveganja za kontaminacijo s kampilobaktri med klavnim procesom.....	7
2.6 TIPIZACIJA KAMPILOBAKTROV .....	7
<b>2.6.1 Sekvenciranje multilokusnih zaporedij - MLST (Multilocus sequence typing) .....</b>	<b>9</b>
2.6.1.1 MLST za <i>C. jejuni</i> .....	10
2.6.1.2 Uporaba MLST v epidemioloških študijah okužb tekom reje in klavne verige .....	11
<b>2.6.2 Tipizacija <i>flaA</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.6.3 Pulzna gelska elektroforeza - PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis).....</b>	<b>14</b>
<b>2.6.4 Primerjalna genomska hibridizacija na mikromrežah - MCGH (Microarray-based comparative genomic hybridization) .....</b>	<b>15</b>
<b>2.6.5 Primerjalni genomski prstni odtisi - CGF (Comparative Genomic Fingerprinting) .....</b>	<b>15</b>
<b>2.6.6 Sekvenciranje celotnega genoma - WGS (Whole Genome Sequencing) .....</b>	<b>16</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>17</b>
3.1 LABORATORIJSKI MATERIAL IN OPREMA .....	18
<b>3.1.1 Laboratorijski material.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2 Laboratorijska oprema .....</b>	<b>18</b>
3.2 MATERIAL .....	19

<b>3.2.1 Mikroorganizmi .....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.2 Mikrobiološka gojišča .....</b>	<b>19</b>
3.2.2.1 Gojišče za shranjevanje .....	19
3.2.2.2 Selektivni krvni agar Columbia za namnoževanje sevov .....	20
<b>3.2.3 Reagenti za PCR .....</b>	<b>21</b>
3.2.3.1 Mešanica za dvokratni PCR .....	21
3.2.3.2 Mešanica za mnogokratni PCR (mPCR) .....	22
3.2.3.3 Mešanica PCR za MLST tipizacijo .....	22
<b>3.2.4 Reagenti za agarozno gelsko elektroforezo .....</b>	<b>23</b>
3.2.4.1 50 x pufer TAE .....	23
3.2.4.2 1 x pufer TAE .....	24
3.2.4.3 Agarozni gel .....	24
3.2.4.4 Molekulski označevalec dolžin pomnožkov DNK – 100 bp .....	25
3.2.4.5 Raztopina etidijevega bromida .....	25
<b>3.2.5 Mešanica ExoISAP za encimsko čiščenje PCR pomnožkov za tipizacijo MLST ....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.6 Začetni oligonukleotidi za sekvenciranje .....</b>	<b>26</b>
3.3 METODE DELA .....	26
<b>3.3.1 Oživitev kultur .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3.2 Priprava lizatov kultur.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.3 Dvokratni PCR za ločevanje med vrstama <i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.4 Mnogokratni PCR .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.5 PCR za tipizacijo MLST .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.6 Agarozna gelska elektroforeza .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.7 Encimsko čiščenje pomnožkov PCR za tipizacijo MLST .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.8 Obdelava podatkov s programom BioNumerics.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.9 Izračun Simpsonovega indeksa razlikovanja za tipizacijo MLST, tipizacijo <i>flaA</i> in mPCR .....</b>	<b>31</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>33</b>
4.1 DVOKRATNI PCR ZA POTRDITEV VRSTE <i>C. coli</i> / <i>C. jejuni</i> .....	33
4.2 MLST .....	34
<b>4.2.1 PCR za 7 hišnih genov.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.2 Določitev alelov .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.3 Določitev sekvenčnih tipov in klonskih kompleksov .....</b>	<b>37</b>
4.3 TIPIZACIJA <i>flaA</i> .....	41
4.4 MNOGOKRATNI PCR (mPCR) .....	41
<b>4.5 PRIMERJAVA SPOSOBNOSTI RAZLIKOVANJA MED SEVI Z RAZLIČNIMI TIPIZACIJSKIMI METODAMI .....</b>	<b>44</b>
<b>5 RAZPRAVA.....</b>	<b>45</b>
5.1 MLST .....	45
<b>5.1.1 Izolati farmskega in klavniškega okolja .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1.2 Izolati iz piščančjega mesa in fecesa .....</b>	<b>46</b>

<b>5.1.3 Vodni izolati .....</b>	<b>47</b>
<b>5.1.4 Genetska raznolikost .....</b>	<b>47</b>
5.2 TIPIZACIJA <i>flaA</i> .....	48
5.3 MNOGOKRATNI PCR (mPCR) .....	49
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>50</b>
<b>7 POVZETEK .....</b>	<b>51</b>
<b>8 VIRI .....</b>	<b>52</b>

## **ZAHVALA**

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava osnovnega gojišča Brain Heart Infusion (Oxoid CM0375).....	20
Preglednica 2: Sestava gojišča za shranjevanje .....	20
Preglednica 3: Sestava osnovnega gojišča Columbia (Oxoid, CM331).....	20
Preglednica 4: Sestava dodatka za rast (Oxoid, SR0232E) .....	21
Preglednica 5: Sestava dodatka za selektivnost (Oxoid, SR0069E).....	21
Preglednica 6: Začetne in končne koncentracije reagentov za dvokratni PCR .....	21
Preglednica 7: Sekvenca, velikost pomnožka in funkcija začetnih oligonukleotidov za dvokratni PCR.....	22
Preglednica 8: Sekvenca, velikost pomnožka in funkcija začetnih oligonukleotidov za mPCR .....	22
Preglednica 9: Začetne in končne koncentracije reagentov za PCR za MLST tipizacijo .....	23
Preglednica 10: Sekvenca, velikost pomnožka in funkcija začetnih oligonukleotidov za PCR za tipizacijo MLST .....	23
Preglednica 11: Sestavine 50x pufra TAE.....	24
Preglednica 12: Sestava 1 x pufra TAE.....	24
Preglednica 13: Sestava 1 % agaroznega gela.....	24
Preglednica 14: Sestava molekulskega označevalca dolžin pomnožkov DNK – 100 bp.....	25
Preglednica 15: Sestava mešanice ExoISAP za encimsko čiščenje PCR pomnožkov za tipizacijoMLST.....	25
Preglednica 16: Sekvenca, velikost pomnožka in funkcija začetnih oligonukleotidov za sekvenciranje .....	26
Preglednica 17: Sestava mešanice za dvokratni PCR.....	27
Preglednica 18: Program za dvokratni PCR.....	28
Preglednica 19: Sestava mešanice M3 za mPCR .....	28
Preglednica 20: Sestava mešanice M4 za mPCR .....	28
Preglednica 21: Program za mPCR .....	29
Preglednica 22: Sestava mešanice PCR za MLST .....	29
Preglednica 23: Program »MLST«.....	30
Preglednica 24: Program za čiščenje pomnožkov PCR za tipizacijo MLST .....	30
Preglednica 25: Prikaz identifikacije vodnih izolatov z dPCR. Pozitivni rezultat (+) - prisotnost pomnožka hipurikaznega / aspartokinaznega gena in negativni rezultat (-) - odsotnost pomnožka hipurikaznega / aspartokinaznega gena. ....	34
Preglednica 26: Alelni profili in pripadajoči sekvenčni tipi.....	37
Preglednica 27: Število izolatov v pripadajočem klonskem kompleksu in sekvenčnem tipu .....	38
Preglednica 28: Rezultati tipizacije <i>flaA</i> , in sicer <i>flaA</i> nukleotid in peptid, ter pripadajoči sekvenčni tipi (ST) in klonski kompleksi (CC), število izolatov in viri.....	41

Preglednica 29: Skupine mPCR in pripadajoči sekvenčni tipi (ST), klonski kompleksi (CC), ter viri in število izolatov v skupini .....	42
Preglednica 30: Simpsonovi indeksi razlikovanja za tipizacije MLST, <i>flaA</i> in mPCR .....	44

## KAZALO SLIK

Slika 1: Slika prehoda iz metabolno aktivnih celic kampilobaktrov v VBNC stanje (Rollins in Colwell, 1986) .....	4
Slika 2: Lokacija MLST lokusov na kromosomu referenčnega seva <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (Dingle, 2001) .....	10
Slika 3: Shema MLST tipizacije (Spratt, 1999) .....	11
Slika 4: Shema eksperimentalnega dela .....	17
Slika 5: Shema mikrotitrsko ploščice za sekvenciranje .....	31
Slika 6: Slika agaroznega gela za identifikacijo velikosti pomnožkov dPCR, kjer so vidni pomnožki velikosti 735 bp, ostalih pomnožkov ni bilo prisotnih. Vrstni red nanosa na gel: NCTC 11168, C39, C2, C9, C5, C10, C33, C8 in molekulski označevalec pomnožkov DNK (100 bp). Pomnožek velikosti 753 bp je viden pri NCTC 11168, C39, C2 in C33.....	33
Slika 7: Slika agaroznega gela in pomnožki PCR za 7 hišnih genov: <i>aspA</i> , <i>pgm</i> , <i>glnA</i> , <i>tkt</i> , <i>gltA</i> , <i>uncA</i> , <i>glyA</i> in gen <i>flaA</i> za sev Z-KL-SKB1, ter molekulski označevalec velikosti DNK (100 bp).....	35
Slika 8 : Frekvence alelov <i>aspA</i> v populaciji .....	35
Slika 9: Frekvence alelov <i>glnA</i> v populaciji.....	35
Slika 10: Frekvence alelov <i>gltA</i> v populaciji.....	36
Slika 11: Frekvence alelov <i>tkt</i> v populaciji .....	36
Slika 12: Frekvence alelov <i>glyA</i> v populaciji .....	36
Slika 13: Frekvence alelov <i>uncA</i> v populaciji .....	36
Slika 14: Frekvence alelov <i>pgm</i> v populaciji.....	36
Slika 15: Dendrogram sorodnosti sevov izrisan glede na sekvenčni tip (ST) in klonski kompleks (CC), s prikazom pripadajočega <i>flaA</i> nukleotida ( <i>flaA</i> nuk) in <i>flaA</i> peptida ( <i>flaA</i> pep), vira, lokacije in obdobja izolacije sevov .....	39
Slika 16: Minimalno vpeto drevo (Minimal Spanning Tree) narejeno na podlagi rezultatov MLST, ki prikazuje genetsko sorodnost med sevi. Vsak krog predstavlja sekvenčni tip, velikost in črte v krogu pa število izolatov, ki se je uvrstilo v ta sekvenčni tip. Poleg sekvenčnih tipov so dopisani viri izolatov.....	40
Slika 17: Dendrogram sorodnosti sevov izrisan glede na mnogokratni PCR (mPCR) s prikazom pripadajočih sekvenčnih tipov (ST), klonskih kompleksov (CC) in tipizacije <i>flaA</i> ( <i>flaA</i> nukleotid in <i>flaA</i> peptid). Prikazani so tudi binarni rezultati mPCR, kjer 1 pomeni prisotnost gena, 0 pa odsotnost gena. Pod oznakama Multiplex 1 in 2 so slike gelske elektroforeze s PCR pomnoženih genov Cj0056c, Cj1139c, Cj1422c (Multipleks 1) in Cj0485c, Cj1324, Cj1720 (Multipleks 2).....	43

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih delov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)
<i>aspA</i>	aspartokinazni gen
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. lari</i>	<i>Campylobacter lari</i>
<i>C. upsaliensis</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
CC	klonski kompleks (angl. Clonal Complex)
CFU	število kolonijskih enot (angl. Colony Forming Units)
CGF	primerjalni genomske prstne odtis (angl. Comparative Genomic Fingerprinting)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dATP	deoksiadenozin trifosfat (angl. Deoxyadenosine Triphosphate)
dCTP	deoksicitozin trifosfat (angl. Deoxycytidine Triphosphate)
dGTP	deoksigvanin trifosfat (angl. Deoxyguanosine Triphosphate)
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat (angl. Deoxyribonucleotide Triphosphate)
dTTP	deoksitimin trifosfat (angl. Deoxythymidine Triphosphate)
dPCR	dvokratni PCR
EU	Evropska unija
<i>flaA</i>	gen za flagelin
<i>glnA</i>	gen za glutamin sintetazo
<i>gltA</i>	gen za citrat sintetazo
<i>glyA</i>	gen za serin hidroksilmetil transferazo
<i>hipO</i>	gen za hipurikazo O
MCGH	primerjalna genomska hibridizacija na mikromrežah (angl. Microarray-Based Comparative Genomic Hybridization)
MLEE	multilokusna encimska elektroforeza (angl. Multilocus Enzyme Electrophoresis)
MLST	sekvenciranje multilokusnih zaporedij (angl. Multilocus Sequence Typing)
mPCR	mnogokratni PCR
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PFGE	pulzna gelska elektroforeza (angl. Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
<i>pgm</i>	gen za fosfo - glukomutazo
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNK	ribonukleinska kislina

SDS - PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata
ST	sekvenčni tip
<i>tkt</i>	gen za transketolazo
<i>uncA</i>	gen za $\alpha$ podenoto ATP sintaze
UPMGA	metoda neponderirane aritmetične sredine (angl. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)
VBNC	živo, a negoljivo stanje (angl. Viable But Not Culturable)
WGS	sekvenciranje celotnega genoma (angl. Whole Genome Sequencing)

## 1 UVOD

Kampilobaktri so Gram negativne, nesporogene bakterije. So termotolerantne, mikroaerofilne bakterije in optimalno rastejo okrog nevtralnega pH območja.

Ker imajo številne mehanizme preživetja, so ubikvitarne in so prisotne tako v vodnih okoljih, kot tudi v prebavilih številnih divjih in rejnih živali. Kampilobaktri so komenzali v prebavnem traktu perutnine in številnih vrst divjih ptic. Ljudje se s kampilobaktri najpogosteje okužijo z uživanjem piščančjega mesa, znani pa so tudi primeri okužb preko neklorirane vode in nepasteriziranega mleka.

Piščanci pa se lahko kolonizirajo že med samo rejo na farmi, med transportom do klavnice ali vzdolž celotne klavne linije. Med rejo se piščanci s kampilobaktri lahko kolonizirajo preko kontaminirane vode, hrane, nastilja in preko ostalih živali kot so insekti ali glodalci, če so le ti prisotni na farmi. Med transportom so vir in vektor kolonizacije piščancev kletke, na klavni liniji pa vir kontaminacije predstavljajo navzkrižne kontaminacije preko klavne opreme, delavcev, procesne vode in zraka, ali preko ostalih kontaminiranih trupov piščancev.

Kampilobakterioze so tako od leta 2005 najpogostejše zoonoze v EU. Okužbe pa večinoma povzročata vrsti *C. jejuni* in *C. coli*.

Da bi odkrili vir okužb in način prenosa, so bile razvite številne metode tipizacije, ki se delijo na fenotipske in genotipske. Fenotipizacija določa lastnosti, ki jih organizmi izražajo, in so vidne pri fenotipu organizma, medtem ko genotipizacija analizira genetske elemente, in sicer bakterijsko DNK in RNK. Z genotipizacijskimi metodami lahko ocenimo stopnjo genetske raznolikosti dveh izolatov, kar s fenotipizacijo ni možno.

Trenutno so najpogosteje uporabljene genotipizacijske metode sekvenciranje multilokusnih zaporedij (MLST), tipizacija *flaA*, pulzna gelska elektroforeza (PFGE), primerjalna genomska hibridizacija na mikromrežah (MCGH), primerjalni genomske prstni odtisi (CGF), ter sekvenciranje celotnega genoma (WGS) (Taboada in sod., 2013).

Za vodne izolate je značilna velika genetska raznolikost, kar predstavlja težavo pri specifičnosti začetnih oligonukleotidov pri tipizaciji s PCR. Stabler in sod. (2013) so razvili hitro in cenovno ugodno tipizacijo mnogokratni PCR, kjer s pomnoževanjem 6 genov *C. jejuni* se veje razvrstimo v genetsko sorodne skupine.

## 1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE MAGISTRSKE NALOGE

### 1.1.1 Cilji magistrske naloge:

- Identificirati seve iz različnih virov (vzorcev iz proizvodne verige piščančjega mesa, končnih izdelkov in vode iz različnih virov) z mnogokratnim PCR in izbor sevov vrste *C. jejuni* za nadaljnje analize.
- Tipizirati seve *C. jejuni* na osnovi sekvenčne analize multilokusnih zaporedij (MLST) sedmih hišnih genov (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*) in variabilne regije gena *flaA*.
- Na osnovi določenih sekvenčnih tipov analiziranih sevov pojasniti izvor in analizirati širjenje kontaminacije z bakterijami *C. jejuni* vzdolž proizvodne verige piščančjega mesa.
- Pojasniti pomen nekaterih glavnih potencialnih virov in vektorjev okužbe, predvsem vode.

### 1.1.2 Delovne hipoteze magistrske naloge:

- Predvidevamo, da bomo med 159 sevi, vključenimi v identifikacijo vrste, potrdili 60-70 sevov *C. jejuni* za nadaljnje analize.
- Za bakterije *C. jejuni* je značilna velika genetska raznolikost, zato bomo na osnovi sekvenčne analize multilokusnih zaporedij potrdili to raznolikost, jo analizirali in prispevali k pojasnitvi virov in poti širjenja kontaminacije v proizvodni verigi (v primarni fazи, t.j. na farmi) in sekundarni fazи (tekom klavnih postopkov do končnega izdelka).
- Predvidevamo, da bomo potrdili vlogo vode kot ključnega izvora in vektorja okužbe.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ROD *Campylobacter*

Rod *Campylobacter* spada v kraljestvo Bacteria, deblo Proteobacteria, razred Epsilon Proteobacteria, red Campylobacterales in družino Campylobacteraceae (Vandamme in Ley, 1991). V rodu *Campylobacter* je 24 vrst in 8 podvrst (On, 2013).

Kampilobaktri so Gram negativne, nesporogene bakterije, ki so spiralne, upognjene oblike ali v obliku črke S. So gibljive in imajo en biček na enim ali obeh polih (Corcionivoschi in sod., 2009). Velike so 0,2 - 0,9 µm v širino in 0,2 - 0,5 µm v dolžino (Humphrey in sod., 2007). Če so izpostavljene stresu, lahko tvorijo celice sferične ali kokoidne oblike (Mangels, 2013).

Vrste *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* in *C. lari* so znane kot povzročiteljice zoonoz, med katerimi 95 % primerov okužb povzroča *C. jejuni*, 4 % *C. coli* in 1 % *C. upsaliensis* ali *C. lari* (Humphrey in sod., 2007; Mangels, 2013).

Prvič je o njih poročal Theodore Escherich leta 1886, ki jih je opisal kot bakterije spiralne oblike, katerih ni mogoče gojiti (Silva in sod., 2011). Leta 1960 so veterinarji odkrili spiralne organizme, ki so povzročali diarejo pri živalih, a jih niso okarakterizirali, vendar so jih lahko gojili mikroaerobno. Leta 1972 so kampilobaktre prvič izolirali iz človeškega fecesa. V obdobju od leta 1970 do 1980 so razvili komercialna selektivna gojišča za gojenje kampilobaktrov (Mangels, 2013).

### 2.2 RASTNI POGOJI KAMPILOBAKTROV

#### 2.2.1 Temperatura

Bakterije *Campylobacter* so termotolerantne in imajo optimalno temperaturo rasti pri 42 °C, ne rastejo pod 30,5 °C in nad 45 °C. Preživetje kampilobaktrov je boljše pri temperaturi hladilnika, kot pri sobni temperaturi. Zamrzovanje za en desetiški logaritem zmanjša število *C. jejuni*, a učinek je odvisen tudi od tipa hrane in temperature (Lake in sod., 2007).

#### 2.2.2 pH

*Campylobacter* spp. raste v območju pH od 4,9 do 9,5, optimalno od 6,5 do 7,5 (Lake in sod., 2007).

#### 2.2.3 Atmosfera

Bakterije potrebujejo za rast zmanjšano koncentracijo kisika, oz. so mikroaerofilne. Optimalno rastejo v atmosferi s 5 – 6 % kisika in 10 % ogljikovega dioksida. Preživijo tudi v modificirani atmosferi, vakuumskem pakiranju in pakiranju v normalni atmosferi, saj v

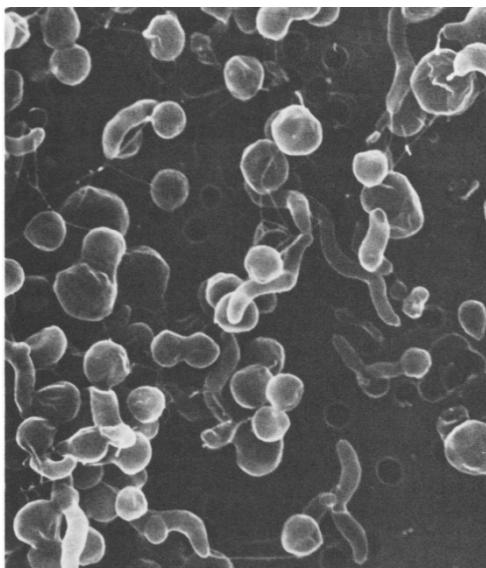
tem primeru z metabolno aktivnostjo ustvarijo okolje s povečano koncentracijo CO<sub>2</sub> (Lake in sod., 2007).

#### 2.2.4 Vodna aktivnost ( $a_w$ )

Bakterije optimalno rastejo pri  $a_w$  0,997 (= 0,5 % NaCl), minimalna vrednost  $a_w$  je 0,987 (= 2,0 % NaCl) (Lake in sod., 2007).

### 2.3 MEHANIZMI PREŽIVETJA

Bakterije *Campylobacter* spp. lahko v primeru neugodnih razmer v okolju, kot so primanjkovanje hrani ali oksidativni stres, preidejo v stanje VBNC. Celice se iz gibljive oblike spiralnih celic spremenijo v celice kokoidne oblike (Murphy in sod., 2006; Rollins in Colwell, 1986; Trachoo, 2003). Na podlagi številnih raziskav lahko povzamemo, da bakterije lahko iz VBNC stanja preidejo nazaj v metabolno aktivno obliko in lahko povzročijo okužbo, verjetnost kolonizacije z VBNC *Campylobacter* spp. pa je odvisna tako od seva mikroorganizma, kot tudi od vrste živali (Murphy in sod., 2006; Trachoo, 2003).



Slika 1: Slika prehoda iz metabolno aktivnih celic kampilobaktrov v VBNC stanje (Rollins in Colwell, 1986)

Kampilobaktri prav tako lahko tvorijo biofilme, ki jim omogočajo preživetje v ekstremnih okoljih (Murphy in sod., 2006). Biofilmi predstavljajo konstanten inokulum teh bakterij v vodnih sistemih, živinorejskih obratih, na procesnih linijah, in tako predstavljajo vir okužb tako za domače živali, kot tudi za ljudi (Buswell in sod., 1998; Zimmer in sod., 2003; Reeser in sod., 2007). Na tvorbo biofilma vplivajo številni okoljski dejavniki. Reeser in sod. (2007) so preučevali tvorbo biofilma na abiotskih površinah. Ugotovili so, da čim več je prisotnih hrani, tem slabša je tvorba biofilma. Prav tako na tvorbo biofilma neugodno vpliva višanje koncentracija osmolitov, kot so glukoza, saharosa in NaCl. Pri optimalnih temperaturah in koncentraciji kisika pa bo to vplivalo tudi na biofilm. Ugotovili so

tudi, da je za tvorbo biofilma potrebna sinteza proteinov. Pomembno vlogo pri tvorbi pa imajo tudi bički in signaliziranje s kvorumom (Murphy in sod., 2006). Pomemben mehanizem preživetja predstavljajo tudi dvokomponentni regulatorji, ki zaznajo in reagirajo na spremembe okolja z regulacijo genov. Dvokomponentni signalni transduksijski sistemi so sestavljeni iz senzorne histidin kinaze v citoplazmi, ki zazna spremembe zunanjega okolja in regulatorja na citoplazemski membrani, ki z regulatorno mrežo odgovori na spremembe stimulusov iz okolja (Murphy in sod., 2006).

## 2.4 PATOGENEZA

Zaradi številnih razlik v patogenezi kampilobaktrov v primerjavi z ostalimi patogenimi bakterijami, specifični mehanizem virulence še ni dobro znan, saj kampilobaktri ne izkazujejo velikega števila virulentnih faktorjev (Silva in sod., 2011; Dasti in sod., 2009). Kot virulentni faktorji so bili identificirani: gibanje s flageli, adherenca na mukozo intestinalnega trakta, invazivnost in zmožnost tvorbe toksinov (Silva in sod., 2011).

Infektivna doza *C. jejuni* variira med sevi, a je lahko tudi nižja od 500 mikroorganizmov, običajno pa se giblje od 800 do  $2 \times 10^9$  mikroorganizmov (Zoete in sod., 2006; Adedayo in Kirkpatrick, 2008). Po zaužitju *C. jejuni* je inkubacijska doba običajno od 24 do 72 ur, v primeru zaužitja manjšega števila mikroorganizmov pa je lahko inkubacijska doba tudi daljša od 1 tedna (Blaser, 1997). Po zaužitju bakterij se te s pomočjo flagel premaknejo preko intestinalnega mukusa in se delijo v ileumu in kolonu. Do poškodbe črevesnih epitelnih celic lahko pride neposredno, zaradi invazije ali posredno zaradi vnetnega odziva (Adedayo in Kirkpatrick, 2008). Takrat se pojavijo klinični znaki, ki se kažejo kot akutna vodena ali krvava diareja, pogosto z akutnimi abdominalnimi krči, ki spominjajo na bolečine ob vnetju slepiča, slabost, redkeje bruhanje in povisano telesno temperaturo (Zoete in sod., 2006; Blaser, 1997; Butzler, 2004). Pri kampilobakteriozi se zaradi širjenja bakterij iz gastrointestinalnega trakta lahko pojavijo tudi zapleti. Ti so vnetje žolčnika, vnetje trebušne slinavke, peritonitis, gastrointestinalne krvavitve in Guillain-Barre'jev sindrom (GBS). Pojavijo se redko in lahko vključujejo meningitis, endokarditis, septični artritis, osteomielitis in neonatalno sepso. Bakteriemija se pojavi pri 1 % pacientov (Allos, 2001).

## 2.5 EPIDEMIOLOGIJA

Kampilobakterioze so od leta 2005 najpogosteje zoonoze v EU. V letih od 2008 do 2011 pa se je njihovo število še povečalo. V letu 2011 je bilo prijavljenih okužb s kampilobaktri 220.209, kar je 50,28 / 100.000 prebivalcev (EFSA, 2013). V Sloveniji je bilo leta 2010 prijavljenih 999 okužb, kar je 48,9 / 100.000 prebivalcev. Incidenca se je tako v primerjavi z letom 2009 (45 / 100.000 prebivalcev) zvišala za skoraj 8 % (VURS, 2010).

Kampilobaktri so komenzali v prebavnem traktu perutnine in mnogih vrst divjih ptic (Corry in Atabay, 2001). Te bakterije najdemo pri rejnih živalih, kot so perutnina, živila, prašiči in ovce (EFSA, 2013). Ljudje se najpogosteje okužijo z uživanjem kontaminiranega mesa in mesnih izdelkov piščancev, ki niso dovolj topotno obdelani. Pogost vir okužb pa so tudi navzkrižne kontaminacije pri pripravi topotno neobdelane hrane, ki je prišla v stik s kontaminiranim mesom (Dasti in sod., 2009; Wilson in sod., 2008). Do kontaminacije hrane lahko pride tudi preko okuženega osebja, ki rokuje s hrano (Olsen in sod., 2001). Širjenje iz človeka na človeka ni pogosto (Dasti in sod., 2009). Možna je tudi perinatalna okužba novorojenčkov (Butzler, 2004). Vir okužb predstavlja tudi pitje nepasteriziranega mleka in neklorirane ali kontaminirane pitne vode (Wilson in sod., 2008; Young in sod., 2007; Schonberg-Norio in sod., 2004). Bakterije *C. jejuni* so izolirali iz številnih živali, kot so: zajci, glodavci, divje ptice, muhe, ježi, jeleni, jazbeci, veverice, tjljni, voluharji in lisice (Stabler in sod., 2013). Pomembnejši vir prenosa kampilobaktrov v okolju predstavljajo iztrebki prežvekovalcev in divjih ptic. French in sod. (2008) so tako ugotovili, da so v svežih in v posušenih ptičjih iztrebkih na površinah otroškega igrišča (les, beton, zemlja, lubje, plastika in travna površina) prisotni kampilobaktri, ki lahko predstavljajo vir okužb. Pomembeni vir prenosa so tudi vodni viri, kot so reke, potoki in jezera, saj so znani primeri okužbe s kampilobaktri med plavanjem (Schonberg-Norio in sod., 2004). Te bakterije namreč v vodnem okolju lahko tvorijo biofilme, ki jim omogočajo daljše preživetje, prav tako pa jim rezervoar lahko predstavljajo amebe prisotne v vodi (Reeser in sod., 2006; Axelsson-Olsson in sod., 2005). Vir okužb lahko predstavljajo tudi hišni ljubljenčki, kot so psi in mačke, ki pa ne predstavljajo rezervoarja za te bakterije (Sheppard in sod., 2009).

## 2.5.1 Kolonizacija piščancev med rejo in vzdolž klavne linije

### 2.5.1.1 Dejavniki tveganja za kolonizacijo s kampilobaktri med rejo

EFSA (2011) navaja, da se piščanci lahko kolonizirajo s kampilobaktri z vertikalnim prenosom, kar predstavlja prenos kontaminacije v jajce v genitalnem traktu kokoši. Vertikalni prenos pa je možen tudi preko fekalne kontaminacije jajčne lupine (EFSA, 2011). Pomembnejša dejavnika sta starost piščancev in letni čas. Čim starejši je piščanec, tem večja je verjetnost kolonizacije. Le te so pogostejše v poletnih, v primerjavi z zimskimi meseci (Barrios in sod., 2005; Hue in sod., 2010). Tveganje predstavlja tudi redčenje jat, saj pri tem postopku pride v stik s piščanci več ljudi in opreme, ki prav tako predstavljajo dejavnik tveganja (EFSA, 2011). Piščanci se lahko kolonizirajo tudi preko kontaminirane vode, krme, stelje in aerosola (Newell in Fearnley, 2003; Jonsson in sod., 2012). Vir kolonizacije pa lahko predstavljajo tudi insekti, predvsem muhe (Hald in sod., 2004). Potrebno je preprečevanje stika piščancev z divjimi živalmi, pticami in govedom, ter njihovimi iztrebki, saj tudi ti lahko predstavljajo vir kolonizacije. V primeru, da se jata kolonizira s kampilobaktri, se te bakterije razširijo v okolje farme, prav zato pa je

potencialen vir kampilobaktrov tudi predhodno kolonizirana jata na isti farmi (EFSA, 2011). Kolonizacije s kampilobaktri se hitro širijo znotraj jate in po podatkih študije Gerwe in sod. (2008), en koloniziran piščanec na dan kolonizira 2,37 piščanca, kar pomeni, da bo v jati z 20.000 piščanci v 1 tednu koloniziranih kar 95 % piščancev.

#### 2.5.1.2 Dejavniki tveganja za kontaminacijo s kampilobaktri med transportom do klavnice

Največjo nevarnost za kontaminacijo s kampilobaktri med transportom predstavljajo kletke, v katerih se zadržuje veliko piščancev v zelo majhnem prostoru (Hastings in sod., 2010; Hansson, 2005). Piščanci v tem času tudi nimajo dostopa do vode in hrane, tako da sta ta dva dejavnika izključena. Prisoten pa je stres, ki zveča možnost kontaminacije (EFSA, 2011).

#### 2.5.1.3 Dejavniki tveganja za kontaminacijo s kampilobaktri med klavnim procesom

Trupi piščancev se lahko kontaminirajo med celotnim klavnim procesom z navzkrižno kontaminacijo preko kontaminirane opreme, delovnih površin, procesne vode, zraka ali kontaminiranih trupov ostalih piščancev. Vir kontaminacij prav tako predstavlja evisceracija. Po klavnem procesu in hlajenju so trupi sortirani, in ta postopek zopet predstavlja nevarnost za kontaminacijo. Po sortiranju pa sledi razkosavanje trupov, kjer je zopet nevarnost kontaminacije preko opreme za razkosavanje. Iz nekaterih delov se odstrani koža, kar običajno zmanjša število kampilobaktrov (EFSA, 2011).

Pri Evropski komisiji za varno hrano so leta 2008 naredili študijo, v katero je bilo vključenih 561 klavnic in 28 evropskih držav (EFSA, 2010). Ugotovili so, da dejavnik tveganja predstavlja predhodna kolonizacija piščancev s kampilobaktri, saj so se kontaminacije s kampilobaktri 30 x pogosteje pojavljale pri proizvodih, predhodno koloniziranih piščancev. Ti rezultati so v skladu s pričakovanji, saj se je tekom klavnega procesa nemogoče popolnoma izogniti kontaminaciji trupov s črevesno vsebino (EFSA, 2011). Prav tako pa so se kontaminacije trupov s kampilobaktri pojavljale tudi pri predhodno nekontaminiranih piščancih, kar kaže na navzkrižno kontaminacijo tekom klavnega procesa. Kolonizacije s kampilobaktri so bile prav tako številčnejše pri starejših piščancih, pri piščancih, zaklanih kasneje v istem dnevu in v obdobju od julija do septembra. Pojavljale pa so se tudi razlike med posameznimi državami in klavnicami znotraj posameznih držav, kar kaže na razlike v preventivi in kontroli med posameznimi klavnicami in državami (EFSA, 2010).

## 2.6 TIPIZACIJA KAMPILOBAKTROV

Tipizacijske metode temeljijo na ideji, da imajo klonsko sorodni izolati skupne lastnosti, ki jih lahko testiramo in na podlagi katerih lahko ločimo sorodne od nesorodnih izolatov (Arbeit, 1995; Eberle in Kiess, 2012).

Znana sta dva glavna načina tipizacije in sicer fenotipska in genotipska tipizacija. Pri fenotipski tipizaciji določamo lastnosti, ki jih organizmi izražajo, medtem ko so v metode genotipske tipizacije vključene analize genetskih elementov, to sta bakterijski DNK in RNK (Arbeit, 1995; Eberle in Kiess, 2012).

Metode, uporabljene pri tipizaciji, morajo ustrezati osnovnim kriterijem, kot so zmožnost tipizacije, ponovljivost, stabilnost, občutljivost, moč razlikovanja in nezahtevna interpretacija (Stuelens in sod., 1996; Eberle in Kiess, 2012). Eden od najpomembnejših kriterijev je moč razlikovanja, ki predstavlja zmožnost ločiti med genetsko sorodnimi sevi (Wassenaar in Newell, 2000; Wassenaar, 2000). Moč razlikovanja je pri genotipizacijskih metodah običajno boljša kot pri fenotipizacijskih, saj pri genotipski tipizaciji lahko dobimo večje število različnih podtipov. Z genotipizacijo lahko ocenimo stopnjo genetske različnosti, kar s fenotipizacijskimi metodami na moremo ugotoviti. Slaba stran fenotipizacijskih metod je tudi, da so na splošno odvisne od izražene lastnosti fenotipa, na kar lahko vplivajo pogoji gojitve, starost kulture itd. Pri fenotipizacijskih metodah je prisoten visok delež sevov, ki jih ni mogoče tipizirati zaradi slabe ekspresije določene fenotipske lastnosti, problemi so tudi pri ohranjanju kultur v laboratoriju in primerljivosti rezultatov z ostalimi laboratoriji. Pri genotipizacijskih metodah so genotipi običajno stabilni in neodvisni od pogojev gojenja. Večina genotipizacijskih metod ima tudi višjo zmožnost tipizacije in višjo primerljivost rezultatov med laboratorijskimi metodami (Wassenaar, 2000).

K fenotipizacijskim metodam za tipizacijo kampilobaktrov uvrščamo biotipizacijo, tipizacijo z antibiogramom, serotipizacijo, fagno tipizacijo, multilokusno encimsko elektroforezo (MLEE) in SDS-PAGE (Engberg, 2006).

Genotipske metode pa delimo na:

- Metode, ki temeljijo na RFLP: REA, PFGE, ribotipizacija
- Metode, ki temeljijo na pomnoževanju s PCR: pomnoževanje 23S rDNK, RAPD, DGGE
- Metode, ki kombinirajo RFLP in metodo PCR: PCR-RFLP (restrikcija pomnožkov PCR), AFLP
- Metode, ki temeljijo na sekvenciranju: MLST, tipizacija *flaA*
- Tipizacija genoma: DNK mikromreže za celoten genom (Engberg, 2006).

Molekularne metode, ki se trenutno najpogosteje uporabljajo za tipizacijo kampilobaktrov so: sekvenciranje multilokusnih zaporedij (MLST), tipizacija *flaA*, pulzna gelska elektroforeza (PFGE), primerjalna genomska hibridizacija na mikromrežah (MCGH), primerjalni genomski prstni odtis (CGF), ter sekvenciranje celotnega genoma (WGS) (Taboada in sod., 2013).

### **2.6.1 Sekvenciranje multilokusnih zaporedij - MLST (Multilocus sequence typing)**

Sekvenciranje multilokusnih zaporedij (MLST) je metoda identifikacije izolatov z identičnimi ali sorodnimi genotipi (kloni ali klonski kompleksi) (Spratt, 1999). S to metodo lahko določimo stopnjo klonalnosti bakterijske populacije, ne moremo pa določiti kako pogosto se genski prenosi dogajajo (Wassenaar, 2002).

Pri MLST hišnih genov pridobimo pomnožke PCR, ki jih kasneje sekvenciramo. Značilnost hišnih genov je, da so ti geni pod neznanim selekcijskim pritiskom, a so kljub temu dovolj raznoliki, da ima ta metoda veliko moč razlikovanja. Hišni geni imajo omejeno število alelov, in ti se pojavljajo v različnih kombinacijah znotraj populacije. Alel z drugačno kombinacijo nukleotidov kaže na horizontalni genski prenos ali na mutacijo. Podatki, ki jih pridobimo s študijo populacije, predstavljajo vsoto vseh genskih prenosov in mutacij v preteklosti. Četudi so se genski prenosi pojavljali redko, s to metodo zaznamo tiste, ki so se ohranili v populaciji. Metoda MLST je tako manj primerna za kratkotrajno molekularno epidemiologijo, kjer preučujemo gene, ki so pod velikim selekcijskim pritiskom (Wassenaar, 2002).

MLST v primerjavi z drugimi fenotipizacijskimi metodami (npr. serotipizacija) dobro loči in je bolje prenosljiva in ponovljiva kot ostale tipizacijske metode (npr. PFGE) (Taboada in sod., 2013). Dobra prenosljivost pomeni, da material, ki je potreben za analizo brez težav transportiramo, saj pri tej metodi potrebujemo le izolirano DNK oz. suspenzijo mrtvih celic. Poleg tega so protokoli dela in zaporedja začetnih oligonukleotidov dostopni v elektronski obliki, metoda MLST pa je avtomatizirana (Urwin in Maiden, 2003).

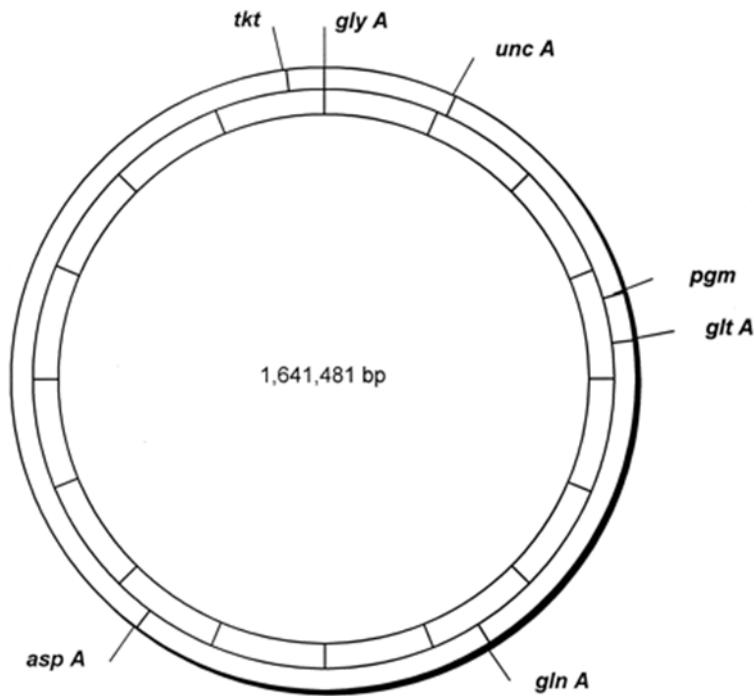
Baza podatkov na medmrežju vsebuje alelne profile in epidemiološke podatke, ki so dostopni na strani: <http://mlst.zoo.ox.ac.uk>. Stran omogoča uporabnikom, da vstavijo sekvence sedmih MLST lokusov v sedem oken na spletni strani in tako pridobijo alelni profil njihovega seva. Alelni profil lahko primerjajo z ostalimi sevi, ki so v bazi podatkov (Enright in Spratt, 1999).

Ta metoda tipizacije temelji na istih principih tipizacije kot metoda MLEE (multilokusna encimska elektroforeza), saj obe metodi kažeta variacije v hišnih genih (Urwin in Maiden, 2003). MLEE analizira elektroforetsko mobilnost hišnih encimov v škrobnem gelu in izenači različne variante vsakega encima z aleli v genskem lokusu za ta encim. Aleli v vsakem lokusu določajo elektroforetski tip, ki je ekvivalenten sekvenčnemu tipu pri MLST

(Urwin in Maiden, 2003; Enright in Spratt, 1999). Četudi ima metoda MLEE glavno vlogo v uvedbi bakterijske epidemiologije, je ta metoda tehnično neugodna in ni široko uporabna pri rutinskem nadzoru. Dodaten problem MLEE je tudi primerljivost dobljenih rezultatov med različnimi laboratoriji, kar pri MLST ne predstavlja težav (Urwin in Maiden, 2003; Enright in Spratt, 1999). Četudi je pri MLEE v vsakem lokusu analiziranih le nekaj variant, z analizo 20 in več lokusov dobimo visoko ločljivost, a MLST v primerjavi z MLEE vseeno bolje loči nukleotide, saj pride do podobnega rezultata z analizo manjšega števila lokusov (7 lokusov dolžine 450 - 500 bp) (Urwin in Maiden, 2003; Enright in Spratt, 1999; Maiden in sod., 1998). Identifikacijo alelov pri MLST pridobimo s sekvencanjem, medtem ko lahko pri MLEE enaka mobilnost na gelu pomeni enako, podobno ali povsem različno sekvenco (Spratt, 1999).

#### 2.6.1.1 MLST za *C. jejuni*

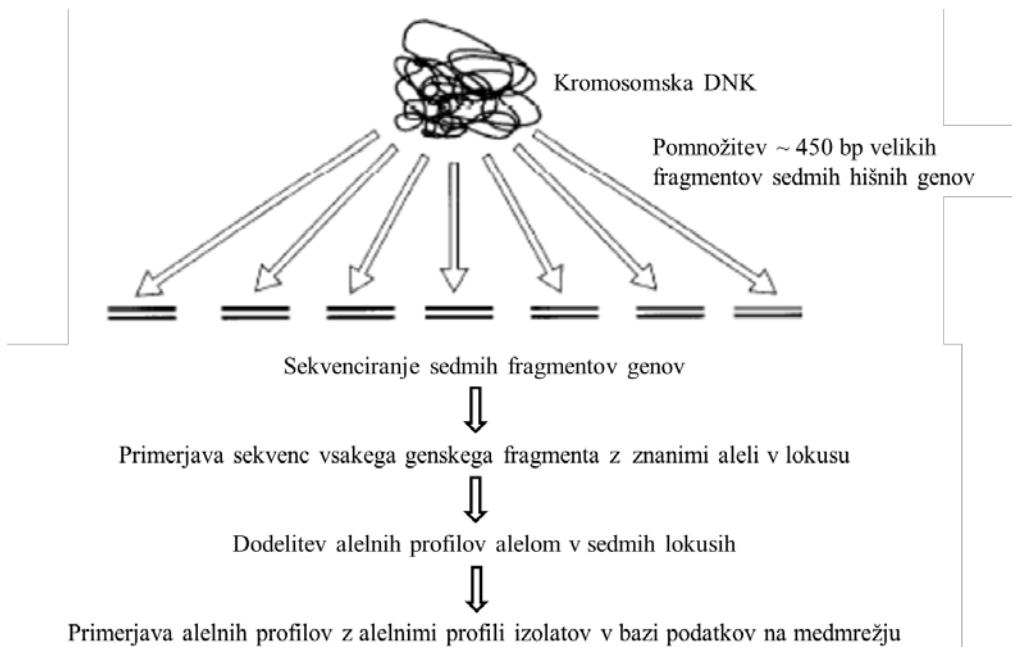
Dingle in sod. (2001) so razvili MLST shemo za *C. jejuni*, ki temelji na nukleotidnih zaporedjih 7 lokusov hišnih genov za produkcijo proteinov. Ti proteini so: aspartaza A (*aspA*), glutamin sintetaza A (*glnA*), citrat sintaza (*gltA*), serin hidroksimetiltransferaza (*glyA*), fosfoglukomutaza (*pgm*), transketolaza (*tkt*) in  $\alpha$  podenota ATP sintaze (*uncA*).



Slika 2: Lokacija MLST lokusov na kromosому referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 (Dingle, 2001).

Vsakemu sekvenciranemu produktu PCR teh 7 lokusov (*asp*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *uncA*, *tkt*) je dodeljena alelna številka, na podlagi ujemanja z alelom v bazi podatkov na strani PubMLST (Jolley in Maiden, 2010). Vsak izolat je tako označen s 7 alelnimi številkami.

Na podlagi razvrstitev alelnih številk je dodeljen sekvenčni tip (ST) oz. alelni profil v skladu z bazo podatkov PubMLST (Jolley in Maiden, 2010). S programom BURST so sekvenčni tipi, ki imajo več kot 4 enake alele, razvrščeni v isti klonski kompleks (CC) (Dingle in sod., 2001; Taboada in sod., 2013).



Slika 3: Shema MLST tipizacije (Spratt, 1999).

Odnosi med izolati se kažejo s primerjavo alelnih profilov, kjer imajo bolj sorodni organizmi iste sekvenčne tipe oz. sekvenčne tipe, ki se razlikujejo v nekaj lokusih, medtem ko imajo nesorodni izolati različne sekvenčne tipe (Urwin in Maiden, 2003).

Sorodstvene odnose med sevi prikažemo z dendrogramom in tako dobimo filogenetsko informacijo, s katero lahko razjasnimo izvor sevov (Spratt, 1999).

#### 2.6.1.2 Uporaba MLST v epidemioloških študijah

Na Švedskem nacionalnem monitoringu kampilobaktrov pri piščancih, kjer so izolacije sevov potekale več kot 10 let, so 100 sevov *C. jejuni* iz 56 farm, izoliranih iz slepega črevesa piščancev, z analizo MLST razvrstili v 44 različnih ST. 60 % izolatov so uvrstili v 3 klonske komplekse: ST-21, ST-45 in ST-48, za katere je značilno, da so v večjem delu sveta med najpogostejšimi pri humanih izolatih, prisotni pa so tudi pri perutnini in ostalih farmskih živalih. Tem CC je po pogostnosti sledil ST-1034, ki se glede na podatke iz MLST baze najpogosteje pojavlja pri izolatih iz divjih ptic, izolirali pa so ga tudi iz humanih vzorcev, piščancev, okolja in ostalih živali. Prav tako so klonski kompleksi, ki so bili odkriti v tej študiji, bili izolirani tudi iz humanih vzorcev (Griekspoor in sod., 2009).

V ZDA so Colles in sod. (2010) primerjali izolate populacij *C. coli* (43 izolatov) in *C. jejuni* (179 izolatov) pri piščancih proste reje pred in po klavnem procesu. Najpogostejši klonski kompleks je bil ST-354, ki se je pojavil pri 28,8 % (64 / 222) živih piščancev, sledil pa mu je ST-443, ki se je pojavljal pri 18 % (40 / 222) piščancev. Ta dva klonska kompleksa sta bila prav tako najpogostejša pri zaklanih piščancih, tu se je ST-443 pojavil pri 16,8 % in ST-354 pri 16 %. Trije sekvenčni tipi *C. jejuni* ST-257, ST-1496 in ST-1532 so bili prisotni pri živih piščancih, pri zaklanih pa ne. Pri trupih piščancev po zakolu pa so bili prisotni sekvenčni tipi ST-433, ST-606 in ST-1491, ki niso bili prisotni pri živih piščancih. Dokazali so, da proces klanja in klavniška oprema zvečata pestrost genotipov kampilobaktrov, izoliranih iz jate, in da so sekvenčni tipi ST-51, ST-573, ST-607 in ST-814 razširjeni v industriji.

Wirz in sod. (2010) so v študiji tipizirali 340 izolatov kampilobaktrrov iz švicarskih klavnih linij. Vzorce so pridobili iz kože vratu piščancev po hlajenju in iz vzorcev slepega črevesa, ki so bili odvzeti takoj po zakolu. Določili so 65 različnih sekvenčnih tipov, od teh jih je bilo 6 novih. Prevladujoči klonski kompleksi pri *C. jejuni* pa so bili CC21, CC45 in CC257. Večina ST in CC, ki so jih tipizirali pri tej študiji, so bili opisani tudi v drugih deželah pri perutnini, nekaj pa je bilo tudi iz lokalnih virov. Rezultati kažejo, da so bili kampilobaktri prisotni zaradi »samo-kontaminacije« zaklanih piščancev, a tudi navzkrižna kontaminacija trupov ne more biti izključena.

Allen in sod. (2006) so s študijo kontaminacije trupov piščancev tekom klavnega procesa v povezavi s kolonizacijo jat ugotovili, da so se nekontaminirani trupi piščancev kontaminirali s kampilobaktri z navzkrižno kontaminacijo tekom klavnega procesa in to pri 2 od 5 negativnih jat. Prav tako so bili podtipi pri kontaminiranih jatah enaki kot pri vzorcih iz slepega črevesa teh jat, razen pri eni jati, kjer se ti podtipi niso ujemali. Razlog za to je lahko v različnih preživetvenih časih različnih sevov tekom klavnega procesa.

V Veliki Britaniji so Colles in sod. (2003) v študiji karakterizacije 112 izolatov iz farme (perutnina, govedo, ovce, ograda in blato), preučevali raznolikost *C. jejuni*, in primerjali te izolate s humanimi izolati. Izolati so se uvrstili v 30 različnih sekvenčnih tipov, med katerimi so bili najpogostejši ST-45, ST-42, ST-61 in ST-262. Klonski kompleks ST-21 je bil najbolj razširjen in je bil prisoten pri 8 od 10 različnih virov. V članku pojasnjujejo, da je vzrok tako široke razširjenosti tega kompleksa v tem, da so sevi v tem kompleksu dobro prilagojeni in tako dlje čas preživijo v okolju. Pri piščancih in puranih je prevladoval ST-45, ki pa je bil odsoten pri ovčjih vzorcih. Poleg ST-45 pa je bil pri piščancih prisoten še ST-21. Ugotovili so, da se genetska pestrost pri vzorcih iz farme ujema z genetsko pestrostjo pri humanih vzorcih in pri vzorcih iz hrane v trgovini. Ti rezultati kažejo na to, da je populacija *C. jejuni* na farmi vir kontaminacije hrane in vir humanih infekcij in da je metoda MLST primerna za identifikacijo in primerjavo genotipov izolatov *C. jejuni*.

Bull in sod. (2006) so identificirali vir kolonizacije s kampilobaktri pri desetih jatah piščancev v treh perutninskih družbah iz Velike Britanije. Vzorčili so rejce, očiščene in

dezinficirane farme pred vselitvijo piščancev, piščance in okolje zunaj farme med rejo piščancev. Sedem izmed desetih jat je bilo koloniziranih med rejo, in sicer je bilo pet jat koloniziranih s *C. jejuni*, ena s *C. coli*, in ena z obema. V jati so bili sprva zaznani sevi *C. coli*, a jih je hitro zamenjal *C. jejuni* ST-791, ki je prevladoval do 28. dneva. V klavnici pa sta bila najpogostejsa ST-791 in ST-354. Kampilobaktri so bili prav tako izolirani iz okolja okrog farme pri šestih izmed sedmih koloniziranih jat in pri treh negativnih jatah. Pri negativnih jatah so bili negativni tudi nastilja, hrana, voda in zrak zunaj farme. Pri koloniziranih jatah pa so bili kampilobaktri prisotni pri 3/18 vzorcev nastilja, 1/19 v hrani, 4/13 v vodi in 15/248 pri vzorcih zraka. Kampilobaktri so bili prisotni tudi na kletkah za transport piščancev do klavnice, in sicer na 26 od 45 kletkah. Tako lahko k viru kontaminacije s kampilobaktri štejemo tudi kletke, saj so pri dveh na farmi negativnih jatah ob prihodu v klavnicu, te bile po transportu pozitivne.

Hastings in sod. (2010) so prav tako z metodo MLST tipizirali seve kampilobaktrov, ki so prisotni na kletkah po procesu dekontaminacije za transport piščancev in tako predstavljajo vir kontaminacije in prenosa kampilobaktrov. Za analizo MLST so izolirali 89 izolatov, ki so se razvrstili v 16 sekvenčnih tipov. Kar 80 % izolatov pa se je uvrstilo v štiri klonske komplekse: ST-45, ST-354, ST-574 in ST-661. Klonska kompleksa ST-418 in ST-4227 sta bila prisotna pred čiščenjem kletk, po čiščenju pa so prevladali drugi klonski kompleksi. Vzroki, zakaj so se po procesu dekontaminacije kletk pojavljali različni sekvenčni tipi in klonski kompleksi še niso povsem pojasnjeni. Možen vzrok za različno preživetje določenega genotipa je v tem, da so določeni genotipi (npr. ST-45) bolje adaptirani na preživetje zunaj gostitelja (Sopwith in sod., 2008).

### 2.6.2 Tipizacija *flaA*

Aleli flagelina, ki je strukturni protein bička in virulentni dejavnik, so zunaj vrst zelo variabilni in tako primerni za ločevanje bakterij na nivoju sevov. Geni za flagelin se pod selekcijskim pritiskom izmenjujejo med sevi in tako lahko imata dva seva identična *flaA* tipa. Za pravilno identifikacijo izolatov moramo zato tipizacijo *flaA* kombinirati še z drugo neodvisno metodo (Wassenaar, 2002).

Tipizacija *flaA* obsega PCR pomnožitev genov *flaA* in sekvenciranje produkta PCR (Taboada in sod., 2013). Nachamkin in sod. (1993) so razvili RFLP analizo gena *flaA* za *C. jejuni*. Z reakcijo PCR so pomnožili gen *flaA*, pomnožek so nato razgradili z restriktionskim encimom *DdeI*, dobljene fragmente pa so ločili z agarozno gelsko elektroforezo. Rezultate so primerjali s predhodno narejeno serotipizacijo in ugotovili 100 % povezavo HL serotipov in *flaA*-tipov. S temi rezultati so dokazali, da bi se tipizacija *flaA* lahko uporabila kot alternativa serotipizacije in kot tipizacijska metoda za klinične in epidemiološke raziskave.

Modificirana metoda tipizacije *flaA* temelji na sekvenciranju 321 bp velike kratke variabilne regije (SVR) gena *flaA* (Taboada in sod., 2013). Mainersmann in sod. (1997) so s sekvenciranjem kratke variabilne regije gena *flaA* dobili dendrogram, podoben dendrogramu, pridobljenem z analizo celotnega gena. Z reakcijo PCR so pridobili šablono za nadaljnje sekvenciranje, za katero so začetne oligonukleotide konstruirali s hibridizacijo konzervativnih regij, ki obdajajo kratko variabilno regijo. Prednost analize kratke variabilne regije je, da je enostavno sekvencirana, saj potrebujemo le en par začetnih oligonukleotidov, ki se vežejo na konzervativne sekvence, ki obdajajo to regijo, medtem ko bi za analizo celotnega genoma potrebovali več začetnih oligonukleotidov. Tako je sekvenciranje kratke variabilne regije *flaA* lahko uporabna metoda za epidemiološke raziskave in se lahko uporablja kot dopolnilna metoda ostalim subtipizacijskim metodam ali jih celo nadomesti.

Dingle in sod. (2005) so tipizacijo *flaA* uporabili kot dopolnilno metodo k MLST. Poleg *C. jejuni* so z MLST tipizirali tudi *C. coli*. Obe vrsti so najprej identificirali z mnogokratnim PCR, kjer so uporabili začetne oligonukleotide za pomnožitev hipurikaznega gena (*hipO*) pri *C. jejuni* in *glyA* gena za *C. coli*, kot so predhodno naredili že Wang in sod. (2002). Z metodo MLST v kombinaciji s sekvenciranjem *flaA* SVR so tako dobili dobro ločbo med sevi, kar je uporabno tudi za nadaljnje raziskave epidemiologije ljudi in za odkrivanje virov teh okužb.

### 2.6.3 Pulzna gelska elektroforeza - PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis)

Metoda PFGE je od leta 1983, ko so jo opisali Schwarz in sod., predstavljala zlati standard epidemioloških analiz za številne patogene bakterije. Leta 2001 so Ribot in sod. razvili standardni protokol za tipizacijo *C. jejuni*, ki izhaja iz predhodnih protokolov za PFGE za ostale patogene bakterije.

Pri metodi PFGE z restriktionskim encimom, katerega značilnost je, da ne reže pogosto, razgradimo bakterijsko DNK, tako da dobimo 10 - 30 fragmentov. Ker pa so ti fragmenti pogosto preveliki (20 - 200 kbaz), da bi jih ločili z običajno agarozno gelsko elektroforezo, jih ločimo s spremjanjem smeri električnega polja tekom elektroforeze (Wassenaar in Newell, 2000; Engberg, 2006). Metoda PFGE ima številne prednosti, in sicer je občutljiva in dobro loči, saj ima visok diskriminatorični indeks. Zaradi dostopnosti protokolov dela na medmrežju, na spletni strani PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulseNet>), je omogočena primerljivost rezultatov med različnimi laboratoriji (Engberg, 2006). Slabosti metode PFGE so občutljivost na genetsko nestabilnost bakterij, tvorba DNA - ze pri nekaterih sevih kampilobaktrov, prav tako pa encimi, ki se uporabljajo za profiliranje PFGE, ne razgradijo DNK nekaterih sevov (Engberg, 2006).

V primerjavi z MLST je metoda PFGE bolj občutljiva na variacije v genomu, saj z metodo MLST preučujemo nukleotidno zaporedje, a ne vidimo velikih genomskeh preureditev. Tako je metoda PFGE bolj diskriminatorna pri vrstah z veliko genomskeimi otoki, insercijskimi sekvencami in ostalimi mobilnimi elementi. Prav tako za izvedbo PFGE, v primerjavi z MLST, ne potrebujemo natančnih informacij o genomu (Cooper in Feil, 2004).

Metodo PFGE so uporabili pri številnih študijah raznolikosti *C. jejuni* pri piščancih in za epidemiološke študije, ter odkrivanje virov prenosa kapilobaktrov med revo na farmah (Petersen in sod., 2001; Messens in sod., 2009; Thakur in sod., 2013). Prav tako so metodo PFGE uporabili za spremljanje pojavljanja in dinamike *C. jejuni* in ostalih termofilnih kampilobaktrov med revo in klavno verigo (Höök in sod., 2005; Melero in sod., 2012; Klein in sod., 2007; Damjanova in sod., 2011; Gruntar in sod., 2009), ter pokazali na možnost prenosa kontaminacije tudi v prodajni mreži (Zorman in sod., 2006), ter do končnega potrošnika (Zorman in sod., 2006; Uzunović - Kamberović, 2007).

#### **2.6.4 Primerjalna genomska hibridizacija na mikromrežah - MCGH (Microarray-based comparative genomic hybridization)**

Z metodo primerjalne genomske hibridizacije na mikromrežah v enem samem eksperimentu določimo prisotnost več tisočih genov. Metoda temelji na različno označenih odsekih DNK testnega in referenčnega seva, ki ju hibridiziramo na mikromreži. Z različnimi signali hibridizacije lahko določimo predpisano število sprememb in določimo stopnjo različnosti. Ta metoda tako omogoča primerjalne genomske analize znotraj vrst (Taboada in sod., 2007; Taboada in sod., 2013).

Taboada in sod. (2008) so primerjali rezultate analiz, pridobljene z MLST in MCGH metodo tipizacije. Odkrili so dobro povezano rezultatov, ki so jih pridobili z obema metodama tipizacije. Od 35 sevov, ki so se z MLST razvrstili v šest klonskih kompleksov, se le širje niso ujemali s skupinami, pridobljenimi z MCGH, in od 37 skupin sevov, pridobljenih z MCGH, se le 3 niso ujemali s podatki MLST analize. Na splošno se skladnost CGH in MLST profilov širi pri sevih v istem klonskem kompleksu, medtem ko imajo sevi s podobnimi profili CGH več istih alelov MLST. A četudi podobnost v profilih MLST dobro napove podobnost v genomih, ne prikaže vedno podobnosti celotnega genoma med sevi. Prav tako so Stabler in sod. (2013) primerjali rezultate, pridobljene z MLST, z genetskimi skupinami, pridobljenimi s CGH. S pomočjo genetskih skupin so želeli ugotoviti vir *C. jejuni* in adaptacijsko nišo. Za pomoč pri določitvi genetskih skupin in vira, pa so razvili mnogokratni PCR (mPCR).

## 2.6.5 Primerjalni genomske prstni odtis - CGF (Comparative Genomic Fingerprinting)

Primerjalni genomske prstni odtis (CGF) je tipizacijska metoda, ki je hitra, poceni in ima boljšo moč razlikovanja kot MLST (Taboada in sod., 2012; Clark in sod., 2012). CGF temelji na konceptu, da so lahko različni geni, ki obdajajo jedro genoma, uporabni za genomske prstne odtise visoke ločljivosti.

Taboada in sod. (2012) so razvili in validirali CGF za *C. jejuni*. S CGF so analiziali 40 genov 412 izolatov in jih primerjali z MLST rezultati teh izolatov. Izolate so pridobili od Kanadskega nacionalnega programa za nadzor enteričnih patogenov C-EnterNet. Za vsak izolat so naredili osem mnogokratnih PCR, kjer so pomnoževali pet genov. Dobljene rezultate so binarno označili (0 - pomnožka ni, 1 - pomnožek je prisoten) in tako dobili tipe CGF, ki so se ujemali z MLST CC/ST.

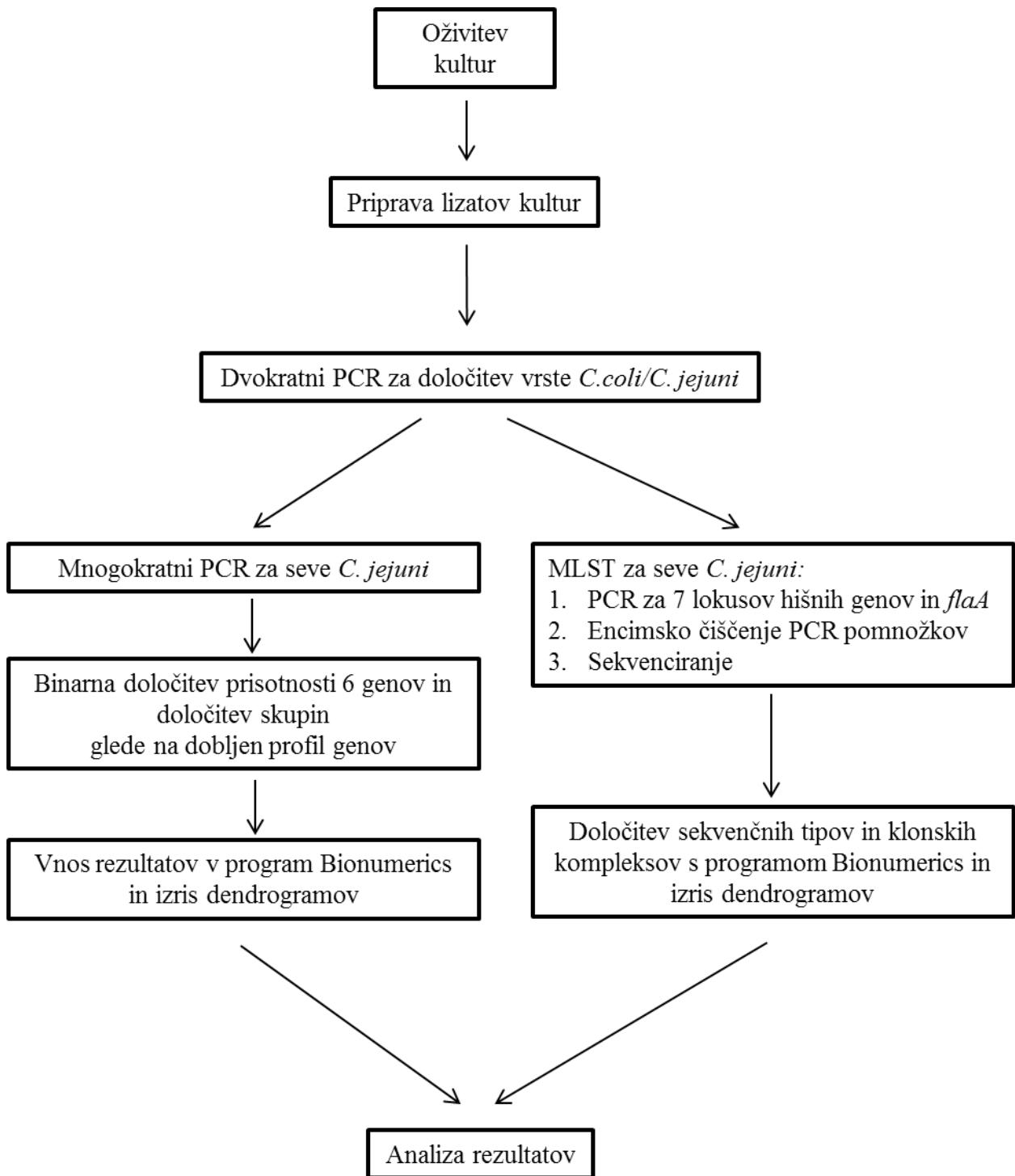
CGF se od MLST razlikuje po tem, da CGF oceni alele v večih lokusih, ki so razporejeni po genomu, pri čemer se osredotoča na variabilne regije okoljskih genov, medtem ko se MLST osredotoča na variabilnost v genih jedra genoma (v hišnih genih) (Taboada in sod., 2012). Glavna razlika med tem dvojico metodama pa je v tem, da pri MLST s sekvenčiranjem analiziramo majhno število lokusov z visoko alelno diverziteto, medtem ko pri CGF proučujemo veliko število lokusov z binarnim alelnim statusom, ki se ga lahko analizira s PCR. Rezultat CGF analize vseh 40 genov je v statistično značilno višjem nivoju različnih profilov kot pri MLST. Metoda CGF naj bi bila tako ena izmed optimalnih metod za detekcijo in epidemiologijo kampilobaktrov, saj je bolj diskriminatorna od MLST, *flaA* tipizacije, *porA* tipizacije in PFGE, uporabljene posamezno ali v kombinaciji. Poleg tega so CGF tipi v binarnem formatu, kar omogoča enostavno prenosljivost med laboratoriji z minimalno standardizacijo (Clark in sod., 2012). Zaradi vseh pozitivnih lastnosti te metode, je bila le ta uporabljena pri programih rutinskega nadzora okužb s kampilobaktri v Kanadi (Taboada in sod., 2013).

## 2.6.6 Sekvenciranje celotnega genoma - WGS (Whole Genome Sequencing)

Sekvenciranje celotnega genoma (WGS) lahko loči bakterijske izolate, ki se razlikujejo v le enem baznem paru in tako predstavlja najvišji nivo diskriminacije za epidemiološke subtipizacije. Do nedavnega so bile analize WGS primerne le za karakterizacijo nekaj sevov. Sekvenciranje novejše generacije (NGS - Next Generation Sequencing) pa je omogočilo, da se ta metoda lahko uporablja tudi za preučevanje izbruhov okužb (Taboada in sod., 2013). Pendleton in sod. (2013) so primerjali WGS s PFGE in *flaA* tipizacijo, da bi ugotovili, če je ta metoda primerna za epidemiologijo kampilobaktrov. Ugotovili so, da je WGS bolj diskriminatorna od PFGE in *flaA* tipizacije, a je kljub temu cenovno neugodna

in časovno zamudna, saj bi bilo potrebno razviti več bioinformacijskih orodij, da bi bila ta metoda uporabna tudi kot epidemiološko orodje za *C. jejuni*.

### 3 MATERIAL IN METODE



Slika 4: Shema eksperimentalnega dela

### 3.1 LABORATORIJSKI MATERIAL IN OPREMA

#### 3.1.1 Laboratorijski material:

- Halja
- Rokavice (Kimtech)
- Petrijeve plošče
- Mikrocentrifugirke
- Mikrotitrske plošče (Thermo scientific, Life science products))
- Avtomatske pipete (Eppendorf, Gilson)
- Multikanalna pipeta (Eppendorf)
- Digitalne avtomatske pipete (Eppendorf)
- Nastavki za pipete (Eppendorf, Gilson)
- Plastične cepilne zanke (Golias)
- Stojala za mikrocentrifugirke
- Plastične banjice
- Merilni valji
- Laboratorijske steklenice (Schott Duran)
- Centrifugirke - 1,5 ml, 2 ml in 15 ml
- Krioeprvete (Plastibrand)
- Kovinske žlice in kovinske pincete
- PCR folija (Eppendorf)
- Plastične vrečke
- Nosilec za agarozni gel in glavnički
- Muha za magnetno mešalo

#### 3.1.2 Laboratorijska oprema:

- Elektroforetska banjica (BioRad)
- Generator za elektroforezo (BioRad)
- Mikrovalovna pečica (Sanyo)
- Fotoaparat za fotografiranje agaroznega gela (Canon)
- Komora za fotografiranje agaroznega gela (BioRad)
- Računalnik (Philips)
- Vodna kopel (Julabo, Kambič)
- Tehtnica (Exacta, Mono BIOC)
- Vrtinčnik (IKA, Yellowline TTS 2)
- Magnetno mešalo (IKA)
- Naprava za PCR (BioRad - iCycler, Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400)
- Hladilniki in zamrzovalne skrinje (Gorenje)
- Centrifuga (5415 C Eppendorf, Mini Spin plus)

- Brezprašna komora (SMBC 122AV)
- Avtoklav (Sutjeska)
- Digestorij
- Inkubator (Kambič)
- Anaerobni lonci (Oxoid)
- Plinski gorilnik

## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Mikroorganizmi

Kampilobaktri, s katerimi smo delali, so bili izolirani iz površinskih vod, piščančjega mesa, piščančjih fecesov, vode v napajalnikih na farmi, kože piščancev, stroja za odpiranje kloak, stroja za evisceracijo, aerosola iz prostora za evisceracijo, vode za omamljanje, rokavic uslužbencev v klavnici in brisov trupov piščancev po zamrzovanju. Izolati iz piščančjega mesa in fecesa piščancev so bili izolirani v okviru projekta PROMISE – »Protection of consumers by microbial risk mitigation through combating segregation of expertise«, v katerega je vključena tudi Biotehniška fakulteta. Izolati, pridobljeni pri vzorčenju farm in klavne verige, so bili izolirani v okviru projekta Zagotavljanje varne hrane: problematika kontaminacije perutnine in perutninskega mesa s kampilobaktri v Sloveniji, ki je potekal v sodelovanju z Veterinarsko fakulteto. Izolate površinskih vod so izolirali na Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor, en izolat pa je iz zbirke Laboratorijskih za živilsko mikrobiologijo Biotehniške fakultete.

### 3.2.2 Mikrobiološka gojišča

#### 3.2.2.1 Gojišče za shranjevanje

Sestava:

- osnovno gojišče Brain Heart Infusion (Oxoid CM0375)
- sterilna defibrirana konjska kri (Oxoid, SR048C)
- glicerol (Merck, 356350)
- destilirana voda

Preglednica 1: Sestava osnovnega gojišča Brain Heart Infusion (Oxoid CM0375)

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

Preglednica 2: Sestava gojišča za shranjevanje

Sestavina	Količina (ml)
Gojišče BHI	0,6
Sterilna defibrirana konjska kri	0,2
Glicerol	0,2

Natehtali smo 47 g gojišča Brain Heart Infusion (BHI) in mu dodali 1000 ml destilirane vode, ter premešali. Gojišče smo sterilizirali pri 121 °C 20 minut. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 50 °C in v brezprašni komori v krioerpruvete odpipetirali 0,6 ml BHI, 0,2 ml glicerola, ter 0,2 ml sterilne defibrirane konjske krvi. V tako pripravljen medij smo s cepilno zanko prenesli 24 ur staro kulturo, ter jo z mešanjem na vrtinčniku resuspendirali. Krioerpruvete z gojiščem in kulturo smo shranili v zamrzovalniku pri - 80 °C.

### 3.2.2.2 Selektivni krvni agar Columbia za namnoževanje sevov

Sestava:

- osnovno gojišče Columbia (Oxoid, CM331)
- dodatek za rast (Oxoid, SR0232E)
- dodatek za selektivnost (Oxoid, SR0069E)
- sterilna defibrirana konjska kri (Oxoid, SR0048C)
- destilirana voda

Preglednica 3: Sestava osnovnega gojišča Columbia (Oxoid, CM331)

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

Preglednica 4: Sestava dodatka za rast (Oxoid, SR0232E)

Sestavina	Količina (g/l)
Natrijev prituvat	250
Natrijev metabisulfat	250
Železov sulfat	250

Preglednica 5: Sestava dodatka za selektivnost (Oxoid, SR0069E)

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

Natehtali smo 19,5 g gojišča Columbia (Oxoid, CM0331) in dodali 0,5 l destilirane vode. Mešanico smo zavreli, ter jo pri 121 °C 20 minut avtoklavirali. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili na 50 °C, ter mu v brezprašni komori dodali 1 ampulo rastnega dodatka (Oxoid, SR 0232), 1 ampulo selektivnega dodatka Skirrow (Oxoid, SR0069), ter 25 ml konjske krvi (Oxoid). Tako pripravljeno gojišče smo s krožnim obračanjem premešali, razlili na petrijeve plošče, ter do uporabe shranili v hladilniku pri 5 °C.

### 3.2.3 Reagenti za PCR

#### 3.2.3.1 Mešanica za dvokratni PCR

Sestava:

- pufer za PCR – 5 X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega)
- MgCl<sub>2</sub> (Promega)
- mešanica dNTP (Roche)
- začetni oligonukleotidi (Sigma Aldrich)
- voda za PCR (Sigma Aldrich)
- DNA polimeraza - GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega)

Preglednica 6: Začetne in končne koncentracije reagentov za dvokratni PCR

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija
Pufer za PCR - 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega)	5x	1x
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	25 mM	2 mM
dNTP (Roche)	100 mM	0,2 mM
DNA polimeraza - GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega)	5 U/µl	0,5 U

Mešanico dNTP smo pripravili tako, da smo iz založne raztopine vsakega dNTP (dATP, dCTP, dGTP in dTTP) odpipetirali 10 µl in dodali 360 µl PCR vode.

Preglednica 7: Sekvenca, velikost pomnožka in funkcija začetnih oligonukleotidov za dvokratni PCR

Začetni oligonukleotid	Sekvenca (5'-3')	Velikost pomnožka (bp)	Funkcija
COL3.3	GGTATGATTCTACAAAGCGAG	500	Aspartokinazni gen ( <i>aspA</i> )
COL4.4	ATAAAAGACTATCGTCGCGTG		
JEJ3.3	GAAGAGGGTTGGGTGGTG	735	Hipurikazni gen ( <i>hipO</i> )
JEJ4.4	AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG		

Začetni oligonukleotidi so bili v založni koncentraciji 100 µM. Delovna koncentracija začetnih oligonukleotidov pa je bila 5 pmol/µl. Da smo dobili želeno koncentracijo, smo 5 µl začetnih oligonukleotidov s 100 µM koncentracijo, dodali k 95 µl vode za PCR.

### 3.2.3.2 Mešanica za mnogokratni PCR (mPCR)

Sestava:

- Multiplex PCR master mix (Qiagen)
- 5 x Q-Solution (Qiagen)
- začetni oligonukleotidi
- voda za PCR (Sigma Aldrich)

Preglednica 8: Sekvenca, velikost pomnožka in funkcija začetnih oligonukleotidov za mPCR

Začetni oligonukleotid	Sekvenca (5'-3')	Velikost pomnožka (bp)	Funkcija
Cj0056-2-F	GAAAGAACGTGAAGGGTGGGT	415	neznana
Cj0056-2-R	TTATTCAAAGACAGGACTTGA		
Cj1139-2-F	ATGAGTCAAATTCCATCAT	703	neznana
Cj1139-2-R	GTTCTGAATATTAGCTTCT		
Cj1422-2-F	ATGCTCAACCCAAATTCA	900	neznana
Cj1422-2-R	GGCAAATTTAACATTCATTGCATG		
Cjo485-2-F	GATCTATGCCTAACAGAGCACG	406	kratka verižna dehidrogenaza
Cjo485-2-R	TCCTTAGCAAAAGCACAAGCC		
Cj1324-2-F	GTGATCACTGCGTGATGCCA	765	hipotetični protein
Cj1324-2-R	CAGTAAAACCACGACTTTAGC		
Cj1720-2-F	AAATGGAACCTGTTATCCAC	599	hipotetični protein
Cj1720-2-R	TCAACCTCCACCGATAAAAGT		

Začetni oligonukleotidi so bili v založni koncentraciji 100 µM. Delovna koncentracija začetnih oligonukleotidov pa je bila 10 pmol/µl. Da smo dobili želeno koncentracijo, smo 10 µl začetnih oligonukleotidov s 100 µM koncentracijo, dodali k 90 µl PCR vode.

### 3.2.3.3 Mešanica PCR za MLST tipizacijo

Sestava:

- pufer za PCR – 5 X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega)
- MgCl<sub>2</sub> (Promega)
- mešanica dNTP (Roche)

- začetni oligonukleotidi (Sigma Aldrich)
- voda za PCR (Sigma)
- DNA polimeraza - GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega)

Preglednica 9: Začetne in končne koncentracije reagentov za PCR za MLST tipizacijo

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija
Pufer za PCR - 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega)	5 x	1 x
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	25 mM	2 mM
dNTP (Roche)	100 mM	0,2 mM
DNA polimeraza - GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega)	5 U/µl	0,5 U

Preglednica 10: Sekvenca, velikost pomnožka in funkcija začetnih oligonukleotidov za PCR za tipizacijo MLST

Začetni oligonukleotid	Sekvenca (5'-3')	Velikost pomnožka (bp)	Funkcija
asp-F_A9	AGTACTAATGATGCTTATCC	899	aspartaza ( <i>aspA</i> )
asp-R_A10	ATTTCATCAATTGTTCTTGC		
glnA-F_A1	TAGGAACCTGGCATCATATTACC	1262	glutamin sintetaza ( <i>glnA</i> )
glnA-R_A2	TTGGACGAGCTTCTACTGGC		
gltA-F_A1	GGGCTTGACTTCTACAGCTACTTG	1012	citrat sintaza ( <i>gltA</i> )
gltA-R_A2	CCAAATAAAAGTTGTCTTGGACGG		
glyA-F_A1	GAGTTAGAGCGTCAATGTGAAGG	816	serin hidroksil metil transferaza ( <i>glyA</i> )
glyA-R_A2	AAACCTCTGGCAGTAAGGGC		
pgm-F_A7	TACTAATAATCTTAGTAGG	1150	fosfo-glukomutaza ( <i>pgm</i> )
pgm-R_A8	CACAACATTTCATTTCTTTTC		
tkt-F_A3	GCAAACCTCAGGACACCCAGG	1102	transketolaza ( <i>tkt</i> )
tkt-R_A6	AAAGCATTGTTAACGGCTGC		
uncA-F_A7	ATGGACTTAAGAATATTATGGC	1120	α podenota ATP sintaze ( <i>uncA</i> )
uncA-R_A8	ATAAAATTCCATCTTCAAATTCC		
flaA_Cje-F	TAATACTTAGGTCAAGCTATATC	471	flagelin ( <i>flaA</i> )
flaA_Cje-R	CCAAGWCCTGTTCCWACTGAAG		

Začetni oligonukleotidi so bili v založni koncentraciji 100 µM. Končna koncentracija začetnih oligonukleotidov pa je bila 5 pmol/µl. Da smo dobili želeno koncentracijo, smo 5 µl začetnih oligonukleotidov s 100 µM koncentracijo, dodali k 95 µl PCR vode.

### 3.2.4 Reagenti za agarozno gelsko elektroforezo

#### 3.2.4.1 50 x pufer TAE

Sestava:

- Tris baza; 0,4M (Sigma Aldrich)
- Oacetna kislina; 100 % (Merck)
- Na<sub>2</sub>EDTA x 2H<sub>2</sub>O; 0,02M (Sigma Aldrich)

- Destilirana voda

Preglednica 11: Sestavine 50x pufra TAE

Sestavina	Količina
Tris baza (Sigma Aldrich)	242 g
Oacetna kislina (Merck)	57,1 ml
Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O (Sigma Aldrich)	37,2 g
Destilirana voda	do 1 l

V 1 l steklenico smo zatehtali 242g Tris baze (Sigma Aldrich) in 37,2g Na<sub>2</sub>EDTA x 2H<sub>2</sub>O (Sigma Aldrich). Nato smo v steklenico dolili nekaj destilirane vode (približno do 750 ml) in z merilnim valjem dolili 57,1 ml ocetne kisline (Merck). Mešanici smo dodali še destilirano vodo do 1 l in raztopino premešali na magnetnem mešalu, da so se vse sestavine dobro raztopile. Sledila je 20 minutna sterilizacija pri 121 °C. Ohlajen 50 x pufer TAE smo shranili v hladilniku pri 5 °C.

### 3.2.4.2 1 x pufer TAE

Sestava:

- 50 x pufer TAE
- destilirana voda

Preglednica 12: Sestava 1 x pufra TAE

Sestavina	Količina (ml)
50 x pufer TAE	20
destilirana voda	980

### 3.2.4.3 Agarozni gel

Sestava:

- 1 x pufer TAE
- Agaroza za rutinsko uporabo (Sigma Aldrich)

Preglednica 13: Sestava 1 % agaroznega gela

Sestavina	Količina	Velikost gela
1 x pufer TAE	70 ml	Srednji gel
Agaroza (Sigma Aldrich)	0,7 g	
1 x pufer TAE	30 ml	Mali gel
Agaroza (Sigma Aldrich)	0,3 g	

Pri pripravi agaroznega gela smo v 250 ml steklenico natehtali 0,7 g oz. 0,3 g (odvisno od velikosti gela) Agaroze (Sigma Aldrich), ter jo raztopili v 1x pufri TAE v mikrovalovni pečici. Mešanico smo v vodni kopeli ohladili na 60°C, ter jo razlili v pripravljen nosilec z glavničkom. Po približno 15 minutah se je gel strdil, glavniček smo odstranili in nosilec z gelom smo vstavili v banjico za elektroforezo, ki je bila napolnjena z 1 % pufrom TAE.

### 3.2.4.4 Molekulski označevalec dolžin pomnožkov DNK – 100 bp

Sestava:

- DNK lestvica - 100 bp (Thermo Scientific)
- Nanašalni pufer, 6x (Thermo Scientific)
- Voda za PCR (Sigma Aldrich)

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

Sestavina	Količina ( $\mu$ l)
DNK lestvica - 100 bp (Thermo Scientific)	100
Nanašalni pufer, 6 x (Thermo Scientific)	100
Voda za PCR (Sigma Aldrich)	350

100  $\mu$ l DNK lestvice - 100 bp (Thermo Scientific), 100  $\mu$ l nanašalnega pufra (Thermo Scientific), ter 350  $\mu$ l vode za PCR (Sigma Aldrich), smo odpipetirali v mikrocentrifugirko, ter mešanico dobro premešali na vrtinčniku. Tako pripravljen molekulski označevalec smo shranili v hladilniku pri 5 °C.

### 3.2.4.5 Raztopina etidijevega bromida

Za barvanje agaroznih gelov smo uporabljali raztopino etidijevega bromida s koncentracijo 0,5  $\mu$ g/ml.

## 3.2.5 Mešanica ExoISAP za encimsko čiščenje PCR pomnožkov za tipizacijo MLST

Sestava:

- Rakova alkalna fosfataza; 1U/ $\mu$ l (Fermentas)
- 10 x defosforilacijski pufer SAP (Fermentas)
- Eksonukleaza I; 20 U/ $\mu$ l (New England Biolabs)

Preglednica 15: Sestava mešanice ExoISAP za encimsko čiščenje PCR pomnožkov za tipizacijo MLST

Sestavina	Količina ( $\mu$ l)
Rakova alkalna fosfataza (Fermentas)	150
10 x defosforilacijski pufer SAP (Fermentas)	30
Eksonukleaza I (New England Biolabs)	7,5

150  $\mu$ l rakove alkalne fosfataze (Fermentas), 30  $\mu$ l 10 x defosforilacijskega pufra SAP (Fermentas) in 7,5  $\mu$ l Eksonukleaze I (New England Biolabs) smo prenesli v mikrocentrifugirko, ter dobro premešali na vrtinčniku. Mešanico smo označili kot ExoISAP, ter jo shranili v zamrzovalniku pri - 20 °C.

### 3.2.6 Začetni oligonukleotidi za sekvenciranje

Preglednica 16: Sekvenca, velikost pomnožka in funkcija začetnih oligonukleotidov za sekvenciranje

Začetni oligonukleotid	Sekvenca (5'-3')	Velikost pomnožka (bp)	Funkcija
aspA_Cjc-L	CAACTKCAAGATGCWGTACC	594	aspartaza ( <i>aspA</i> )
aspA_Cjc-R	ATCWGCTAAAGTATRCATTGC		
glnA_Cjc-L	ACWGATATGATAAGGAACCTGGC	712	glutamin sintetaza ( <i>glnA</i> )
glnA_Cjc-R	GYTTTGGCATAAAAGTKGCAG		
gltA_Cjc-L	TATCCTATAGARTGGCTTGC	567	citrat sintaza ( <i>gltA</i> )
gltA_Cjc-R	AGCGCWCCAATACCTGCTG		
glyA_Cjc-L	AGGTTCTCAAGCTAACAGG	701	serin hidroksil metil transferaza ( <i>glyA</i> )
glyA_Cjc-R	CATCTTTCCRCTAAAYTCACG		
pgm_Cjc-L	GCTTATAAGGTAGCWCCCACTG	685	fosfo-glukomutaza ( <i>pgm</i> )
pgm_Cjc-R	AATTTTCHGTTCCAGAACAGCG		
tkt_Cjc-L	AAA YCCMACTTGGCTAACCG	606	transketolaza ( <i>tkt</i> )
tkt_Cjc-R	TGACTKCCTTCAAGCTCTCC		
uncA_Cjc-L	CAAAAGCAAAGYACAGTGGC	623	$\alpha$ podenota ATP sintaze ( <i>uncA</i> )
uncA_Cjc-R	CTACTTGCCCTCATCYAAATCAC		
flaA_Cjc-L	TAATACTTTAGGTCAAGCTATATC	471	flagelin ( <i>flaA</i> )
flaA_Cjc-R	CCAAGWCCTGTTCCWACTGAAG		

Začetni oligonukleotidi so bili v založni koncentraciji 100  $\mu$ M. Delovna koncentracija začetnih oligonukleotidov pa je bila 10 pmol/ $\mu$ l. Da smo dobili želeno koncentracijo, smo 10  $\mu$ l začetnih oligonukleotidov s 100  $\mu$ M koncentrijo, dodali k 90  $\mu$ l vode za PCR (Sigma Aldrich).

## 3.3 METODE DELA

### 3.3.1 Oživitev kultur

Kulture so bile shranjene v gojišču za zamrzovanje v krioerpruvetah pri - 80 °C. Iz krioerpruvete smo s cepilno zanko prenesli polno cepilno zanko tako shranjene kulture, in jo aseptično razmazali po selektivnem krvnem agarju Columbia. Plošče smo inkubirali v anaerobnih loncih, 24 ur pri 42 °C oz. 72 ur pri 37 °C. Da smo zagotovili mikraerofilne pogoje (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>), smo anaerobne lonce pred začetkom inkubacije, 30 s oz. 60 s (odvisno od velikosti anaerobnega lonca) preprihovali z dušikom.

### 3.3.2 Priprava lizatov kultur

Lizate smo pripravili z reagentom PrepMan® Ultra (Applied Biosystems®) po navodilih proizvajalca. Z ezo smo z gojišča pobrali nekaj kolonij 24 ur (oz. 72 ur, če je bila kultura inkubirana pri 37 °C 72 ur) stare kulture, jih prenesli v 100 µl reagenta PrepMan® Ultra, ter jih s 30 sekundnim mešanjem na vrtinčniku resuspendirali. Nato je sledila 10 minutna inkubacija pri 100 °C v vodni kopeli. Temu koraku je sledilo 2 minutno ohlajanje pri sobni temperaturi in nato 2 minutno centrifugiranje pri 12000 obratih/minuto. 50 µl supernatanta, v katerem je bila prisotna DNK smo nato prenesli v novo mikrocentrifugirko in tako pripravljene lizate shranili v zamrzovalniku pri - 20 °C.

### 3.3.3 Dvokratni PCR za ločevanje med vrstama *C. jejuni* / *C. coli*

Da bi določili vrsto *C. jejuni* / *C. coli* smo naredili PCR z dvema paroma začetnih oligonukleotidov: JEJ 3.3, JEJ4.4 in COL3.3, COL4.4. Pri *C. jejuni* smo določali hipurikazni gen, ki je velik 735 bp, pri *C. coli* pa aspartokinazni gen, velik 500 bp. V mikrocentrifugirki smo pripravili mešanico za PCR z dvema paroma začetnih oligonukleotidov, ter po 49 µl mešanice za PCR prenesli v mikrocentrifugirke za PCR. Nato smo v vsako mikrocentrifugirko dodali še 1 µl lizata, v katerem je bila prisotna DNK bakterij *C. jejuni* / *C. coli*.

Preglednica 17: Sestava mešanice za dvokratni PCR

Sestavina	Količina za 1 PCR (µl)
Pufer za PCR - 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega)	9,2
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	3,7
dNTP (Roche)	3,7
DNK polimeraza - GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega)	0,25
Začetni oligonukleotid COL3.3 (Sigma Aldrich)	2,5
Začetni oligonukleotid COL4.4 (Sigma Aldrich)	2,5
Začetni oligonukleotid JEJ3.3 (Sigma Aldrich)	2,5
Začetni oligonukleotid JEJ4.4 (Sigma Aldrich)	2,5
Voda za PCR (Sigma Aldrich)	22,15
DNK	1
Skupaj	50

Mešanico za PCR z DNK smo inkubirali v napravi za PCR (BioRad – iCycler ali Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400) po programu za dvokratni PCR.

Preglednica 18: Program za dvokratni PCR

Korak	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija	95	2 min	1
Denaturacija	95	30 s	30
Naleganje začetnih oligonukleotidov	52	30 s	
Podaljševanje verige	72	1 min	
Končno podaljševanje verige	72	8 min	1
Ohlajanje	4	$\infty$	1

Po končanem dvokratnem PCR smo vzorce shranili v hladilniku pri 5 °C.

### 3.3.4 Mnogokratni PCR

Pri mnogokratnem PCR (mPCR) smo želeli pomnožiti 6 genov in glede na prisotnost / odsotnost določenih genov določiti skupino v katero spada posamezen sev. Uporabili smo Qiagen-ov set za mPCR, ki je vključeval mešanico za mPCR, 5 x Q-raztopino in vodo brez RNA - ze. Pripravili smo 2 različni mešanici z začetnimi oligonukleotidi in Quiagen - ovim setom: M3 in M4. Za vsak vzorec smo prenesli po 19,5 µl mešanice M3 in mešanice M4 v 2 mikrocentrifugirki in dodali 0,5 µl DNK.

Preglednica 19: Sestava mešanice M3 za mPCR

Sestavina	Količina (µl)
Cj0056-2-F	0,3
Cj0056-2-R	0,3
Cj1139-2-F	1,5
Cj1139-2-R	1,5
Cj1422-2-F	1
Cj1422-2-R	1
Multiplex PCR master mix (Qiagen)	10
5x Q-Solution (Qiagen)	2
ddH <sub>2</sub> O	1,9
DNK	0,5
Vsota	20

Preglednica 20: Sestava mešanice M4 za mPCR

Sestavina	Količina (µl)
Cjo485-2-F	1,5
Cjo485-2-R	1,5
Cj1324-2-F	1,5
Cj1324-2-R	1,5
Cj1720-2-F	0,3
Cj1720-2-R	0,3
Multiplex PCR master mix (Qiagen)	10
5x Q-Solution (Qiagen)	2
ddH <sub>2</sub> O	0,9
DNK	0,5
Vsota	20

Mešanico PCR z DNK smo inkubirali v napravi za PCR (BioRad – iCycler ali Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400) po programu za mPCR.

Preglednica 21: Program za mPCR

Korak	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija	94	15 min	1
Denaturacija	94	30 s	35
Naleganje začetnih oligonukleotidov	53	90 s	
Podaljševanje verige	72	90 s	
Končno podaljševanje verige	72	10 min	1
Ohlajanje	4	∞	1

Po končanem mPCR smo vzorce shranili v hladilniku pri 5 °C.

### 3.3.5 PCR za tipizacijo MLST

Za tipizacijo MLST, smo za vsak sev naredili osem reakcij PCR, s katerimi smo pomnožili sedem hišnih genov (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*) in gen *flaA*. V 15 ml centrifugirki smo naredili mešanico PCR, ki smo jo na vrtinčniku dobro premešali, ter po 44,4 µl mešanice prenesli v mikrocentrifugirke za PCR. Pripravili smo mešanico začetnih oligonukleotidov, in sicer smo za vsak gen, ki smo ga želeli pomnožiti, v mikrocentrifugirki zmešali 5 µl začetnega oligonukleotida R in 5 µl začetnega oligonukleotida L, ter dodali 90 µl vode za PCR (Sigma Aldrich). Tako pripravljeno mešanico oligonukleotidov smo po 4,6 µl dodali mešanici PCR, ter na koncu v vseh osem reakcij PCR za posamezen sev, dodali še 1 µl DNK.

Preglednica 22: Sestava mešanice PCR za MLST

Sestavina	Količina za 1 PCR (µl)
Pufer za PCR - 5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer (Promega)	9,2
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	3,7
dNTP (Roche)	3,7
DNA polimeraza - GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega)	0,1
Mešanica začetnih oligonukleofidov - L in R (Sigma Aldrich)	4,6
Voda za PCR (Sigma Aldrich)	27,7
DNK	1
Skupaj	50

DNK smo pomnožili v napravi za PCR (BioRad – iCycler ali Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400) po programu za »MLST«.

Preglednica 23: Program »MLST«

Korak	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija	96	8 min	1
Denaturacija	94	30 s	30
Naleganje začetnih oligonukleotidov	52	30 s	
Podaljševanje verige	72	1 min	
Končno podaljševanje verige	72	7 min	1
Ohlajanje	4	∞	1

Po končani PCR za tipizacijo MLST smo vzorce shranili v hladilniku pri 5°C.

### 3.3.6 Agarozna gelska elektroforeza

Prisotnost in velikost pomnožkov, ki smo jih dobili s PCR, smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo. V luknjice v agaroznem gelu smo prenesli 5 µl pomnožka. V primeru dvokratne PCR, kjer smo uporabili obarvan pufer za PCR, nam pomnožkov pred nanosom na gel ni bilo potrebno barvati. Pri PCR za MLST in pri mnogokratni PCR pa smo pred nanosom na agarozni gel, 5 µl pomnožka zmešali z 1 µl nanašalnega pufra (Thermo Scientific), ter 5 µl mešanice nanesli na agarozni gel. Za določitev velikosti pomnožkov smo v prvo in zadnjo luknjico v agaroznem gelu nanesli 2,5 µl molekulskega označevalca dolžin pomnožkov - 100 bp (Thermo Scientific). Agarozna gelska elektroforeza je potekala pod pogoji: 120 V, 400 mA, 25 - 30 minut. Po končani elektroforezi smo agarozni gel prenesli v raztopino etidijevega bromida in inkubirali 10 minut. Nato smo agarozni gel za 2 minuti prenesli v destilirano vodo. Sledilo je fotografiranje agaroznega gela. Gel smo prenesli v komoro za fotografiranje agaroznega gela (BioRad) in pod UV svetlobo fotografirali fluoresciranje etidijevega bromida, ki se je vgradil med baze dvojne vijačnice DNK.

### 3.3.7 Encimsko čiščenje pomnožkov PCR za tipizacijo MLST

Pomnožke, ki smo jih dobili s PCR za tipizacijo MLST, smo morali še encimsko čistiti z mešanico ExoISAP. V mikrotitersko ploščico smo prenesli 1,3 µl mešanice ExoISAP, ter 3,7 µl PCR pomnožka. Mešanico ExoISAP z DNK smo inkubirali v napravi za PCR (BioRad – iCycler).

Preglednica 24: Program za čiščenje pomnožkov PCR za tipizacijo MLST

Korak	Temperatura (°C)	Čas (min)	Število ciklov
Degradacija ssDNA	37	45	1
Inaktivacija encimov	80	20	1
Ohlajanje	4	∞	1

Po inkubaciji smo v mikrotitrsko ploščico dodali še 5 µl začetnih oligonukleotidov (koncentracija 5 pmol/µl) za sekvenciranje. Tako pripravljene mikrotitrske ploščice smo

dobro zatesnili, ter do pošiljanja shranili v zamrzovalniku pri – 20 °C. Nukleotidno zaporedje vzorcev so določili v komercialnem podjetju Macrogen, Južne Koreje.

Vzorec	H	G	F	E	D	C	B	A
1. vzorec	aspA_R	glnA_R	gltA_R	glyA_R	pgm_R	tkt_R	uncA_R	flaA_R
1. vzorec	aspA_F	glnA_F	gltA_F	glyA_F	pgm_F	tkt_F	uncA_F	flaA_F
2. vzorec	aspA_R	glnA_R	gltA_R	glyA_R	pgm_R	tkt_R	uncA_R	flaA_R
2. vzorec	aspA_F	glnA_F	gltA_F	glyA_F	pgm_F	tkt_F	uncA_F	flaA_F
3. vzorec	aspA_R	glnA_R	gltA_R	glyA_R	pgm_R	tkt_R	uncA_R	flaA_R
3. vzorec	aspA_F	glnA_F	gltA_F	glyA_F	pgm_F	tkt_F	uncA_F	flaA_F
4. vzorec	aspA_R	glnA_R	gltA_R	glyA_R	pgm_R	tkt_R	uncA_R	flaA_R
4. vzorec	aspA_F	glnA_F	gltA_F	glyA_F	pgm_F	tkt_F	uncA_F	flaA_F
5. vzorec	aspA_R	glnA_R	gltA_R	glyA_R	pgm_R	tkt_R	uncA_R	flaA_R
5. vzorec	aspA_F	glnA_F	gltA_F	glyA_F	pgm_F	tkt_F	uncA_F	flaA_F
6. vzorec	aspA_R	glnA_R	gltA_R	glyA_R	pgm_R	tkt_R	uncA_R	flaA_R
6. vzorec	aspA_F	glnA_F	gltA_F	glyA_F	pgm_F	tkt_F	uncA_F	flaA_F

Slika 5: Shema mikrotitrskih ploščic za sekvenčiranje

### 3.3.8 Obdelava podatkov s programom BioNumerics

S programom BioNumerics 7.1 (Applied Maths, 2010) smo analizirali sekvenčne posekvencirane genove in določili sekvenčni tip in morebitni klonski kompleksi, v katerega sev spada. Program BioNumerics 7.1 (Applied Maths, 2010) je povezan z medmrežno bazo podatkov za MLST (Jolley in Maiden, 2010). V program BioNumerics 7.1 (Applied Maths, 2010) smo najprej uvozili določena nukleotidna zaporedja lokusov genov, program jih je nato avtomatsko analiziral, in sicer je sekvenčne sestavil. Pri sekvencah, kjer smo imeli probleme s posameznimi nukleotidi, smo sami ročno popravili nukleotide glede na izgled sekvenčne. Program nam je določil sekvenčni tip in klonski kompleksi seva, glede na bazo podatkov na medmrežju. V nadaljevanju smo z metodo UPMGA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) izrisali dendrograme.

### 3.3.9 Izračun Simpsonovega indeksa razlikovanja za tipizacijo MLST, tipizacijo *flaA* in mPCR

Indekse razlikovanja za tipizacijske metode MLST, *flaA* in mPCR smo izračunali po spodnji enačbi:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j (n_j - 1) \quad \dots(1)$$

N predstavlja število sevov v vzorčeni populaciji, s je število vseh tipov, ki smo jih pridobili s tipizacijo, nj pa je število sevov, ki se je uvrstilo v j-ti tip (Hunter in Gaston, 1988).

Indeks za tipizacijo MLST smo izračunali na podlagi razvrstitev sevov v sekvenčne tipe.

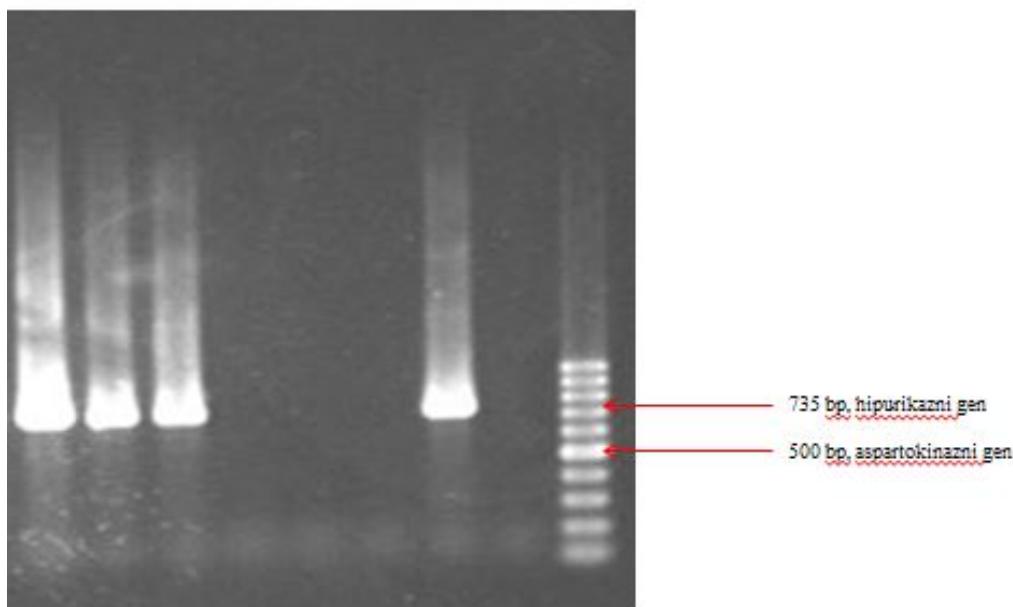
Indeks za tipizacijo *flaA* smo izračunali na podlagi razvrstitev sevov v alelne tipe *flaA*.

Indeks za mPCR smo izračunali na podlagi razvrstitev sevov v skupine mPCR.

## 4 REZULTATI

### 4.1 DVOKRATNI PCR ZA POTRDITEV VRSTE *C. coli* / *C. jejuni*

Z dvokratnim PCR (dPCR) smo želeli identificirati izolate *C. jejuni*, ki smo jih potrebovali za nadaljnjo tipizacijo. Z dPCR smo preverjali prisotnost aspartokinaznega gena (*aspA*), katerega pomnožek je dolg 500 bp, ki je značilen za *C. coli*, in hipurikaznega gena (*hipO*), katerega pomnožek je dolg 735 bp, ki je značilen za *C. jejuni*.



Slika 6: Slika agarognega gela za identifikacijo velikosti pomnožkov dPCR, kjer so vidni pomnožki velikosti 735 bp, ostalih pomnožkov ni bilo prisotnih. Vrstni red nanosa na gel: NCTC 11168, C39, C2, C9, C5, C10, C33, C8 in molekulski označevalec pomnožkov DNK (100 bp). Pomnožek velikosti 753 bp je viden pri NCTC 11168, C39, C2 in C33.

Pri izolatih piščančjega mesa, zaseženega na mejnem prehodu Obrežje, ki smo jih pridobili v okviru evropskega projekta PROMISE, so bili izmed 88 testiranih sevov, le trije sevi vrste *C. jejuni* – sevi z oznako C39, C2 in C33; vrste *C. coli* ni bilo nobenega seva. V okviru projektov pa sta bila v našo tipizacijo vključena še dva seva (D59 in D60), izolirana iz piščančjega fecesa v Zagrebu, v okviru projektnega sodelovanja z Veterinarsko fakulteto v Zagrebu.

Farmske in klavniške izolate, ki smo jih pridobili iz Veterinarske fakultete v okviru projekta CRP »Zagotavljanje varne hrane: problematika kontaminacije perutnine in perutninskega mesa s kampilobaktri v Sloveniji«, nismo preverjali z dPCR, saj so bili že predhodno identificirani. Prav tako nismo preverjali seva izoliranega iz površinske vode z oznako 00816, saj je bil že identificiran v okviru zbirke sevov Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete.

Izolate površinskih vod, ki so bili izolirani na Zavodu za zdravstveno varstvo Maribor pa smo predhodno identificirali z dPCR in ugotovili, da so bili le 4 od 20 izolatov vrste *C. jejuni*. Namen vključitve teh vodnih izolatov v raziskavo je bil prikaz velike pestrosti teh izolatov, v primerjavi z ostalimi izolati.

Preglednica 25: Prikaz identifikacije vodnih izolatov z dPCR. Pozitivni rezultat (+) – prisotnost pomnožka hipurikaznega / aspartokinaznega gena in negativni rezultat (-) - odsotnost pomnožka hipurikaznega / aspartokinaznega gena.

Oznaka seva	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
265 07 / 14005	-	-
266 07 / 14008	+	-
321 08 / 1592	-	-
350 08 / 2481	-	-
247 07 / 13897	-	-
248 07 / 13820	-	-
290 088 / 550	-	-
249 07 / 13784	-	-
177 07 / 6926	-	-
246 07 / 13898	-	-
270 07 / 14114	-	-
176 07 / 6927	+	-
289 08 / 401	-	-
258 07 / 14022	+	-
264 07 / 14004	-	-
61 07 / 595	-	-
63 07 / 600	-	-
352 08 / 2456	+	-
95 07 / 1010	-	-
133 07 / 2782	-	-

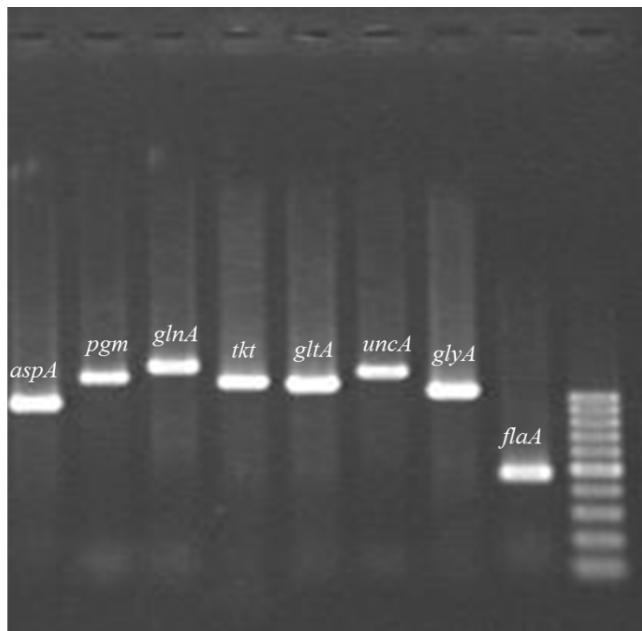
## 4.2 MLST

### 4.2.1 PCR za 7 hišnih genov

Za seve vrste *C. jejuni* smo naredili PCR, kjer smo pomnoževali 7 genov:

- aspartaza (*aspA*), velikosti 899 bp
- glutamin sintetaza (*glnA*), velikosti 1262 bp
- citrat sintaza (*gltA*), velikosti 1012 bp
- serin hidroksil metil transferaza (*glyA*), velikosti 816 bp
- fosfo – glukomutaza (*pgm*), velikosti 1150 bp
- transketolaza (*tkt*), velikosti 1102 bp
- $\alpha$  podenota ATP sintaze (*uncA*), velikosti 1120 bp

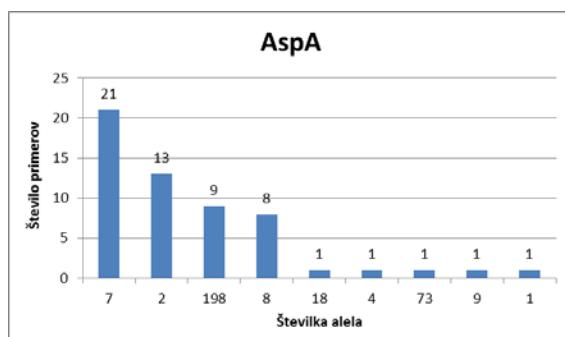
Prisotnost in specifičnost dobljenih pomnožkov smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo, kjer smo glede na prisotnost in velikost pomnožka potrdili uspešnost PCR. Uspešno nam je uspelo pomnožiti vseh osem genov pri 56 sevih *C. jejuni*. Na sliki 7 je prikazan rezultat pomnožitve 8 genov za sev Z-KL-SKB1.



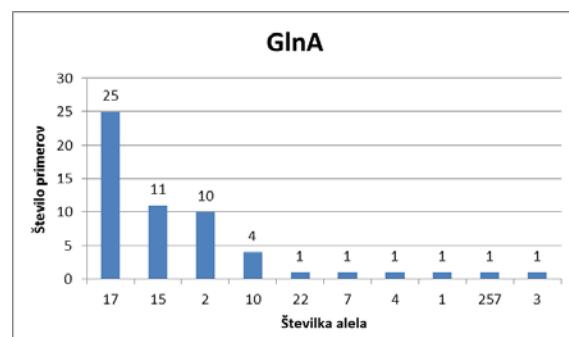
Slika 7: Slika agaroznega gela in pomnožki PCR za 7 hišnih genov: *aspA*, *pgm*, *glnA*, *tkt*, *gltA*, *uncA*, *glyA* in gen *flaA* za sev Z-KL-SKB1, ter molekulski označevalec velikosti DNK (100 bp).

#### 4.2.2 Določitev alelov

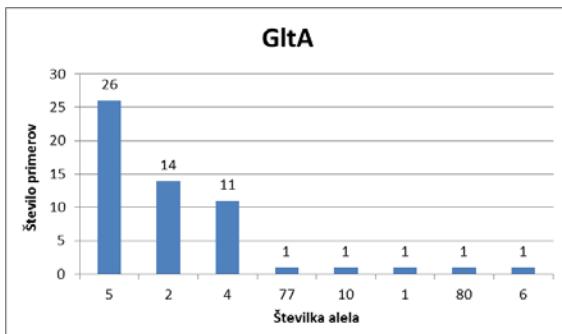
Vsakemu alelu smo dodelili alelno številko s pomočjo programa Bionumerics 7.1 (Applied Maths, 2010) in prosti dostopne podatkovne zbirke PubMLST *Campylobacter*, na podlagi ujemanja z alemom v bazi podatkov na medmrežju (Jolley in Maiden, 2010). Vsakemu izolatu je bilo tako dodeljenih 7 alelnih številk.



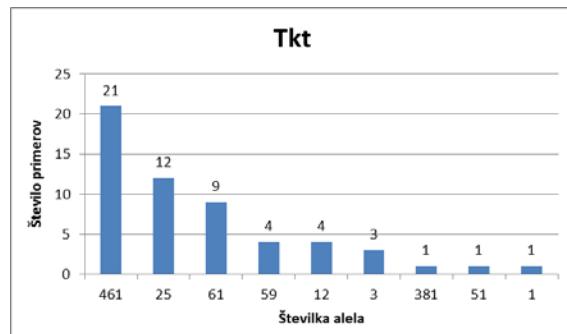
Slika 8 : Frekvence alelov *aspA* v populaciji



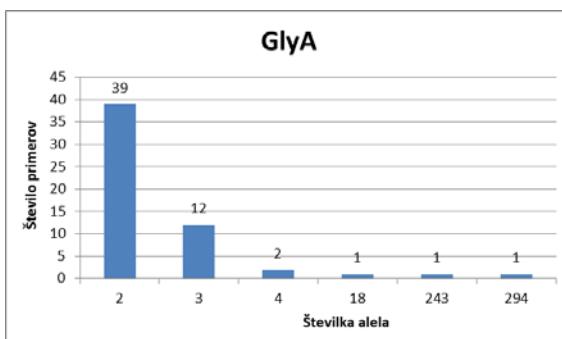
Slika 9: Frekvence alelov *glnA* v populaciji



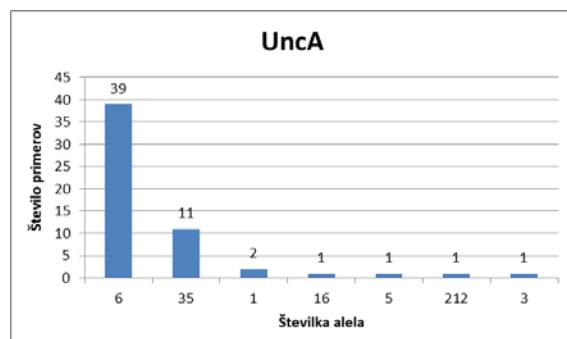
Slika 10: Frekvence alelov *gltA* v populaciji



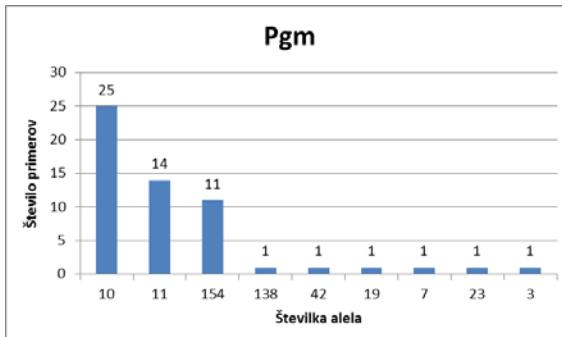
Slika 11: Frekvence alelov *tkt* v populaciji



Slika 12: Frekvence alelov *glyA* v populaciji



Slika 13: Frekvence alelov *uncA* v populaciji



Slika 14: Frekvence alelov *pgm* v populaciji

Glede na dobljene rezultate je bil najbolj raznolik gen za glutamin sintetazo (*glnA*), ki je imel 10 različnih alelnih tipov. Geni za aspartazo (*aspA*), fosfo - glukomutazo (*pgm*) in transketolazo (*tkt*) so imeli 9, gen za citrat sintazo (*gltA*) 8 in gen za  $\alpha$  podenoto ATP sintaze (*uncA*) 7 alelnih tipov. Najmanj raznolik pa je bil gen za serin hidroksil metil transferazo (*glyA*), ki je imel 6 alelnih tipov.

Najpogostejsi alelni profil pri naših izolatih je bil *aspA\_7, glnA\_17, gltA\_5, glyA\_2, pgm\_10, tkt\_461, uncA\_6*, ki se je pojavil pri 21 od 56 izolatov.

#### 4.2.3 Določitev sekvenčnih tipov in klonskih kompleksov

Glede na kombinacijo sedmih alelnih številk, je bil s programom Bionumerics 7.1 (Applied Maths, 2010) vsakemu izolatu dodeljen sekvenčni tip (ST) glede na bazo podatkov PubMLST (Jolley in Maiden, 2010). Kombinacija alelov v vsakem lokusu oz. alelni profil je tako določal številko sekvenčnega tipa. Sekvenčni tipi, ki so imeli vsaj štiri enake alele so se uvrstili v isti klonski kompleks (CC).

V preglednici 26 so prikazani sekvenčni tipi s pripadajočimi alelnimi profili, ki smo jih določili našim izolatom. Kot je razvidno iz preglednice, je bila vsakemu alelu dodeljena alelna številka, in glede na kombinacijo sedmih alelnih številk je bil dodeljen sekvenčni tip.

Preglednica 26: Alelni profili in pripadajoči sekvenčni tipi

<i>aspA</i>	<i>glnA</i>	<i>gltA</i>	<i>glyA</i>	<i>pgm</i>	<i>tkt</i>	<i>uncA</i>	Sekvenčni tip
8	17	5	2	10	59	6	400
7	17	5	2	10	461	6	5205
18	22	77	18	138	381	16	6170
4	7	10	4	42	51	1	583
8	10	2	2	11	12	6	354
198	2	2	2	11	61	6	2863
73	4	2	4	19	3	6	657
2	15	4	3	154	25	35	905
2	1	1	3	7	1	5	104
9	2	5	2	11	3	1	1707
2	257	80	243	23	25	212	3030
1	3	6	294	3	3	3	2497

Preglednica 27 prikazuje število izolatov, ki so se uvrstili v posamezen sekvenčni tip in pripadajoči klonski kompleks, če je bil dodeljen temu sekvenčnemu tipu. 56 izolatov se je uvrstilo v 12 sekvenčnih tipov in 8 klonskih kompleksov. Največ izolatov (25), se je uvrstilo v klonski kompleks 353, od tega se jih je kar 21 uvrstilo v sekvenčni tip 5205, ki je bil tudi najbolje zastopan sekvenčni tip. Po številu izolatov je sledil klonski kompleks 354, v katerega se je uvrstilo trinajst izolatov, od teh se jih je devet uvrstilo v sekvenčni tip 2863, štirje pa v sekvenčni tip 354. Pri dvanajstih izolatih klonski kompleks ni bil določen, od teh se jih je enajst uvrstilo v sekvenčni tip 905, ki je drugi najbolj zastopan sekvenčni tip med temi izolati. V klonske komplekse 21, 22, 45, 658 in 952 so se uvrstili vodni izolati, za katere je značilna tudi največja pestrost rezultatov.

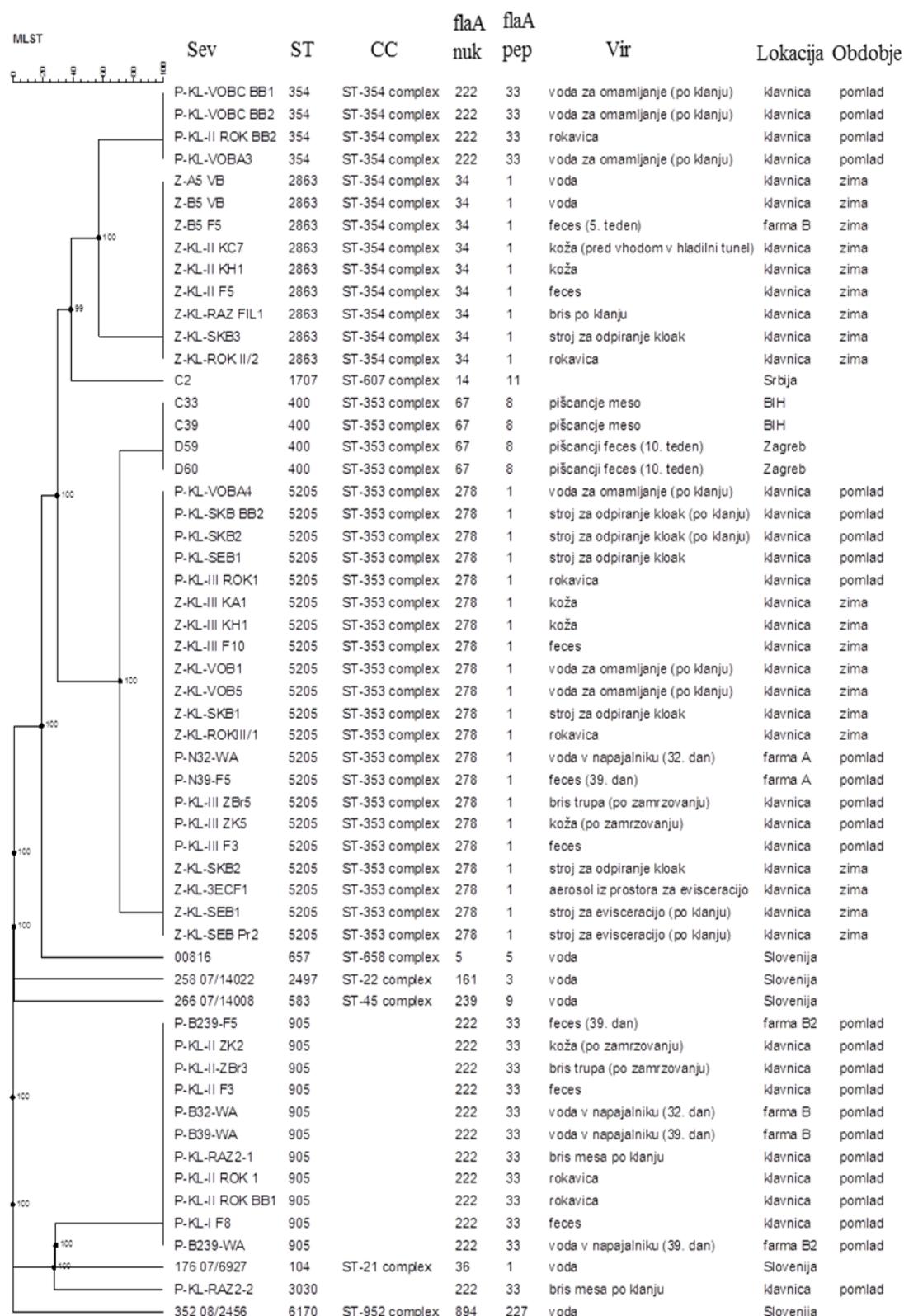
Preglednica 27: Število izolatov v pripadajočem klonskem kompleksu in sekvenčnem tipu

Klonski kompleks	Sekvenčni tip	Število izolatov
353	400	4
	5205	21
354	354	4
	2863	9
952	6170	1
45	583	1
658	657	1
21	104	1
607	1707	1
22	2497	1
ni določen	905	11
	3030	1

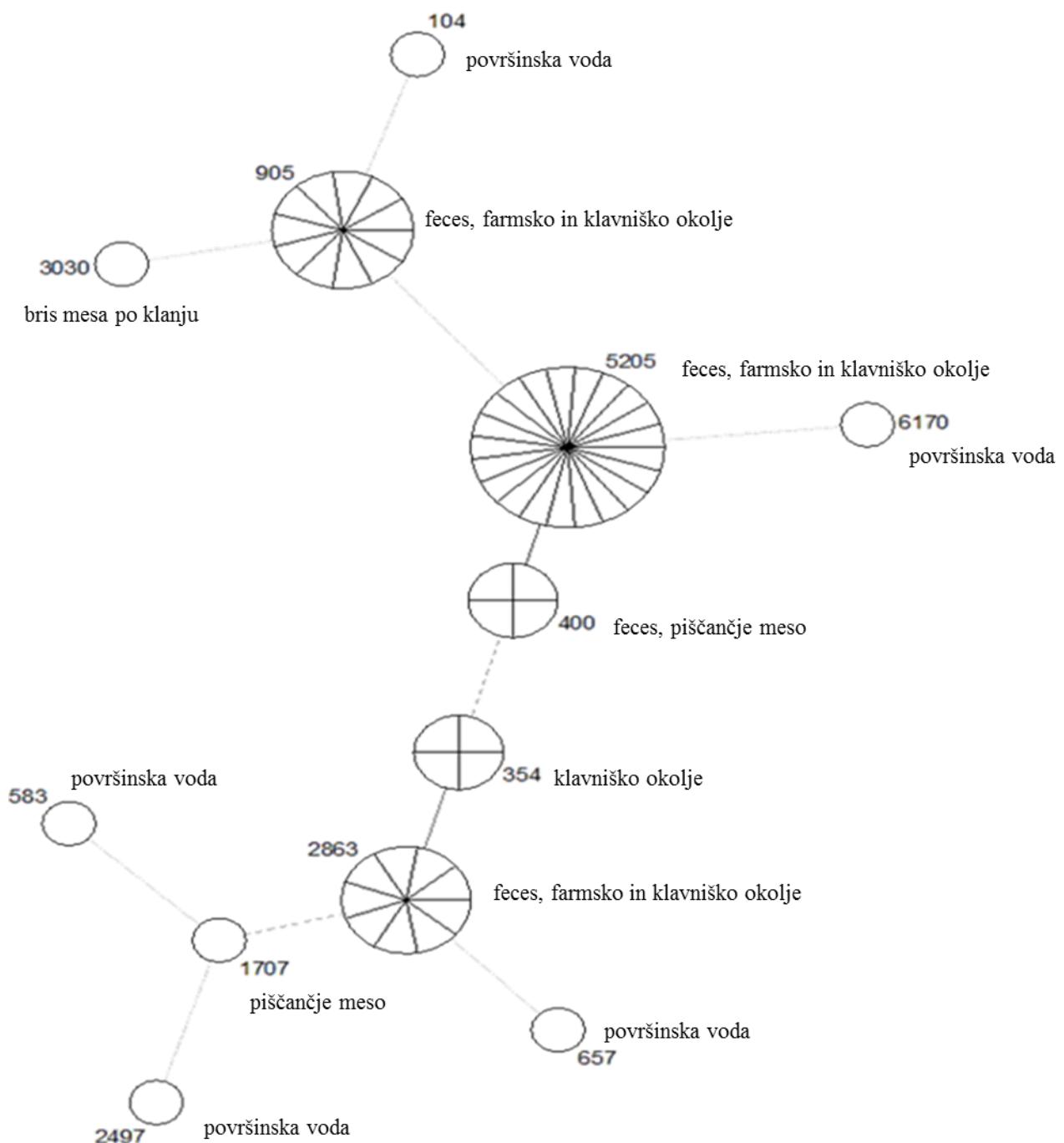
Slika 15 prikazuje dendrogram sorodnosti sevov, ki je izrisan glede na sekvenčne tipe, pridobljene s tipizacijo MLST. Prikazane so tudi uvrstitve sevov v klonske komplekse, poleg tega so pripisani tudi rezultati tipizacije *flaA*, in sicer na podlagi nukleotidnega zaporedja gena *flaA* in njegovega prepisa, viri izolatov (površinske vode, piščančje meso, feces, farmsko in klavniško okolje), lokacije (farma, klavnica ali država) in obdobje vzorčenja pri izolatih, kjer je vzorčenje potekalo v pomladnjem in zimskem obdobju.

Iz dendrograma je razvidno, da se izolati, izolirani iz različnih virov in geografsko oddaljenih lokacij, niso uvrstili v iste sekvenčne tipe in klonske komplekse, kar kaže na to, da je metoda MLST dobro ločila med izolati iz različnih lokacij. Dobro je razvidna tudi genetska pestrost sevov, predvsem vodnih izolatov v primerjavi z ostalimi. Skupno 46 izolatov iz farme, fecesa piščancev in klavniškega okolja se je uvrstilo v le pet sekvenčnih tipov, kar ne kaže velike pestrosti sevov, ki se pojavljajo na teh lokacijah. Pet sevov, ki so bili izolirani iz fecesa ali piščančjega mesa, zaseženega na slovensko - hrvaški meji, prav tako ne kaže velike pestrosti, saj so se sevi uvrstili v le dva različna sekvenčna tipa. V nasprotju s temi rezultati, pa se je pet izolatov iz površinskih vod uvrstilo v pet različnih sekvenčnih tipov, kar nakazuje na veliko pestrost sevov v vodnem okolju.

Raznolikost sevov nazorno prikazuje tudi slika 16. Minimalno vpeto drevo prikazuje genetsko sorodnost med sevi na podlagi razvrstitev v alelne tipe oz. sekvenčne tipe. Z velikostjo krogov in njihovo razdelitvijo je prikazano tudi število izolatov, ki spadajo v določen sekvenčni tip. Poleg smo dopisali vire izolatov.



Slika 15: Dendrogram sorodnosti sevov izrisan glede na sekvenčni tip (ST) in klonski kompleks (CC), s prikazom pripadajočega *flaA* nukleotida (*flaA* nuk) in *flaA* peptida (*flaA* pep), vira, lokacije in izolacije sevov.



Slika 16: Minimalno vpeto drevo (Minimal Spanning Tree) narejeno na podlagi rezultatov MLST, ki prikazuje genetsko sorodnost med sevi. Vsak krog predstavlja sekvenčni tip, velikost in črte v krogu pa število izolatov, ki se je uvrstilo v ta sekvenčni tip. Poleg sekvenčnih tipov so dopisani viri izolatov.

#### 4.3 TIPIZACIJA *flaA*

S sekvenciranjem gena *flaA* smo želeli rezultate, dobljene z analizo MLST, še dopolniti in ugotoviti ali tipizacija *flaA* pripomore k boljši moči razlikovanja in ima zmožnost razlikovanja med dvema sevoma, ki sta z analizo MLST uvrščena v isti sekvenčni tip.

V preglednici 28 so prikazani rezultati tipizacije *flaA*, in sicer uvrstitev *flaA* nukleotida in peptida v alelne tipe, ki smo jih določili z vnosom nukleotidnega / peptidnega zaporedja v bazo PubMLST / *Campylobacter*., ter pripadajoči sekvenčni tipi in klonski kompleksi, število izolatov in viri, ki so se uvrstili v določen *flaA* alelni tip. Izolati so se razvrstili v 10 *flaA* alelnih tipov in 12 sekvenčnih tipov analize MLST, kar kaže na to, da je imela tipizacija *flaA* slabšo moč razlikovanja od tipizacije MLST. Pri enem alelnem tipu tipizacija *flaA* ni ločila treh sekvenčnih tipov, tako da so se vsi trije uvrstili v isti *flaA* alelni tip (Preglednica 28, *flaA* nukleotid 222 in *flaA* peptid 33). Pri ostalih sekvenčnih tipih pa je metoda dobro ločila med sekvenčnimi tipi in se je vsak sekvenčni tip tudi uvrstil v svoj alelni tip *flaA*. Znotraj istega sekvenčnega tipa ni prišlo do ločbe v različne alelne tipe *flaA*, kar kaže na to, da je tipizacija MLST že dobro ločila med posameznimi sevi.

Preglednica 28: Rezultati tipizacije *flaA*, in sicer *flaA* nukleotid in peptid, ter pripadajoči sekvenčni tipi (ST) in klonski kompleksi (CC), število izolatov in viri.

<i>flaA</i> nukleotid	<i>flaA</i> peptid	ST	CC	Število izolatov	Vir
222	33	354	354	4	klavniško okolje
		905		11	klavniško in farmsko okolje, feces
		3030		1	bris mesa po klanju
34	1	2863	354	9	klavniško okolje, feces
14	11	1707	607	1	meso
67	8	400	353	4	meso, feces
278	1	5205	353	21	klavniško in farmsko okolje, feces
5	5	657	658	1	površinske vode
161	3	2497	22	1	površinske vode
239	9	583	45	1	površinske vode
36	1	104	21	1	površinske vode
894	227	6170	952	1	površinske vode

#### 4.4 MNOGOKRATNI PCR (mPCR)

Pri mnogokratni PCR smo pomnoževali 6 genov:

- Cj0056c, velikosti 415 bp, neznane funkcije
- Cj0485c, velikosti 406 bp, kratka verižna dehidrogenaza
- Cj1139c, velikosti 703 bp, neznane funkcije
- Cj1324, velikosti 765 bp, hipotetični protein

- Cj1422c, velikosti 900 bp, neznane funkcije
- Cj1720, velikosti 599 bp, hipotetični protein

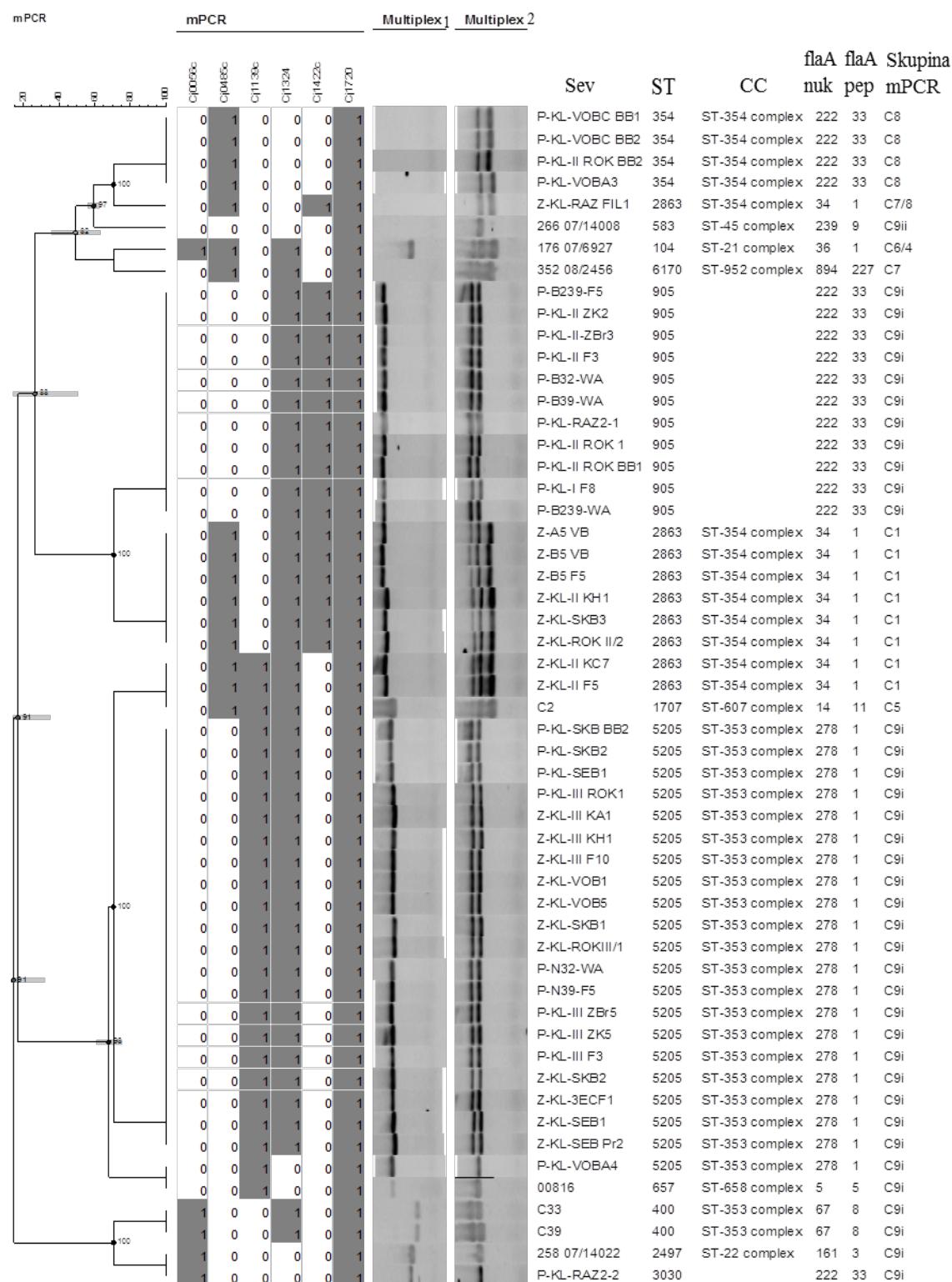
Rezultate smo binarno označili z 1 oz. 0, glede na prisotnost oz. odsotnost gena in te rezultate vnesli v algoritem za izračun, ki so ga razvili Stabler in sod. (2013). Tako smo glede na binarni profil s pomočjo algoritma sev uvrstili v ustrezno skupino mPCR.

Preglednica 29 prikazuje skupine mPCR, v katere so se uvrstili izolati glede na prisotnost / odsotnost pomnožka. Vsaki skupini je pripisan tudi ST, CC, vir in število izolatov v skupini mPCR.

Izmed 54 identificiranih sevov se jih je 37 uvrstilo v skupino C9i, 8 sevov v skupino C1, 4 v skupino C8 in po 1 sev v skupine C5, C6/4, C7, C7/8 in C9ii. Tudi tu so bili najbolj raznoliki izolati izolirani iz površinskih vod, kar je bilo po pričakovanjih. Lahko vidimo, da je ta tipizacijska metoda dobro ločila seve na nivoju klonskih kompleksov, in pri nekaterih primerih tudi znotraj istega klonskega kompleksa. Izjema je bila skupina C9i, kjer se je kar 6 različnih sekvenčnih tipov uvrstilo v to skupino. Pri teh izolatih ta tipizacijska metoda ni dobro ločila med sevi iz različnih okolij, saj so se tako sevi iz farmskega in klavniškega okolja, kot tudi seva iz piščančjega mesa in sev iz površinske vode uvrstili v isto skupino. Ti rezultati kažejo, da ima mPCR nižjo moč razlikovanja kot MLST in tipizacija *flaA*, a je kljub temu uporabna za bolj grobo razvrstitev izolatov v skupine, npr. pri presejalnih testih z velikim številom izolatov, kot napoved sekvenčnih tipov oz. klonskih kompleksov.

Preglednica 29: Skupine mPCR in pripadajoči sekvenčni tipi (ST), klonski kompleksi (CC), ter viri in število izolatov v skupini

Skupina mPCR	ST	CC	Vir	Število izolatov
C1	2863	354	klavniško okolje, feces	8
C5	1707	607	meso	1
C6/4	104	21	površinske vode	1
C7	6170	952	površinske vode	1
C7/8	2863	354	klavniško okolje, feces	1
C8	354	354	klavniško okolje	4
C9i	905		klavniško in farmsko okolje, feces	11
	5205	353	klavniško in farmsko okolje, feces	21
	657	658	površinske vode	1
	400	353	meso, feces	2
	2497	22	površinske vode	1
	3030		bris mesa po klanju	1
C9ii	583	45	površinske vode	1



Slika 17: Dendrogram sorodnosti sevov glede na mnogokratni PCR (mPCR) s prikazom pripadajočih sekvenčnih tipov (ST), klonskih kompleksov (CC) in tipizacije flaA (flaA nukleotid in flaA peptid). Prikazani so tudi binarni rezultati mPCR, kjer 1 pomeni prisotnost gena, 0 pa odsotnost gena. Pod označama Multiplex 1 in 2 so slike gelske elektroforeze s PCR pomnoženih genov Cj0056c, Cj1139c, Cj1422c (Multipleks 1) in Cj0485c, Cj1324, Cj1720 (Multipleks 2).

#### 4.5 PRIMERJAVA SPOSOBNOSTI RAZLIKOVANJA MED SEVI Z RAZLIČNIMI TIPIZACIJSKIMI METODAMI

Preglednica 30: Simpsonovi indeksi razlikovanja za tipizacije MLST, *flaA* in mPCR

Tipizacijska metoda	Simpsonov indeks
MLST	0,797
Tipizacija <i>flaA</i>	0,758
mPCR	0,511

V preglednici 30 so prikazani Simpsonovi indeksi za posamezne tipizacijske metode.

Najvišji indeks razlikovanja je imela tipizacija MLST, z vrednostjo 0,797, sledila pa ji je tipizacija *flaA* z vrednostjo 0,758. Vrednost indeksa 0,797 pomeni, da v primeru, če bomo naključno vzorčili dva seva iz populacije, se bosta ta dva seva v 79,7 % primerov uvrstila v dva različna tipa.

Najnižji indeks je imela tipizacijska metoda mPCR, kjer je indeks znašal le 0,511, torej bi se le pri malo več kot polovici (51,1 %) sevov, dva različna seva dejansko uvrstila v dva različna tipa.

Iz teh rezultatov lahko povzamemo, da je za takšen tip študje (sledenje izvora in širjenja okužb piščančjega mesa) najprimernejša tipizacijska metoda tipizacija MLST.

## 5 RAZPRAVA

Seve, uporabljene za tipizacijo, glede na izvor lahko uvrstimo v 3 večje skupine:

- Seve, ki so bili pridobljeni z vzorčenjem farm in klavne verige v okviru projekta CRP »Zagotavljanje varne hrane: problematika kontaminacije perutnine in perutninskega mesa s kampilobaktri v Sloveniji«, v sodelovanju z Veterinarsko fakulteto
- Seve, ki so bili pridobljeni z vzorčenjem piščančjega mesa, zaseženega na mejnem prehodu Obrežje in fecesa piščancev, v okviru projekta PROMISE
- Seve, ki so bili pridobljeni z vzorčenjem površinske vode, v okviru Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor in sev iz zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo Biotehniške fakultete

### 5.1 MLST

S tipizacijo MLST smo tipizirali 56 sevov, ki so se uvrstili v 12 sekvenčnih tipov in 8 klonskih kompleksov, pri 2 sekvenčnih tipih pa klonski kompleks ni bil določen.

#### 5.1.1 Izolati farmskega in klavniškega okolja

Farmski izolati, ki smo jih vključili v tipizacijo MLST, so bili pridobljeni iz treh farm: farma A, B in B2. Farmski izolati so bili izolirani iz fecesa piščancev na farmi in vode v napajalnikih na farmi v 32. in 39. dnevnu reje piščancev. Izolati iz klavniškega okolja pa so bili pridobljeni z vzorčenjem vode za omamljanje, rokavic delavcev v klavnici, stroja za odpiranje kloak, stroja za evisceracijo, aerosola iz prostora za evisceracijo in brisov trupov piščancev po klanju. Vzorčenje je potekalo v pomladnjem in zimskem obdobju, izolacijo sevov pa so izvedli raziskovalci z Veterinarske fakultete.

Skupno 46 tipiziranih izolatov iz farmskega in klavniškega okolja se je uvrstilo v pet sekvenčnih tipov in dva klonska kompleksa, pri dveh sekvenčnih tipih pa klonski kompleks ni bil določen. Sekvenčni tipi, v katere so se uvrstili izolati, so bili: 354, 2863, 5205, 905 in 3030. Kar 21 izmed 46 izolatov se je uvrstilo v sekvenčni tip 5205. Izolati iz tega sekvenčnega tipa so bili izolirani iz farmskega in klavniškega okolja tako v pomladnjem, kot tudi v zimskem obdobju vzorčenja. V pomladnjem obdobju vzorčenja so bili izolirani tudi iz farme A, kjer so kampilobakte izolirali iz vode v napajalniku v 32. dnevnu, v 39. dnevnu pa so jih izolirali tudi iz piščančjih fecesov. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da je bila tu vir širjenja kontaminacije na farmi prav voda in to potrjuje našo delovno hipotezo, vode kot ključnega izvora in vektorja za širjenje okužbe s kampilobaktri. Naslednja večja skupina 11 izolatov se je uvrstila v sekvenčni tip 905. Izolati so bili izolirani iz farme B in B2, ter klavniškega okolja v pomladnjem obdobju vzorčenja. Pri farmi B so bili kampilobaktri izolirani iz vode v napajalniku v 32. in 39. dnevnu, pri farmi

B2 pa tako iz vode kot tudi iz fecesa piščancev v 39. dnevu. Tudi tu se je pojavila kolonizacija s kampilobaktri proti koncu reje piščancev. Podobne rezultate so dobili tudi Bull in sod. (2006), ki kot možen razlog za kolonizacijo s kampilobaktri šele po 3. tednu starosti navajajo daljšo izpostavljenost kampilobaktrom pri starejših piščancih, prav tako pa bi bil lahko vzrok zaščita mlajših piščancev z materinimi protitelesi (Sahin in sod., 2001). Tudi pri tem sekvenčnem tipu vidimo prenos kampilobaktrov preko vode na farmi in prenos kontaminacije iz farme na klavno linijo, saj so bili kampilobaktri tega tipa prisotni tako na rokavicah delavcev, kot tudi na trupih piščancev celo po hlajenju.

V sekvenčni tip 2863 pa se je uvrstilo 9 izolatov iz zimskega obdobja vzorčenja. Tudi tu so se kampilobaktri najprej pojavili v fecesu piščancev na farmi v 5. tednu, kontaminacija pa se je tako prenesla tudi na klavno linijo. V pomladnjem obdobju vzorčenja sta se pojavila še dva sekvenčna tipa 534 in 3030, ki pa sta bila prisotna le na klavnih linijah. Za ta dva izolata tako ne moremo vedeti kako sta se prenesla na klavno linijo, a glede na ostale rezultate lahko sklepamo, da so bili tudi tu vir kontaminacije piščanci, ki so se kolonizirali med rejo na farmi, saj na klavnih linijah pred zakolom ni bilo prisotnih kampilobaktrov.

Glede na naše rezultate in podatke z Veterinarske fakultete, so negativne farme ostale negativne tudi na klavnih linijah, medtem ko so bili piščanci iz kontaminiranih farm tudi po zakolu pozitivni. Potrdimo lahko, da je v klavnici prihajalo do navzkrižnih kontaminacij mesa, saj so bili pri koloniziranih jatah kampilobaktri prisotni tako na rokavicah delavcev, kot tudi na klavnih instrumentih in v zraku. Kot pomemben vir in vektor prenosa pri kolonizacijah s kampilobaktri pa lahko potrdimo tudi vodo.

Ugotovljen nivo kontaminacije po podatkih z Veterinarske fakultete (naobjavljeni rezultati), pri farmah, kjer je bil prisoten kampilobakter na trupih živali, se je gibal od  $1,6 \times 10^3$  do več kot  $1,5 \times 10^4$  CFU/g, in se je nižal proti koncu klavne linije, saj spiranje trupov z vodo zmanjša nivo kontaminacije. Po 4 - dnevnom hlajenju pa se je nivo kontaminacije zmanjšal na  $1,2 \times 10^2$  do  $3,0 \times 10^3$  CFU/g, po zamrzovanju pa je bil od 4 do 76 CFU/g. Iz teh podatkov lahko vidimo, da glede na infektivno dozo, ki se giblje od 500 do  $2 \times 10^9$  bakterij, okuženi piščanci predstavljajo tveganje za okužbo ljudi s kampilobaktri (Zoete in sod., 2006).

### **5.1.2 Izolati iz piščančjega mesa in fecesa**

Izolati, ki so bili izolirani iz piščančjega mesa, ki je bilo zaseženo na mejnem prehodu Obrežje, so se uvrstili v dva klonska kompleksa, in sicer sta se izolata C33 in C39 uvrstila v sekvenčni tip 400 in klonski kompleks 353, izolat C2 pa v sekvenčni tip 1707 in klonski kompleks 354. Zanimivo je, da sta se v sekvenčni tip 400 uvrstila tudi dva izolata iz piščančjega fecesa iz Zagreba.

Kot vidimo so se izolati C33, C39, D59 in D60 uvrstili v isti klonski kompleks kot 21 izolatov iz farme A in klavnice, kar kaže na to, da se s sevi tega klonskega kompleksa lahko okužimo preko piščančjega mesa. Enako pa velja tudi za seve iz sekvenčnega tipa 1707, saj so po podatkih iz podatkovne zbirke PubMLST povzročitelji gastroenteritisa pri ljudeh in so bili izolirani tudi iz piščancev in piščančjega mesa v Angliji, na Nizozemskem in v Luksemburgu (Jolley in Maiden, 2010).

### 5.1.3 Vodni izolati

Za vodne izolate je značilna velika genetska pestrost. To kažejo tudi naši rezultati, saj se je pet izolatov vode iz območja Slovenije uvrstilo v pet različnih klonskih kompleksov, in sicer v klonske komplekse 21, 22, 45, 658 in 952.

Za seve iz klonskih kompleksov 21 in 45 je značilno, da so najpogostejši povzročitelji gastroenteritisa pri ljudeh (French in sod., 2005). Sevi, ki spadajo v klonski kompleks 45, so dobro prilagojeni na preživetje izven gostitelja in tudi bolj odporni na stres od ostalih sevov, zato ni presenetljivo, da se pojavljajo v različnih ekoloških nišah in gostiteljih. Pojavljajo se tudi v površinskih vodah in lahko kolonizirajo tudi perutnino, a humane okužbe preko uživanja okužene perutnine niso pogoste. Ljudje se s sevi tega klonskega kompleksa najpogosteje okužijo preko kontaminirane vode ali preko hišnih ljubljenčkov (Sopwith in sod., 2008). Sevi, ki se uvrščajo v klonski kompleks 21, prav tako spadajo med generaliste, in se tako pojavljajo v različnih okoljih, zato je to tudi prevladujoči klonski kompleks po vsem svetu (Gripp in sod., 2011). Sevi, ki spadajo v ta klonski kompleks, so bili izolirani iz domačih živali, divjih živali, vode, ljudi in hrane (Gripp in sod., 2011; French in sod., 2005). Sevi klonskega kompleksa 22 so bili izolirani tako pri živalih kot tudi ljudeh, kjer so povzročali komplikacije pri kampilobaktriozah (Revez in sod., 2011). Prav tako so seve iz klonskih kompleksov 21, 22 in 45 izolirali tudi Rodríguez-Martínez in sod. (2013), ki so ugotovljali prisotnost in pestrost kampilobaktrov v okoljskih vodah Mediterana. Izolate iz klonskega kompleksa 952 so izolirani iz humanih kliničnih vzorcev, goveda, divjih ptic, okolja in ostalih živali, ne pa tudi iz piščancev (Griekspoor in sod., 2010). Sekvenčni tip 6170, ki se je pojavil pri našem izolatu iz vode, je bil leta 2011 vnesen v bazo podatkov PubMLST, in sicer je bil izoliran iz površinske vode v Luksemburgu (Jolley in Maiden, 2010). Glede na to lahko predvidevamo, da je ta sekvenčni tip značilen za vodno okolje. Za seve iz sekvenčnega tipa 657, ki spadajo v klonski kompleks 658, pa je glede na podatke iz PubMLST značilno, da so povzročitelji gastroenteritisa, in so bili izolirani iz človeškega fecesa (Jolley in Maiden, 2010). Pojav tega seva v naših površinskih vodah kaže na kontaminacijo teh vod s fakalijami.

### 5.1.4 Genetska raznolikost

Genetska raznolikost naših izolatov je bila najbolj odvisna od izvora oz. geografske oddaljenosti vzorcev. Najbolj raznoliki so bili vodni izolati, kjer se je vsak izolat uvrstil v svoj sekvenčni tip. Pri izolatih iz farme in klavne linije pa ni bilo velike raznolikosti. Pri teh izolatih je šlo za kolonizacijo jate piščancev z enim sevom, ki se je nato prenesel na klavno linijo. Tako se je 46 izolatov razvrstilo v le pet sekvenčnih tipov in dva klonska kompleksa. Razlike pa so nastale tudi glede obdobja vzorčenja, saj so se sevi iz pomladnega obdobja vzorčenja uvrstili v štiri sekvenčne tipe, medtem ko so se sevi iz zimskega obdobja uvrstili v le dva sekvenčna tipa. Tako smo opazili večjo pestrost izolatov v pomladnjem kot v zimskem obdobju vzorčenja. Najbolj zastopan klonski kompleks je bil klonski kompleks 353 s sekvenčnim tipom 5205. Ta sekvenčni tip so Kovač in sod. (2014) prvič dokazali pri piščančjih izolatih iz območja Slovenije in po tem lahko sklepamo, da je ta sev značilen za to območje. V klonski kompleks 354 pa sta se uvrstila sekvenčna tipa 354 in 2863. Sekvenčni tip 354 se je pojavljal na klavnih linijah tudi pri študijah Wirz in sod. (2010) v Švici in Bull in sod. (2006) v Veliki Britaniji, prav tako pa je bil tipiziran pri študiji v Veliki Britaniji, kjer so preučevali pojavljanje kampilobaktrov na kletkah tekom transporta piščancev do klavnice (Hastings in sod., 2010). Sekvenčni tip 2863 je bil po podatkih PubMLST leta 2007 prvič izoliran v Angliji in Italiji, kot povzročitelj gastroenteritisa pri ljudeh, kjer je šlo za sporadično okužbo. Sekvenčna tipa 905 in 3030, ki nista imela določenega klonskega kompleksa, pa sta bila glede na podatke na PubMLST izolirana tako iz piščančjega mesa, kot tudi človeškega fecesa kot povzročitelja gastroenteritisa (Jolley in Maiden, 2010). Sekvenčni tip 905 je bil izoliran v Angliji, Belgiji in Nemčiji, sekvenčni tip 3030 pa v Španiji, Belgiji in Italiji (Jolley in Maiden, 2010). Prisotnost teh dveh sevov pri izolatih piščancev in na klavni liniji kažejo na možnost povzročitve okužbe pri ljudeh tudi na našem območju.

### 5.2 TIPIZACIJA *flaA*

S tipizacijo *flaA* se je 56 naših izolatov uvrstilo v 10 različnih alelnih tipov *flaA*. Alelni tipi *flaA* so bili povezani s sekvenčnimi tipi tipizacije MLST, tako da je izolat z istim sekvenčnim tipom spadal v isti alelni tip. Poleg tega so se sevi, ki so se uvrstili v sekvenčne tipe 354, 905 in 3030, uvrstili v isti *flaA* alelni tip, tako da uporaba tipizacije *flaA* pri naših vzorcih ni pripomogla k boljši moči razlikovanja. Sevi so se večinoma ločili znotraj klonskega kompleksa, razen v skupini sevov, kjer klonski kompleks ni bil določen. Tu so izolati spadali v isti *flaA* alelni tip, četudi so se uvrstili v dva sekvenčna tipa, prav tako pa so v ta alelni tip spadali tudi izolati iz klonskega kompleksa 354. Najpogostejše *flaA* nukleotidno zaporedje je sodilo v alelni tip 278, ki se je pojavil pri sekvenčnem tipu 5205, ki je bil tudi najpogostejši sekvenčni tip. Vodni izolati so bili tudi tu najbolj pestri, kar je bilo po pričakovanjih, saj se je vsak izolat uvrstil v svoj sekvenčni tip in v povezavi s tem tudi v svoj alelni tip *flaA*.

Dingle in sod. (2005) so ugotovili, da se pri posameznih sekvenčnih tipih pojavljajo različni *flaA* SVR aleli, kar z našimi rezultati ne moremo potrditi. Indeks moči razlikovanja je bil namreč pri tipizaciji *flaA* 0,758, kar je manj kot pri tipizaciji MLST, kjer je indeks znašal 0,797.

### 5.3 MNOGOKRATNI PCR (mPCR)

Med našimi izolati se je kar 37 od 54 identificiranih sevov uvrstilo v skupino C9i. Zanimivo je, da so se v to skupino uvrstili izolati, ki so bili pridobljeni iz površinskih vod, klavnic in farm. V to skupino pa sta se uvrstila tudi izolata iz piščančjega mesa (C33 in C39), pridobljena v okviru projekta PROMISE. Ti izolati so spadali v različne sekvenčne tipe, prav tako pa tudi v različne klonske kompekse, a so se z mPCR vseeno uvrstili v isto skupino, kar kaže na to, da ta metoda tipizacije nima tako velike moči razlikovanja kot metoda MLST. To jasno kaže tudi indeks razlikovanja, ki je glede na naše rezultate za to metodo tipizacije znašal 0,511, kar je veliko manj kot indeksa tipizacije MLST in *flaA* (0,797 oz. 0,758). Pri ostalih izolatih, so se sevi uvrstili v skupine glede na različen sekvenčni tip, in sicer se sevi z različnimi sekvenčnimi tipi niso uvrstili v isto skupino. Največja pestrost je bila tudi tu pri vzorcih iz vode, kar smo ugotovili že z metodo MLST in tipizacijo *flaA*.

To tipizacijsko metodo so za *C. jejuni* razvili in validirali Stabler in sod. (2013). Ta hitra metoda jim je pomagala določiti genetske skupine in določila vlogo vira okužbe za vsak izolat. Ugotovili so, da so klinični izolati prisotni v vseh genetskih skupinah in da se je kar 49 od 60 izolatov izoliranih iz živine uvrstilo v skupine C1 - C6. V skupinah C7 - C9 pa naj bi bili izolati, ki niso bili izolirani iz živine. V skupini C7 in C9i so se uvrstili izključno klinični izolati, v skupini C8 pa je bil prisoten tudi en izolat, ki je bil izoliran iz vola.

## 6 SKLEPI

- Izmed 159 sevov, ki so bili vključeni v identifikacijo vrste *C. jejuni* / *C. coli*, smo potrdili 56 sevov za nadaljnje analize, kar je nekoliko manj kot smo predvideli v hipotezah (60 – 70).
- 56 izolatov se je z metodo MLST uvrstilo v 12 sekvenčnih tipov in 8 klonskih kompleksov, pri dveh sekvenčnih tipih pa klonski kompleks ni bil določen. S tipizacijo *flaA* so se izolati uvrstili v 10 *flaA* alelnih tipov in z mPCR v 8 mPCR skupin.
- Primerjava zmožnosti uporabljenih tipizacijskih metod za razlikovanje med sevi kaže, da je najprimernejša metoda tipizacije MLST s Simpsonovim indeksom 0,797, sledi ji tipizacija *flaA*, z vrednostjo 0,758. Najslabše je razlikovala metoda mPCR z indeksom 0,511.
- Najbolj raznoliki so bili izolati iz vode. Za vzorce, izolirane iz piščancev na farmah in med klavnim procesom ni bila ugotovljena velika genetska pestrost. Ugotovili smo, da klavica predstavlja kritično kontrolno točko za kontaminacijo, saj so bili pri predhodno koloniziranih jatah kampilobaktri izolirani tudi iz rokavic delavcev, aerosola in klavnih instrumentov.
- Glede na rezultate lahko sklepamo, da je voda vir in vektor okužb, saj so se pri eni farmi kampilobaktri pojavili v vzorcu vode en teden pred kolonizacijo piščancev. Prav tako so se kampilobaktri, izolirani iz površinskih vod, uvrstili v iste sekvenčne tipe kot kampilobaktri, ki so po podatkih z medmrežja bili identificirani kot povzročitelji gastroenteritisa pri ljudeh.

## 7 POVZETEK

Kampilobaktri so najpogostejši povzročitelji gastroenteritisa po vsem svetu. So komenzali v prebavnem traktu perutnine in divjih ptic, najdemo pa jih tudi pri rejnih živalih. V okolju so prisotni v rekah, potokih in jezerih, izolirali pa so jih tudi iz številnih divjih živali. Znane so številne okužbe ljudi s kampilobaktri preko piščančjega mesa. Piščanec se lahko kolonizira med rejo na farmi, med transportom do klavnice in na klavni liniji.

Da bi lahko odkrili vir okužbe, so bile za *C. jejuni* razvite številne tipizacijske metode. Molekularne metode, ki se trenutno najpogosteje uporabljajo, so sekvenciranje multilokusnih zaporedij (MLST), tipizacija *flaA*, pulzna gelska elektroforeza (PFGE), primerjalna genomska hibridizacija na mikromrežah (MCGH), primerjalni genomski prstni odtis (CGF), ter sekvenciranje celotnega genoma (WGS).

Za tipizacijo sevov *C. jejuni*, ki so bili izolirani med rejo piščancev, tekom klavne linije in iz mesa piščancev, smo uporabili tipizacijsko metodo MLST, ki smo jo dopolnili s tipizacijo *flaA*. Z metodo MLST se je 56 izolatov uvrstilo v 12 sekvenčnih tipov in osem klonskih kompleksov, pri dveh sekvenčnih tipih pa klonski kompleks ni bil določen. Najpogostejši klonski kompleks je bil ST-353, sledil pa mu je ST-354. Največja pestrost rezultatov je bila pri vodnih izolatih, kjer se je vsak izolat uvrstil v svoj klonski kompleks. Pri izolatih iz farme in klavne linije pa ni bilo velike pestrosti, saj se je 46 izolatov uvrstilo v pet sekvenčnih tipov in dva klonska kompleksa, pri dveh sekvenčnih tipih pa klonski kompleks ni bil določen. Ugotovili smo, da so se kampilobaktri iz farme preko koloniziranih piščancev prenesli tudi na klavno linijo in tu je prisotna velika nevarnost navzkrižne kontaminacije pri morebitno še nekontaminiranih piščancih. Na farmah pa lahko kot glavni vir in vektor okužb potrdimo okuženo vodo.

S tipizacijo *flaA* smo dobili 10 alelnih tipov *flaA*, ti pa niso ločili znotraj posameznih sekvenčnih tipov, pridobljenih z MLST. Tako vidimo, da je imela tipizacija *flaA* nižji indeks razlikovanja kot metoda MLST in nam ni omogočila bolj natančne tipizacije.

Želeli pa smo ugotoviti tudi, če mPCR prav tako dobro loči izolate kot ostali metodi. Z mPCR se je 54 izolatov uvrstilo v osem skupin, med katerimi je bila najbolj zastopana skupina C9i z 37 izolati. Ta metoda ni dobro ločila izolatov iz različnih virov, njen indeks razlikovanja pa je bil veliko nižji od indeksov ostalih dveh metod. Kljub temu pa je ta metoda uporabna in primerna za hitro in cenovno ugodno tipizacijo velikega števila izolatov pri presejalnih testiranjih.

## 8 VIRI

- Adedayo O., Kirkpatrick B. D. 2008. *Campylobacter jejuni* infections: update on presentation, diagnosis, and management. Hospital Physician, 44, 7: 9 - 15
- Allen V. M., Bull S. A., Corry J. E. L., Domingue G., Jørgensen F., Frost J. A., Whyte R., Gonzalez A., Elviss N., Humphrey T. J. 2007. *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. International Journal of Food Microbiology, 113: 54 - 61
- Allos B. M. 2001. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. Clinical Infectious Diseases, 32: 1201 – 1206
- Applied Maths. 2010. BioNumerics. Austin, Applied Maths: 1 str.  
<http://www.applied-maths.com/bionumerics> (april 2013)
- Arbeit R. D. 1995. Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. V: Manual of clinical microbiology. 6<sup>th</sup> ed. Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Yolken R.H. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 190 - 208
- Axelsson-Olsson D., Waldenström J., Broman T., Olsen B., Holmberg M. 2005. Protozoan *Acanthamoeba polyphaga* as a potential reservoir for *Campylobacter jejuni*. Applied and Environmental Microbiology, 71, 2: 987 - 992
- Barrios P. R., Reiersen J., Lowman R., Bisaiillon J. R., Michel P., Fridriksdóttir V., Gunnarsson E., Stern N., Berke O., McEwen S., Martin W. 2006. Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in broiler flocks in Iceland. Preventive Veterinary Medicine, 74: 264 - 278
- Blaser M. J. 1997. Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. Journal of Infectious Diseases, 176: S103 – 105
- Bull S. A., Allen V. M., Domingue G., Jørgensen F., Frost J. A., Ure R., Whyte R., Tinker D., Corry J. E. L., Gillard-King J., Humphrey T. J. 2006. Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. Applied and Environmental Microbiology, 72, 1: 645 - 652
- Buswell C. M., Herlihy Y. M., Lawrence L. M., McGuigan J. T., Marsh P. D., Keevil C. W., Leach S. A.. 1998. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. Applied and Environmental Microbiology, 64, 2: 733 - 741
- Butzler J.-P. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clinical Microbiology and Infectious Disease, 10: 868 - 876
- Clark C. G., Taboada E., Grant C. C. R., Blakeston C., Pollari F., Marshall B., Rahn K., MacKinnon J., Daignault D., Dylan P., Ng L.-K. 2012. Comparison of molecular typing methods useful for detecting clusters of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates through routine surveillance. Journal of Clinical Microbiology, 50, 3: 798 - 809

- Colles F. M., Jones K., Harding R. M., Maiden M. C. J. 2003. Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* isolates from farm animals and the farm environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 12: 7409 - 7413
- Colles F. M., McCarthy N. D., Sheppard S. K., Layton R., Maiden M. C. J. 2010. Comparison of *Campylobacter* populations isolated from a free-range broiler flock before and after slaughter. *International Journal of Food Microbiology*, 137: 259 - 264
- Cooper J. E., Feil E. J. 2004. Multilocus sequence typing – what is resolved? *Trends in Microbiology*, 12, 8: 373 - 377
- Corcionivoschi N., Drinceanu D., Ţef L., Julean C. 2009. *Campylobacter jejuni* - A monographic study (review). *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*, 42, 1: 26 - 34
- Corry J. E. L., Atabay H. I. 2001. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 96S - 114S
- Damjanova I., Jakab M., Farkas T., Mészáros J., Galántai Z., Turcsányi I., Bistyák A., Juhász Á, Pászti J., Kiss I., Kardos G. 2011. From farm to fork follow-up of thermotolerant campylobacters throughout the broiler production chain and in human cases in a Hungarian county during a ten-months period. *International Journal of Food Microbiology*, 150: 95 - 102
- Dasti J. I., Tareen A. M., Lugert R., Zautner A. E., Groß U. 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief over view on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300: 205 - 211
- Dingle K. E., Colles F. M., Wareing D. R. A., Ure R., Fox A. J., Bolton F. E., Bootsma H. J., Willems R. J. L., Urwin R., Maiden M.C. J. 2001. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 1: 14 - 23
- Dingle K.E., Colles F. M. , Ure R., Wagenaar J. A., Duim B., Bolton F. J., Fox A. J., Wareing D. R. A., Maiden M. C. J. 2002. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 9: 949 - 955
- Dingle K. E., Colles F. M., Falush D., Maiden M. C. 2005. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1: 340 – 347
- Dingle K. E., McCarthy N. D., Cody A. J., Peto T. E. A., Maiden M. C. J. 2008. Extended sequence typing of *Campylobacter* spp., United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 10: 1620 - 1622
- Eberle K. N., Kiess A. S. 2012. Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. *Poultry Science*, 91: 255 - 264
- EFSA. 2013. EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2011. EFSA Journal, 11, 4: 3129, doi: 10.2903/j.efsa.2013.3129: 250 str.
- EFSA. 2011. Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and / or targets at different stages of the food chain. EFSA Journal, 9, 4: 2105, doi:10.2903/j.efsa.2011.2105: 141 str.

- EFSA. 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU, 2008 - Part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. EFSA Journal, 8, 8: 1522, doi:10.2903/j.efsa.2010.1522: 132 str.
- Engberg J. 2006. Contributions of the epidemiology of *Campylobacter* infections. Danish Medical Bulletin, 53, 4: 361 - 389
- Enright M. C., Spratt B. G. 1999. Multilocus sequence typing. Trends in Microbiology, 7, 12: 482 - 487
- French N., Barrigas M., Brown P., Ribiero P., Williams N., Leatherbarrow H., Birtles R., Bolton E., Fearnhead P., Fox A. 2005. Spatial epidemiology and natural population structure of *Campylobacter jejuni* colonizing a farmland ecosystem. Environmental Microbiology, 7, 8: 1116 - 1126
- French N. P., Midwinter A., Holland B., Collins-Emerson J., Pattison R., Colles F., Carter P. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from wild - bird fecal material in children's playgrounds. Applied and Environmental Microbiology, 75, 3: 779 - 783
- Gerwe T., Miflin J. K., Templeton J. M., Bouma A., Jaap A. Wagenaar J. A., Jacobs - Reitsma W. F., Stegeman A., Klinkenberg D. 2009. Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. Applied and Environmental Microbiology, 75, 3: 625 - 628
- Griekspoor P., Engvall E. O., Olsen B., Waldenström J. 2010. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* from broilers. Veterinary Microbiology, 140: 180 - 185
- Gripp E., Hlahla D., Didelot X., Kops F., Maurischat S., Tedin K., Alter T., Ellerbroek L., Schreiber K., Schomburg D., Janssen T., Bartholomäus P., Hofreuter D., Woltemate S., Uhr M., Brenneke B., Gruning P., Gerlach G., Wieler L., Suerbaum S., Josenhans C. 2011. Closely related *Campylobacter jejuni* strains from different sources reveal a generalist rather than a specialist lifestyle. BMC Genomics, 12: 584, doi:10.1186/1471-2164-12-584: 21 str.
- Gruntar I., Ocepек M., Avberšek J., Mićunović J., Pate M. 2010. A pulsed-field gel electrophoresis study of the genetic diversity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry flocks in Slovenia. Acta Veterinaria Hungarica, 58, 1: 19 - 28
- Hald B., Skovgård H., Bang D. D., Pedersen K., Dybdahl J., Jespersen J. B., Madsen M. 2004. Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. Emerging Infectious Diseases, 10, 8: 1490 - 1492
- Hansson I., Ederoth M., Andersson L., Vaøgsholm I., Olsson E. 2005. Transmission of *Campylobacter* spp. to chickens during transport to slaughter. Journal of Applied Microbiology, 99: 1149 - 1157

- Hastings R., Colles F. M., McCarthy N. D., Maiden M. C. J., Sheppard S. K. 2010. *Campylobacter* genotypes from poultry transportation crates indicate a source of contamination and transmission. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 266 - 276
- Höök H., Fattah M. A., Ericsson H., Vågsholm I., Danielsson-Tham M. L. 2005. Genotype dynamics of *Campylobacter jejuni* in a broiler flock. *Veterinary Microbiology*, 106: 109 - 117
- Hue O., Bouquin S. L., Laisney M. J., Allain V., Lalande F., Petetin I., Rouxel S., Quesne S., Gloaguen P. Y., Picherot M., Santolini J., Salvat G., Bougeard S., Chemaly M. 2010. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. *Food Microbiology*, 27: 992 - 999
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. 2007. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 237 - 257
- Hunter P. R., Gaston M. A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 11: 2465 – 2466
- Jolley K. A., Maiden M. C. J. 2010. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 11: 595, doi:10.1186/1471-2105-11-595: 11 str.
- Jonsson M. E., Chriélb M., Norströma M., Hofshagena M. 2012. Effect of climate and farm environment on *Campylobacter* spp. colonisation in Norwegian broiler flocks. *Preventive Veterinary Medicine*, 107: 95 - 104
- Klein G., Beckmann L., Vollmer H. M., Bartelt E. 2007. Predominant strains of thermophilic *Campylobacter* spp. in a german poultry slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*, 117 : 324 - 328
- Kovač J., Čadež N., Lušicky M., Møller Nielsen E., Ocepek M., Raspor P., Smole Možina S. 2014. The evidence for clonal spreading of quinolone resistance with a particular clonal complex of *Campylobacter jejuni*. *Epidemiology and Infection*, 13: 1 - 9
- Lake R., Hudson A., Cressey P., Gilbert S. 2007. Risk profile: *Campylobacter jejuni / coli* in poultry (whole and pieces). Christchurch, Institute of Environmental Science & Research Limited: 87 str.  
[http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Risk\\_Profile\\_Campylobacter\\_Jejuni-Science\\_Research.pdf](http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Risk_Profile_Campylobacter_Jejuni-Science_Research.pdf) (junij 2013)
- Maiden M. C. J., Bygraves J. A., Feil E., Morelli G., Russell J. E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D., Feavers I. M., Achtman M., Spratt B. G. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 3140 - 3145
- Mangels J. I. 2014. Risk profile: *Campylobacter jejuni / coli* in poultry (whole and pieces). Santa Rosa, California Association for Medical Laboratory Technology: 33 str.  
[http://www.camlt.org/pdf\\_files/forms/994-form.pdf](http://www.camlt.org/pdf_files/forms/994-form.pdf) (junij 2014)

- Meinersmann R. J., Helsel L. O., Fields P. I., Hiett K. L. 1997. Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 11: 2810 - 2814
- Melero B., Juntunen P., Hänninen M. L., Jaime I., Rovira J. 2012. Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. *Food Microbiology*, 32: 124 - 128
- Messens W., Herman L., Zutter L. D., Heyndrickx M. 2009. Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*. *Veterinary Microbiology*, 138: 120 - 131
- Murphy C., Carroll C., Jordan K. N. 2006. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 4: 623 - 632
- Nachamkin I., Bohachick K., Patton C. M. 1993. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 6: 1531 - 1536
- Newell D. G., Fearnley C. 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Environmental Microbiology*, 69, 8: 4343 - 4351
- Olsen S. J., Hansen G. R., Bartlett L., Fitzgerald C., Sonder A., Manjrekar R., Riggs T., Kim J., Flahart R., Pezzino G., Swerdlow D. L. 2001. An outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with food handler contamination: The use of pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Infectious Diseases*, 183: 164 - 167
- On S. L. W. 2013. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here? *Journal of Microbiological Methods*, 95, 1: 3 - 7
- Pendleton S., Hanning I., Biswas D., Ricke SC. 2013. Evaluation of whole-genome sequencing as a genotyping tool for *Campylobacter jejuni* in comparison with pulsed-field gel electrophoresis and *flaA* typing. *Poultry Science*, 92, 2: 573 - 580
- Petersen L., Nielsen E. M., On S. L. W. 2001. Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flock. *Veterinary Microbiology*, 82: 141 - 154
- Reeser R. J., Medler R. T., Billington S. J., Jost B. H., Joens L. A. 2007. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6: 1908 - 1913
- Revez J., Rossi M., Ellstro P., de Haan C., Rautelin H., Hänninen M. L. 2011. Finnish *Campylobacter jejuni* strains of multilocus sequence type ST-22 complex have two lineages with different characteristics. *PLoS ONE*, 6, 10: e26880, doi: 10.1371/journal.pone.0026880: 8 str.
- Ribot E. M., Fitzgerald C., Kubota K., Swaminathan B., Barrett T. J. 2001. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 5: 1889 - 1894

- Rodríguez-Martínez S., Cervero-Aragó S., Gil-Martin I., Araujo R. 2013. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from environmental waters in the Mediterranean area. Environmental Research, 127: 56 - 62
- Rollins D. M., Colwell R. R. 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Applied and Environmental Microbiology, 52, 3: 531 - 538
- Sahin O., Zhang Q., Meitzler J. C., Harr B. S., Morishita T. Y., Mohan R. 2001. Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. Applied and Environmental Microbiology, 67: 3951 - 3957
- Sails A.D., Swaminathan B., Fields P.I. 2003. Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. Journal of Clinical Microbiology, 41, 10: 4733 - 4739
- Schönberg-Norio D., Takkinnen J., Hänninen M. L., Katila M. L., Kaukoranta S. S., Mattila L., Rautelin H. 2004. Swimming and *Campylobacter* infections. Emerging Infectious Diseases, 10, 8: 1474 - 1477
- Schwartz D. C., Cantor C. R. 1984. Separation of yeast chromosome - sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell, 37, 1: 67 - 75
- Sheppard S. K., Dallas J. F., Strachan N. J. C., MacRae M., McCarthy N. D., Wilson D. J., Gormley F. J., Falush D., Ogden I. D., Maiden M. C. J., Forbes K. J. 2009. *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. Clinical Infectious Diseases, 48: 1072 - 1078
- Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P. A., Teixeira P. 2011. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. Frontiers in Microbiology, 2: 1 - 12
- Sopwith W., Birtles A., Matthews M., Fox A., Gee S., Painter M., Regan M., Syed Q., Bolton E. 2008. Identification of potential environmentally adapted *Campylobacter jejuni* strain, United Kingdom. Emerging Infectious Diseases, 14, 11: 1769 - 1773
- Spratt B. G. 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. Current Opinion in Microbiology, 2: 312 - 316
- Stabler R. A., Larsson J. T., Al-Jaberi S., Nielsen E. M., Kay E., Tam C. C., Higgins C. D., Rodrigues L. C., Richardson J. F., O'Brien S. J., Wren B. W. 2013. Characterization of water and wildlife strains as a subgroup of *Campylobacter jejuni* using DNA microarrays. Environmental Microbiology, 15, 8: 2371 - 2383
- Struelens M. J., ESGEM, ESCMID 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. Clinical Microbiology and Infection, 2, 1: 21 - 31
- Taboada E. N., Clark C. G., Sprostonc E. L., Carrillo C. D. 2013. Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. Journal of Microbiological Methods, 95: 24 - 31

- Taboada E. N., MacKinnon J. M., Luebbert C. C., Gannon V. PJ., Nash J. HE., Rahn K. 2008. Comparative genomic assessment of multi-locus sequence typing: rapid accumulation of genomic heterogeneity among clonal isolates of *Campylobacter jejuni*. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 229, doi:10.1186/1471-2148-8-229: 12 str.
- Taboada E. N., Ross S. L., Mutschall S. K., MacKinnon J. M., Roberts M. J., Buchanan C. J., Kruczakiewicz P., Jokinen C. C., Thomas J. E., Nash J. H. E., Gannon V. P. J., Marshall B., Pollari F., Clark C. G. 2012. Development and Validation of a Comparative Genomic Fingerprinting Method for High-Resolution Genotyping of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 3: 788 - 797
- Thakur S., Brake J., Keelara S., Zou M., Susick E. 2012. Farm and environmental distribution of *Campylobacter* and *Salmonella* in broiler flocks. *Research in Veterinary Science*, 94: 33 - 42
- Trachoo N. 2003. *Campylobacter jejuni*: An emerging pathogen. *Songkla University Journal of Science and Technology*, 25, 1: 141 - 157
- Urwin R., Maiden M.C. J. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology*, 11, 10: 479 - 487
- Uzunović-Kamberović S., Zorman T., Heyndrickx M., Smole Možina S. 2007. Role of poultry meat in sporadic *Campylobacter* infections in Bosnia and Herzegovina: laboratory - based study. *Croatian Medical Journal*, 48, 6: 842 - 851
- Vandamme P., Ley D. J. 1991. Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, 3: 451 - 455
- VURS. 2011. Poročilo o zoonozah in povzročiteljih zoonoz v Sloveniji v letu 2010. Ljubljana, VURS – Veterinarska uprava Republike Slovenije: 79 str. <http://www.uvhvvr.gov.si/fileadmin/uvhvvr.gov.si/pageuploads/DELOVNA PODROCJA/Zivila/zoonoze/LPzoonoze2010.pdf> (januar 2014)
- Wang G., Clark C. G., Taylor T. M., Pucknell C., Barton C., Price L., Woodward D. L., Rodgers F. G. 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. fetus* subsp. *fetus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 12: 4744 - 4747
- Wassenaar T. M. 2002. Genetic differentiation of *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Infectious Diseases*, 6, 3 S: S22 - S25
- Wassenaar T. M. 2000. Molecular methods for detection, speciation and subtyping of *Campylobacter* spp. *Lohmann Information*, 24: 13 - 19
- Wassenaar T. M., Newell D. G. 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1: 1 - 9
- Wilson D. J., Gabriel E., Leatherbarrow A. J. H., Cheesbrough J., Gee S., Bolton E., Fox A., Fearnhead P., Hart C. A., Diggle P. J. 2008. Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genetics*, 4, 9: e1000203, doi: 10.1371/journal.pgen.1000203: 9 str.

- Wirz S. E., Overesch G., Kuhnert P., Korczak B. M. 2010. Genotype and antibiotic resistance analyses of *Campylobacter* isolates from ceca and carcasses of slaughtered broiler flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 19: 6377 - 6386
- Young K. T., Davis L. M., DiRita V. J. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews*, 5: 665 - 679
- Zimmer M., Barnhart H., Idris U., Lee M. D. 2003. Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens. *Avian Diseases*, 47, 1: 101 - 107
- Zoete M. R., Putten J. P. M., Wagenaar J. A. 2007. Vaccination of chickens against *Campylobacter*. *Vaccine*, 25: 5548 - 5557
- 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

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina za vložen čas, pomoč in nasvete tekom nastajanja magistrske naloge.

Velika zahvala gre tudi somentorici doc. dr. Neži Čadež za vso pomoč in čas, ki mi ga je posvetila tekom laboratorijskega dela in pregleda magistrske naloge.

Zahvaljujem se recenzentu viš. znan. sod. dr. Matjažu Ocepku za strokoven in hiter pregled magistrske naloge in predsednici komisije doc. dr. Blagajani Herzog Velikonja.

Prav tako gre velika zahvala moji delovni mentorici Jasni Kovač, ki mi je z nasveti in bogatimi izkušnjami pomagala pri laboratorijskem delu in nastajanju magistrske naloge.

Rada pa bi se zahvalila tudi mojim najbližnjim in najdražjim, ki so mi vsa leta stali ob strani in me podpirali tekom moje izobraževalne poti.