

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

JELENA B. JOVANOVIĆ

**UČESTALOST NALAZA *CAMPYLOBACTER*
SPP. NA TRUPOVIMA ŽIVINE I NJIHOVA
OSETLJIVOST NA ANTIMIKROBNE LEKOVE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

JELENA B. JOVANOVIĆ

**PREVALENCE OF *CAMPYBACTER* SPP. ON
POULTRY CARCASSES AND
SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIAL
DRUGS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Mentori:

Dr Vlado Teodorović, redovni profesor,

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Vesna Đorđević, naučni savetnik,

Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Članovi komisije:

Dr Nedeljko Karabasil, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Dragan Vasilev, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Tatjana Baltić, naučni saradnik

Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Datum odbrane:

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije deo su istraživanja u okviru projekta „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu” (ev. br. III46009), koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Zahvalnica

Zahvaljujem se prof. dr Vladi Teodoroviću na ukazanom poverenju i usmeravanju tokom izrade doktorske disertacije.

Izrazito veliku zahvalnost dugujem direktoru Instituta za higijenu i tehnologiju mesa, dr. Vesni Đorđević, naučnom savetniku, za strpljenje, razumevanje i bezrezervnu podršku tokom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se članovima Komisije na korektnom i profesionalnom odnosu, punom razumevanja, korisnim sugestijama, podršci i pomoći.

Zahvaljujem se kolegama sa Instituta za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu, na nesebičnoj podršci. Posebno se zahvaljujem kolegi, dr. Branku Velebitu, na požrtvovanosti u organizaciji istraživačkog rada, na strpljenju, iskustvu i znanju koje mi je nesebično pružio.

Veliko hvala prof. dr Milanu Baltiću na velikodušnoj pomoći.

Zahvaljujem se svojoj porodici, na podršci, strpljenju i razumevanju.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svom dragom taji.

UČESTALOST NALAZA *CAMPYLOBACTER* SPP. NA TRUPOVIMA ŽIVINE I NJIHOVA OSETLJIVOST NA ANTIMIKROBNE LEKOVE

Kratak sadržaj

Meso i proizvodi od mesa, posebno meso živine, ima značajnu ulogu u pojavi kampilobakterioze kod ljudi koja je danas u svetu najčešća bolest prenosiva hranom. Brojni su izvori kontaminacije trupova živine u klanicama, uprkos nastojanjima i različitim merama da se učestalost kontaminacije smanji. Lečenje kampilobakterioze ljudi je otežano obzirom na sve veću učestalost rezistencije kampilobakterija na antimikrobne lekove.

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je da se pomoću različitih tehnika izolacije i identifikacije (automatizovani kvalitativni test na principu ELFA tehnologije, selektivne podloge (mCCD agar i CampyFood agar), Real-time PCR tehnika (RTi-PCR) i Multipleks PCR tehnika (m-PCR)), utvrdi učestalost nalaza *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* i *Campylobacter lari* na ohlađenim trupovima živine iz tri objekta, ispita filogenetska srodnost *Campylobacter jejuni*, odnosno *Campylobacter coli* iz tri različita objekta i humanih izolata (dva izolata *Campylobacter jejuni*, odnosno tri izolata *Campylobacter coli*), kao i da se disk difuzionom metodom i E-testom utvrdi osetljivost na odabrane antimikrobne lekove.

Korišćenjem automatizovanog kvalitativnog testa na principu ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) tehnologije *Campylobacter* spp. su dokazane kod 91,30% trupova (ispirak ohlađenih trupova) živine poreklom iz dve industrijske i jedne zanatske klanice (objekata „A“, „B“ i „C“). Zasejavanjem uzoraka ispiraka ohlađenih trupova živine iz sve tri klanice na selektivni modifikovani ugljeni cefperazon deoksiholat agar (mCCD) i CampyFood agar, prisustvo *Campylobacter* spp. utvrđeno je kod 91,30%, odnosno 77,39% trupova živine. Pomoću RealTime PCR tehnike (16S rRNK) na trupovima živine iz sva tri objekta prisustvo *Campylobacter* spp. utvrđeno je u 77,39% uzoraka. U uzorcima ispiraka ohlađenih trupova živine iz zanatske klanice (objekat „C“) učestalost nalaza *Campylobacter* spp. bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) u odnosu na učestalost nalaza *Campylobacter* spp. na trupovima živine iz dva industrijska objekta (objekati „A“ i „B“). Prosečna učestalost nalaza *Campylobacter* spp. na ohlađenim trupovima živine iz sva tri objekta bila je 77,39%. Učestalost nalaza *Campylobacter jejuni*, odnosno

Campylobacter coli na trupovima živine iz industrijskog objekta „A“ bila je ujednačena, dok je u industrijskom objektu „B“, učestalost nalaza *Campylobacter coli* bila veća (57,89%), u odnosu na učestalost nalaza *Campylobacter jejuni* (31,58%). U zanatskom objektu (objekat „C“) učestalost nalaza *Campylobacter jejuni* bila je 54,54%, a *Campylobacter coli* 29,54%. Najmanja učestalost nalaza mešanih kultura bila je kod trupova živine iz objekta „B“ (10,52%), a najveća iz objekta „A“ (38,33%). Prosečna učestalost nalaza *Campylobacter jejuni* iz sva tri objekta bila je 44,87%, *Campylobacter coli* 37,18% i mešanih kultura 17,95%. U uzorcima ispiraka ohlađenih trupova živine ni u jednom objektu nije utvrđeno prisustvo *Campylobacter lari*.

Filogenetska srodnost (pripadnost istoj grani) dokazana je između po jednog izolata *Campylobacter jejuni* sa trupova živine iz objekata „A“ i „C“, između po jednog izolata *Campylobacter jejuni* iz objekata „A“ i „B“, i između jednog izolata iz objekta „B“ i dva izolata iz objekta „C“. Utvrđena je i filogenetska srodnost između jednog humanog izolata i tri izolata *Campylobacter jejuni* sa trupova živine iz objekta „C“. Nije utvrđena filogenetska srodnost između izolata *Campylobacter coli* sa trupova živine iz različitih objekata. Filogenetska srodnost dokazana je između osam izolata *Campylobacter coli* sa trupova živine iz objekta „B“ i dva humana izolata (deset izolata u grani). Takođe je dokazana filogenetska srodnost između dva izolata *Campylobacter coli* sa trupova živine iz objekta „B“ i jednog humanog izolata *Campylobacter coli*.

Opadajući niz osetljivosti na antimikrobne lekove *Campylobacter jejuni* dobijen disk difuzionom metodom bio je: gentamicin (85,71%) > nalidiksinska kiselina > eritromicin > tetraciklini > ciprofloksacin (17,14%), a opadajući niz dobijen E-testom bio je: gentamicin (88,89%) > eritromicin > nalidiksinska kiselina > tetraciklini > ciprofloksacin (14,81%). Opadajući niz osetljivosti na antimikrobne lekove *Campylobacter coli* dobijen disk difuzionom metodom i E-testom bio je identičan: gentamicin (82,76% DDM i 90,91% E-test) > eritromicin > tetraciklini > nalidiksinska kiselina > ciprofloksacin (3,45% DDM i 0% E-test). Disk difuzionom metodom dokazano je da su pojedini izolati *Campylobacter jejuni*, odnosno *Campylobacter coli* bili rezistentni na dva ili više antibiotika.

Ključne reči: trupovi živine, *Campylobacter* spp., prevalencija, filogenetska srodnost, bakterijska rezistencija

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Higijena i tehnologija namirnica animalnog porekla

UDK broj: 619:579.84:636.5

PREVALENCE OF *CAMPYBACTER* SPP. ON POULTRY CARCASSES AND SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIAL DRUGS

Abstract

Meat and meat products, especially poultry meat, play a significant role in the occurrence of campylobacteriosis in humans, which is the most common food-borne disease in the world today. There are numerous sources of contamination of poultry carcasses in slaughterhouses, despite efforts and various measures taken in order to reduce the frequency of contamination. The treatment of campylobacteriosis in humans is difficult due to the increasing frequency of resistance of *Campylobacter* to antimicrobial drugs.

The aim of the research in this doctoral dissertation was to use different isolation and identification techniques (automated qualitative test on the principle of ELFA technology, selective substrate (mCCD agar and CampyFood agar), Real-time PCR technique (RTi-PCR) and Multiplex PCR technique (m-PCR)), in order to determine the frequency of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* on chilled poultry carcasses from three facilities, examined the phylogenetic relationship of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from three different facilities and human isolates (two isolates of *Campylobacter jejuni* and three *Campylobacter coli* isolate), as well as to determine the sensitivity to selected antimicrobial drugs by disk diffusion method and E-test.

Using an automated qualitative test on the principle of ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) technology *Campylobacter* spp. were detected in 91.30% of poultry carcasses (whole-carcass rinse) originating from two industrial and one artisanal slaughterhouses (facilities "A", "B" and "C"). Inoculation of the rinses from chilled poultry carcasses from all three slaughterhouses on selective modified carbon cefperazone deoxycholate agar (mCCD) and CampyFood agar, showed the prevalence of *Campylobacter* spp. was 91.30% and 77.39%, respectively. Using RealTime PCR technique (16S rRNA) on samples from poultry carcasses from all three investigated facilities, the prevalence of *Campylobacter* spp. was 77.39%. The prevalence of *Campylobacter* spp. in whole-carcass rinse samples from chilled poultry carcasses from a craft slaughterhouse (facility "C"), was statistically significantly higher ($p < 0.05$) compared to the prevalence of *Campylobacter* spp. on

poultry carcasses from two industrial facilities (facilities "A" and "B"). Average prevalence of *Campylobacter* spp. on chilled poultry carcasses from all three facilities was 77.39%. The prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on poultry carcasses from industrial facility "A" was equal, while in industrial facility "B", the frequency of *Campylobacter coli* findings was higher (57.89%), in relation to the frequency of *Campylobacter jejuni* findings (31.58%). In the craft facility (facility "C"), the frequency of *Campylobacter jejuni* was 54.54%, and *Campylobacter coli* 29.54%. The lowest frequency of mixed cultures findings was in poultry carcasses from facility "B" (10.52%), and the highest from facility "A" (38.33%). The average frequency of *Campylobacter jejuni* findings from all three facilities was 44.87%, *Campylobacter coli* 37.18% and mixed cultures 17.95%. The presence of *Campylobacter lari* was not detected in any of the samples (whole-carcass rinse) of chilled poultry carcasses.

Phylogenetic relatedness (belonging to the same branch) was proven to be between one *Campylobacter jejuni* isolate from poultry carcasses from facility "A" and "C", between one *Campylobacter jejuni* isolate from facilities "A" and "B", and between one isolate from facility "B" and two isolates from facility "C". The phylogenetic similarity between one human *Campylobacter jejuni* isolate and three *Campylobacter jejuni* isolates from poultry carcasses from facility "C" was also determined. No phylogenetic similarity was established between *Campylobacter coli* isolates from poultry carcasses from different facilities. However, phylogenetic similarity was demonstrated between eight *Campylobacter coli* isolates from poultry carcasses from facility "B" and two human isolates (ten isolates per branch). Phylogenetic similarity was also demonstrated between two *Campylobacter coli* isolates from poultry carcasses from facility "B" and one human *Campylobacter coli* isolate.

The declining range of antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* obtained by the disk diffusion method was: gentamicin (85.71%) > nalidixic acid > erythromycin > tetracyclines > ciprofloxacin (17.14%), and the descending sequence obtained by E-test was: gentamicin (88.89%) > erythromycin > nalidixic acid > tetracyclines > ciprofloxacin (14.81%). The declining range of susceptibility to antimicrobial drugs of *Campylobacter coli* obtained by disk diffusion method and E-test was identical: gentamicin (82.76% DDM and 90.91% E-test) > erythromycin > tetracycline > nalidixic acid > ciprofloxacin (3.45 DDM and 0% E-test). Disc diffusion method proved that certain isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* were resistant to two or more antibiotics.

Key words: poultry carcasses, *Campylobacter* spp., prevalence, phylogenetic similarity, bacterial resistance

Scientific field: Veterinary medicine

Scientific subfield: Hygiene and technology of food of animal origin

UDK number: 619:579.84:636.5

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature	3
2.1 Taksonomija roda <i>Campylobacter</i>	3
2.2 Karakteristike roda <i>Campylobacter</i>	5
2.3 <i>Campylobacter</i> spp. kod životinja	6
2.4 <i>Campylobacter</i> spp. u namirnicama.....	7
2.5 Epidemiološki značaj <i>Campylobacter</i> vrsta.....	10
2.6 Antimikrobna rezistencija	14
2.7 Metode izolacije i detekcije	21
3. Cilj i zadaci istraživanja.....	26
4. Materijal i metode istraživanja.....	27
4.1 Materijal.....	27
4.2 Metode	32
4.3 Statistička obrada podataka.....	42
5. Rezultati istraživanja.....	43
5.1 Rezultati ispitivanja učestalosti nalaza <i>Campylobacter</i> spp. na trupovima živine	43
5.2 Rezultati identifikacije izolata <i>Campylobacter</i> spp. sa trupova živine.....	46
5.3 Rezultati filogenetske srodnosti izolata <i>Campylobacter</i> spp. sa trupova živine i izolata humanog porekla.....	49
5.4 Rezultati antimikrobne osetljivosti izolata <i>Campylobacter</i> spp. prema antimikrobnim lekovima primenom disk difuzione metode.....	53
5.5 Rezultati antimikrobne osetljivosti izolata <i>Campylobacter</i> spp. prema antimikrobnim lekovima primenom kvantitativnog disk difuzionog testa (E-testa)	55
6. Diskusija.....	60
6.1 Kampilobakterioza ljudi i životinja.....	60
6.2 <i>Campylobacter jejuni</i> i <i>Campylobacter coli</i> u mesu živine.....	67
6.3 Filogenetska srodnost izolata <i>Campylobacter</i> spp. sa trupova živine i izolata humanog porekla.....	70
6.4 Rezistencija na antibiotike	74
6.5 Zaključna razmatranja.....	88
7. Zaključci.....	90
8. Spisak literature.....	92

1. Uvod

Kampilobakterioza predstavlja ozbiljan problem javnog zdravlja u celom svetu, odnosno najčešće utvrđen patogen kod alimentarnih epidemija ljudi. Izazivaju je termofilni sojevi *Campylobacter* spp., odnosno *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* i *Campylobacter lari*. Prema podacima Evropske agencije za bezbednost hrane incidencija oboljevanja u 2016. godini u zemljama Evropske unije bila je na nivou od 66,3/100.000 ljudi, odnosno 246.307 registrovanih/prijavljenih slučajeva oboljenja, što predstavlja povećanje broja obolelih od 6,1%, u odnosu na 2015. godinu, kada je incidencija oboljevanja bila 62,9/100.000 ljudi. U 2016. godini su registrovana 62 smrtna slučaja usled kampilobakterioze (EFSA, 2017). U 2014. godini je incidencija oboljevanja u zemljama Evropske unije bila na nivou od 71,0/100.000 ljudi, odnosno 236.851 registrovanih/prijavljenih slučajeva oboljenja, što predstavlja povećanje broja obolelih od 9,6%, u odnosu na 2013. godinu (EFSA, 2015).

U Srbiji je prema izveštaju Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ o zaraznim bolestima u Srbiji u 2016. godini, utvrđeno 581 oboleli, sa stopom incidencije od 8,20/100.000 ljudi (Anon, 2017), dok je u 2015. godini, utvrđeno 482 obolela, sa incidencijom od 6,76/100.000 ljudi (Anon, 2016), a u 2014. godini taj broj je bio 451, sa incidencijom od 6,29/100.000 ljudi (Anon, 2015d).

U Sjedinjenim Američkim Državama, u periodu od 2004. do 2012. godine, zabeleženo je ukupno 303.520 slučajeva kampilobakterioze, tj. u proseku 33.724 slučaj na godišnjem nivou. Incidencija je u tom periodu u proseku iznosila 11,4/100.000 ljudi, odnosno od 10,2/100.000 stanovnika 2006. godine do 13,0/100.000 2012. godine (Geissler i sar., 2017).

Primarni domaćin termofilnih kampilobakterija su domaće i divlje ptice i sisari, tj. njihov gastrointestinalni trakt, odakle putem fekalne ekskrecije dospevaju u lanac hrane i kontaminiraju hranu. Čovek se kampilobakterijama najčešće zarazi preko životinja i proizvoda životinjskog porekla.

Glavni izvori infekcije kod ljudi su živinsko meso i proizvodi od živinskog mesa i to najčešće usled nedovoljne termičke obrade mesa ili kros-kontaminacije između sirove i termički obrađene hrane.

Preko 80% izolata kampilobakterioze ljudi identifikovano je kao *Campylobacter jejuni* (EFSA, 2011).

Kampilobakterije izazivaju gastroenteritis, sa inkubacijom od 2 do 5 dana i simptomima kao što su abdominalni bol, vodene, ponekad hemoragične dijareje, groznica, mučnina i povraćanje. U najtežim slučajevima može doći i do letalnog ishoda.

Antibiotici koji se koriste u veterinarskoj medicini često su isti ili pripadaju istim grupama kao i antimikrobni lekovi koji se koriste u humanoj medicini. Antimikrobna rezistencija se obično razvija i povećava kao posledica upotrebe istih antimikrobnih lekova kod ljudi i životinja (EFSA, 2012b). Upotreba antibiotika kod životinja namenjenih za proizvodnju hrane može da dovede do razvijanja rezistencije kod bakterija u organizmu tretiranih životinja. Ta otpornost bakterija na antimikrobne lekove koja se javlja kod životinja namenjenih za proizvodnju hrane može se preneti na ljude i to preko lanca hrane, vode i životne sredine, kao i direktnim kontaktom sa tim životinjama (EFSA, 2020).

2. Pregled literature

2.1 Taksonomija roda *Campylobacter*

Od 1909. godine je poznato da kampilobakterije izazivaju bolest kod životinja, a tek 1980. godine je prepoznato da mogu da izazovu i bolest kod ljudi.

Familija Campylobacteraceae se sastoji od dva roda: *Campylobacter* i *Arcobacter* (Vandamme i Ley, 1991). Primarno se pojavljuju kao komensali kod ljudi i domaćih životinja.

Taksonomija roda *Campylobacter* je bila predmet mnogih istraživanja. Prvi rad koji je opisivao *Campylobacter* napisao je Theodor Escherich 1886. godine, zatim je 1913. godine usledila prva izolacija *Vibrio*-sličnih organizama iz abortiranih ovčijih fetusa (McFadyean i Stockman). Sebald i Veron su 1963. godine prvi predložili formiranje roda *Campylobacter* i to tako što su dve *Vibrio* vrste (*Vibrio fetus* i *Vibrio bubulus*) prebacili u novi rod i nazvali ih *Campylobacter fetus* i *Campylobacter bubulus* (danas *C. sputorum*). Razlog za prebacivanje ove dve vrste u novi rod je bio taj što je za njihov rast potrebna mikroaerofilna sredina, što imaju nefermentativni metabolizam i nizak stepen srodnosti DNK baza. Deset godina kasnije, 1973. godine, Veron i Chatelain su objavili još kompleksniju studiju o taksonomiji mikroaerofilnih *Vibrio*-sličnih organizama u kojoj su utvrdili četiri vrste u okviru roda *Campylobacter* i to: *Campylobacter fetus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter sputorum*. Veliki napredak u daljem izučavanju i izolaciji kampilobakterija dao je Skirrow 1977. godine, kada je opisao selektivni suplement, koji je predstavljao mešavinu vankomicina, polimiksina B i trimetoprima, i koji se dodavao u osnovnu podlogu. Ovo je omogućilo rutinsku dijagnostiku u laboratorijama (Debruyne i sar., 2008; Silva i sar., 2011).

Klasifikacija ovog roda nije još konačno utvrđena. Prema Debruyne i saradnicima (2008) u rodu *Campylobacter* ima 15 opisanih vrsta, Fernandez i saradnicima (2008) 20 vrsta i podvrsta, a prema On-u (2001) rod *Campylobacter* sadrži 16 vrsta i šest podvrsta.

Prema mišljenju koje je EFSA objavila 2011. godine rod *Campylobacter* obuhvata 23 vrste (2009) i ovaj broj se stalno uvećava zbog identifikacije novih vrsta (EFSA, 2011). Jednu grupu ovog roda čine termofilne, odnosno termotolerantne vrste (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* i *C. helveticus*), dok drugu grupu čine *C. fetus* i *C. hyointestinalis*. Ostale vrste su: *C. concisus*, *C. curvus*, *C. gracilis*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum*. *Campylobacter jejuni* se deli u

dva subspecijesa, tj. podvrste: *C. jejuni* subsp. *jejuni* i *C. jejuni* subsp. *doylei*. U rutinskoj dijagnostici retko se diferenciraju ove dve podvrste.

U studiji iz 2013. godine (On, 2013) data je lista vrsta i podvrsta roda *Campylobacter* koja je može videti u tabeli 2.1.

Tabela 2.1. – Lista vrsta i podvrsta roda *Campylobacter* na dan 30.04.2013., njihovi domaćini i bolesti koje izazivaju (On, 2013)

Vrsta	Domaćin (rezervoar)	Bolest koja nastaje kod	
		ljudi	životinja
<i>C. avium</i>	Živina	Nema	Nema
<i>C. canadensis</i>	Američki ždralovi	Nema	Nema
<i>C. coli</i>	Svinje, živina, nojevi, goveda, ovce	Gastroenteritis	Gastroenteritis, infektivni hepatitis
<i>C. concisus</i>	Ljudi, kućni ljubimci	Gastroenteritis, periodontitis	Nema
<i>C. cuniculorum</i>	Zečevi	Nema	Nema
<i>C. curvus</i>	Ljudi	Periodontitis, gastroenteritis	Nema
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	Goveda, ovce, reptili	Gastroenteritis, septikemija	Spontani abortus
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	Goveda, ovce	Septikemija	Infektivni sterilitet
<i>C. gracilis</i>	Ljudi	Periodontitis	Nema
<i>C. helveticus</i>	Psi, mačke	Periodontitis	Gastroenteritis
<i>C. hominis</i>	Ljudi	Nema	Nema
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	Goveda, jeleni, svinje, hrčci	Gastroenteritis	Gastroenteritis
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	Svinje	Nema	Nema
<i>C. insulaenigrae</i>	Foke, morski prasići	Nema	Nema
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Ljudi	Septikemija, gastroenteritis	Nema
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Živina, goveda, svinje, nojevi, divlje ptice	Gastroenteritis, Guillain-Barré sindrom	Spontani abortus, ptičiji hepatitis
<i>C. lanienae</i>	Goveda	Nema	Nema
<i>C. lari</i> subsp. <i>concheus</i>	Školjkaši	Gastroenteritis	Nema
<i>C. lari</i> subsp. <i>lari</i>	Divlje ptice, psi, živina, školjkaši, konji	Gastroenteritis, septikemija	Ptičiji gastroenteritis
<i>C. mucosalis</i>	Svinje	Nema	Nema
<i>C. peloridis</i>	Školjkaši	Gastroenteritis	Nema
<i>C. rectus</i>	Ljudi	Periodontitis	Nema
<i>C. showae</i>	Ljudi	Periodontitis	Nema
<i>C. sputorum</i>	Ljudi, goveda, svinje, ovce	Gastroenteritis, abscesi	Spontani abortusi
<i>C. subantarcticus</i>	Ptice u subantarktiku	Nema	Nema
<i>C. upsaliensis</i>	Psi, mačke	Gastroenteritis	Gastroenteritis
<i>C. ureolyticus</i>	Ljudi	Gastroenteritis, Kronova bolest	Nema

Vrsta	Domaćin (rezervoar)	Bolest koja nastaje kod	
		ljudi	životinja
<i>C. volucris</i>	Crnoglavi galebovi	Nema	Nema

2.2 Karakteristike roda *Campylobacter*

Campylobacter spp. su gram-negativni, mikroaerofilni, zakrivljeni, pokretni štapići, širine 0,2 – 0,5 μm i 0,5 – 0,8 μm dužine. Ovi štapići mogu izgledati kao zapeta, imati S ili V oblik, tj. oblik raširenih galebovih krila. Ne stvaraju spore, stvaraju toksine. Većina vrsta poseduje flagelu, na jednom ili oba kraja, pomoću koje se svrdlasto kreću. Oksidaza su pozitivni, katalaza varijabilni i većina je mikroaerofilna. *Campylobacter jejuni* hidrolizuje hipurate, indoksil acetat i redukuje nitrate.

Campylobacter spp. je relativno biohemijski neaktivan. Energiju pretežno dobija od amino-kiselina ili međuproizvoda ciklusa trikarbonske kiseline (ciklusa limunske kiseline), a ne od fermentacije ili oksidacije ugljenih hidrata. Zato ih je teško identifikovati do nivoa vrste koristeći klasične biohemijske testove (On, 1996), pa se za identifikaciju koriste metode bazirane na lančanoj reakciji polimeraze (polymerase chain reaction – PCR) (Linton i sar., 1997; Bolton i sar., 2002; On i Jordan, 2003).

Kampilobakterije najbolje rastu na hranljivim podlogama pod mikroaerofilnim uslovima u atmosferi 5% kiseonika, 10% ugljen dioksida i 85% azota. U hranljive podloge se dodaje 5 – 10% krvi, ugalj, hemin ili hematin da bi se kampilobakterije zaštitile od toksičnih derivata kiseonika (vodonik peroksid, slobodni kiseonik, superoksid).

Termofilne *Campylobacter* vrste mogu da rastu na temperaturama između 37 i 42 °C, dok se ne mogu razmnožavati ispod 30 °C, mada se ipak i na 4 °C može detektovati niska metabolička aktivnost (Park, 2002; EFSA, 2005). Optimalna temperatura rasta je 41,5 °C. Levin (2007) je predložio da ove mikroorganizme pre treba nazivati „termotolerantnim“, pošto ne pokazuju pravu termofiliju, tj. rast na temperaturi od 55 °C i više. Ove karakteristike smanjuju mogućnost umnožavanja kampilobakterija izvan organizma domaćina i u hrani tokom prerade i skladištenja (Park, 2002). Optimalna a_w vrednost za rast *Campylobacter* spp. je 0,997, a optimalna pH vrednost je 6,5 do 7,5.

Campylobacter spp. se lako inaktivišu temperaturnim režimima čija D-vrednost iznosi manje od jednog minuta (D-vrednost označava dužinu termičkog tretiranja u minutama pri odgovarajućoj temperaturi pri kojoj broj određenog mikroorganizma opada za jednu \log_{10} jedinicu

ili 90%). Zamrzavanje i odmrzavanje takođe redukuje broj kampilobakterija, s tim što zamrzavanje neće eliminisati bakterije iz već kontaminirane hrane (Silva i sar., 2011).

Pri nepovoljnim uslovima okoline za rast, kampilobakterije imaju sposobnost da formiraju takozvane „viable but non-culturable cells“ (VBNC), tj. vijabilne, ali nekulturable ćelije. U ovom stanju bakterije su u stanju mirovanja i ne mogu se kultivirati u normalnim laboratorijskim uslovima, ali ipak su metabolički aktivne i verovatno mogu da izazovu infekcije. Nakon dospevanja u povoljne uslove dolazi do njihovog rasta i razmnožavanja (Baffone i sar., 2006).

C. jejuni se obično nalazi u digestivnom traktu velikog broja divljih i domaćih životinja, naročito ptica. Smatra se da se često sreće kod ptica zbog optimalne temperature rasta od 41,5 °C. *C. coli* se često nalazi u crevima svinja. *C. jejuni* se diferencira od *C. coli*, pomoću testa hidrolize hipurata, u kom je *C. coli* negativan.

Flagele kampilobakterija imaju važnu ulogu u virulenciji, jer se one pomoću njih kače na sluznicu creva i prodiru u enterocite. Flagela *C. jejuni* i *C. coli* se sastoji od proteina, čiju sintezu kodiraju dva gena, *flaA* i *flaB*, koja se nalaze u paru (Wassenaar i Blaser, 1999). Za prodiranje u enterocite neophodan je *flaA* gen. Dokazano je da mutacije *flaA* gena dovode do skraćivanja i smanjenja pokretljivosti flagela i takve kampilobakterije nemaju sposobnost prodiranja u enterocite u *in vitro* uslovima (Yao i sar., 1994). Nasuprot tome, mutacija u genu *flaB* ne dovodi do promena u sposobnosti invazije.

Kampilobakterije proizvode nekoliko različitih vrsta citotoksina, od kojih je samo citoletalni toksin (“cytolethal distending toxin”, CDT) detaljno proučen. Ovaj toksin, osim kampilobakterija, proizvode i mnoge druge Gram negativne bakterije. Citoletalni toksin sastoji se iz tri subjedinice koje su kodirane genima *cdtA*, *cdtB* i *cdtC*. Sve tri subjedinice su neophodne za punu aktivnost toksina (Bolton, 2015). Dejstvo ispoljava tako što zaustavlja ćelijsku deobu i posledično dovodi do smrti ćelije. Napadnuta ćelija se uvećava nekoliko puta i izgleda kao da je rastegnuta, te se zato ovaj toksin i naziva citoletalni toksin koji izaziva naduvenost ćelije (Konkel i sar, 2001). Ovaj toksin je jedan od glavih faktora virulencije u patogenezi kampilobakterioze. Izaziva dijareju kod ljudi i životinja tako što remeti ćelijsku deobu i diferencijaciju ćelija u crevnim kriptama (Park, 2002).

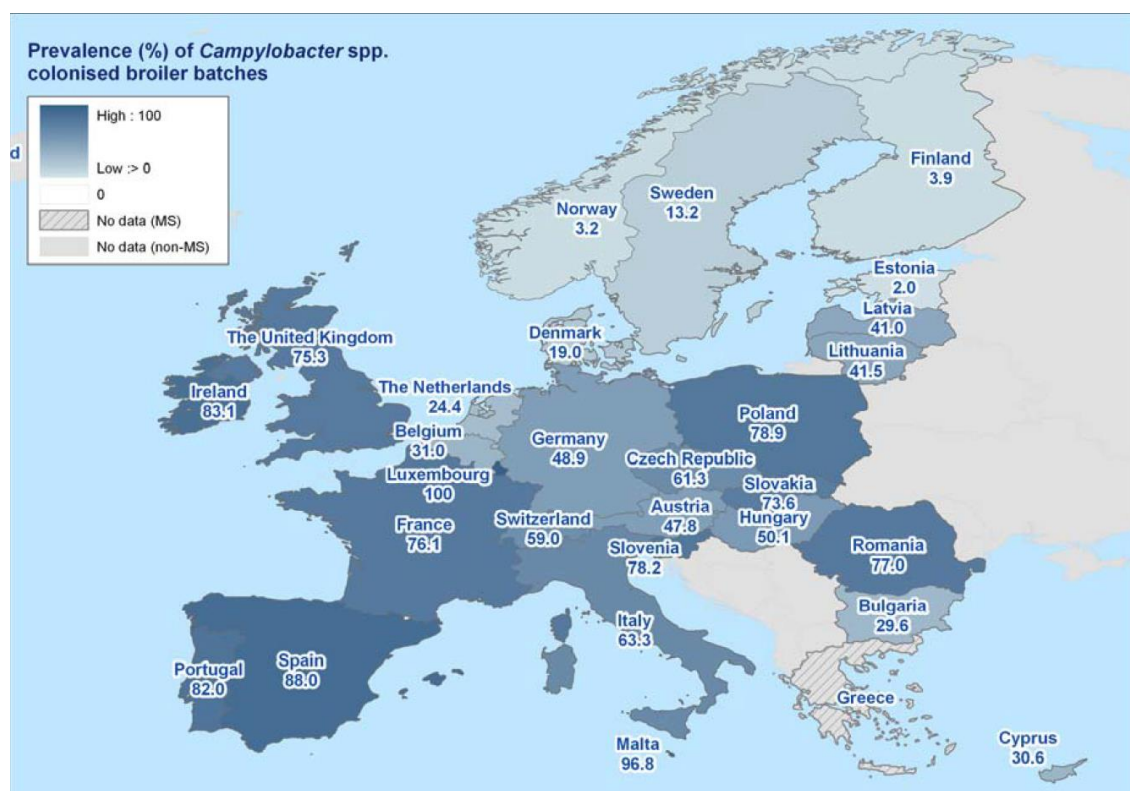
2.3 *Campylobacter* spp. kod životinja

Campylobacter spp. je komensalni mikroorganizam koji se latentno nalazi kod goveda, ovaca, svinja i ptica. Ptice su najčešći domaćin za kampilobakterije, verovatno zbog visoke temperature tela koja odgovara ovim bakterijama (Skirrow, 1977). Iako sve vrste živine koje se

komercijalno uzgajaju mogu biti prenosioci *Campylobacter* vrsta, najveći rizik po zdravlje ljudi predstavljaju brojleri i to zbog najzastupljenije konzumacije njihovog mesa.

2.3.1 *Campylobacter* spp. kod živine

Živina je primarni domaćin, a samim tim i rezervoar termotolerantnih kampilobakterija. Smatra se da *Campylobacter* spp. najčešće ulazi u jato horizontalnim prenošenjem. U brojnim studijama je utvrđeno da se kod tek izleglih pilića ne nalaze kampilobakterije i da do infekcije u jatu dolazi oko treće nedelje života (Wagenaar i sar., 2008).



Slika 2.1. – Prevalencija *Campylobacter*-kolonizovanih jata brojlera u EU, 2008 (EFSA, 2011)

2.4 *Campylobacter* spp. u namirnicama

Campylobacter lako može da kontaminira različite namirnice, uključujući meso, sirovo mleko i proizvode od mleka, dok ređe kontaminira ribu i proizvode od ribe, školjke i sveže povrće.

2.4.1 Meso živine

Meso živine se kontaminira u toku procesa klanja i obrade trupova živine u klanici. Trupovi se najčešće kontaminiraju sadržajem gastrointestinalnog trakta prilikom evisceracije. Postupak obrade trupa je kompleksan, brz i u velikoj meri automatizovan, što pruža veliku mogućnost kontaminacije trupa kampilobakterijama (Wieczorek i sar., 2015). Najkritičnije radne operacije u

toku klanja i obrade trupova živine su: šurenje, čupanje perja, evisceracija, pranje i hlađenje (Berrang i Dickens, 2000).

Tokom šurenja jedan deo kampilobakterija sa površine trupova se spira, ali se druge kampilobakterije dodaju, pošto voda za šurenje brzo postaje kontaminirana fecesom i prljavštinom sa površine živine. Temperatura vode za šurenje (50 - 52 °C ili 56 - 58 °C) ne redukuje značajno broj kampilobakterija. Međutim ipak se može reći da se kontaminacija trupova smanjuje tokom šurenja. Tokom čupanja perja i evisceracije dolazi do povećanja kontaminacije i to zbog izlivanja fekalnog sadržaja i/ili pucanja gastrointestinalnih organa. Čak i vrlo male količine fekalnog sadržaja mogu dovesti do značajnog povećanja broja kampilobakterija na trupovima. Pranjem trupova se značajno redukuje broj *Campylobacter* spp. (i do 90%), i ta redukcija kontaminacije se nastavlja i prilikom hlađenja. Prilikom imerzionog hlađenja (hlađenja potapanjem trupova u vodu u spinčilerima) jednostavno dolazi do spiranja kampilobakterija sa trupova, dok vazdušno hlađenje, tj. hlađenje u struji vazduha redukuje broj kampilobakterija u zavisnosti od temperature i vlažnosti (EFSA, 2005).

Na ohlađenim trupovima živine kontaminacija kampilobakterijama se pojavljuje po celoj površini trupa. Prema Berndtsonu i sar. (1992), kampilobakterije su najčešće izolovane sa sledećih regija trupa: abdominalna šupljina (93% uzoraka), koža vrata (89% uzoraka) i ispod kože (75% uzoraka). Tokom procesa skladištenja na +4 °C ili zamrzavanja na -18 °C broj kampilobakterija opada.

U 2011. godine ukupna prevalencija *Campylobacter* spp. pozitivnih uzoraka pilećeg mesa u 13 zemalja EU je iznosila 31,3%. Prevalencija je varirala između zemalja i to od 3,2%, koliko je prijavljeno u Austriji, do 84,6%, koliko je prijavljeno u Luksemburgu. Četiri zemlje EU (Irska, Luksemburg, Poljska i Španija) su prijavile veoma visok (>50%) i ekstremno visok (>70%) procenat pozitivnih uzoraka. (EFSA, 2013a).

Tabela 2.2. – *Campylobacter* u svežem mesu brojlera u EU tokom 2011. godine (EFSA, 2013a)

Zemlja	Broj ispitanih uzoraka	% pozitivnih uzoraka	Prevalencija (%)
Na liniji klanja			
Belgija	335	130	38,8
Danska	898	95	10,6
Estonija	47	3	6,4
Nemačka	337	138	40,9
Mađarska	31	9	29,0
Irska	68	49	72,1

Zemlja	Broj ispitanih uzoraka	% pozitivnih uzoraka	Prevalencija (%)
Poljska	405	226	55,8
Španija	138	76	55,1
U preradi			
Belgija	711	99	13,9
Mađarska	193	90	46,6
Luksemburg	26	22	84,6
Holandija	180	62	34,4
Portugalija	81	17	21,0
Španija	69	26	37,7
U maloprodaji			
Belgija	403	69	17,1
Danska	829	279	33,7
	428	129	30,1
Nemačka	1096	343	31,3
	402	127	31,6
Mađarska	206	85	41,3
Irska	291	154	52,9
Luksemburg	49	23	46,9
Holandija	500	114	22,8
Poljska	110	91	82,7
Rumunija	485	111	22,9
Španija	260	197	75,8
Nepoznat nivo uzorkovanja			
Austrija	279	9	3,2
UKUPNO (13 EU zemalja)	8.857	2.773	31,3

Slična situacija je primećena i u prethodnim godina. Tako je prevalencija u 2008. godini iznosila 30,1%, u 2009. godini 31,0%, a u 2010. godini 29,6%. U okviru izolata *Campylobacter* spp. izolovanih u 2010. godini, izolovanih iz pilećeg mesa 34,2% je identifikovano kao *C. jejuni*, 27,3% kao *C. coli*, 0,2% kao *C. lari*, dok je 38,7% identifikovano samo kao *Campylobacter* spp. U 5 zemalja EU, Austriji, Mađarskoj, Irskoj, Poljskoj i Rumuniji, *C. coli* je prijavljen kao dominantna vrsta izolovana iz pilećeg mesa (45,9% - 59,3% izolata). *C. jejuni* je kao dominantna vrsta prijavljen u tri države EU, i to u Nemačkoj, Luksemburgu i Sloveniji (60,0% - 62,0% izolata) (EFSA, 2012a).

2.5 Epidemiološki značaj *Campylobacter* vrsta

Od 1972. godine je poznato da *Campylobacter* spp. kod ljudi izaziva dijareju. Vrste koje su od značaja za razvoj gastrointestinalnih smetnji kod ljudi su termotolerantni sojevi i to: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* i *C. upsaliensis* (Pearson i Healing, 1992). U preko 90% slučajeva (93,4%) izazivač kampilobakterioze ljudi je *C. jejuni*, dok je *C. coli* izolovan u oko 2,3% slučajeva (EFSA, 2012a).

Dugi niz godina kampilobakterioza predstavlja najčešće prijavljivanu zoonozu, tj. *Campylobacter* spp. predstavlja najčešće utvrđen patogen kod alimentarnih epidemija ljudi. U 2011. godini incidencija oboljevanja u EU je bila na nivou od 50,28/100.000 populacije, odnosno 220.209 registrovanih/prijavljenih slučajeva oboljenja, što predstavlja povećanje broja obolelih od 2,2%, u odnosu na 2010. godinu (EFSA, 2013a).

U Sjedinjenim Američkim Državama, u periodu od 2004. do 2012. godine, zabeleženo je ukupno 303.520 slučajeva kampilobakterioze, tj. u proseku 33.724 slučaj na godišnjem nivou. Incidencija je u tom periodu u proseku iznosila 11,4/100.000 ljudi, odnosno od 10,2/100.000 stanovnika 2006. godine do 13,0/100.000 2012. godine. Najčešće oboleli su deca starosti do četiri godine, gde je uzrasno specifična stopa incidencije, za ovaj period, iznosila u proseku 26,30/100.000 ljudi. Zabeležene su i sezonske varijacije broja obolelih, pa je tako najveći broj obolelih u periodu od juna do avgusta (incidencija 16,8/100.000), a najmanji u periodu decembar-februar sa incidencijom od 8,0/100.000 stanovnika (Geissler i sar., 2017).

Prema podacima Evropske agencije za bezbednost hrane u zemljama Evropske unije broj obolelih od kampilobakterioze bio je 2014. godine 236.818, 2015. godine 232.226, 2016. godine 246.980, 2017. godine 246.194, a 2018. godine 246.571. Stopa incidencije 2018. godine bila je 64,1/100.000 ljudi, što je veoma slično incidenciji u 2017. godini (64,9/100.000). Najviše stope incidencije u 2018. godini registrovane su u Češkoj Republici (215,8/100.000), Slovačkoj (153,2), Luksemburgu (103,8) i Velikoj Britaniji (98,4), dok su najniže registrovane u Bugarskoj, Kipru, Grčkoj, Letoniji, Poljskoj, Portugaliji i Rumuniji ($\leq 5,9/100.000$ ljudi) (tabela 2.3) (EFSA, 2019).

Tabela 2.3. – Kampilobakterioza ljudi po zemljama EU, za period 2014-2018. godina (EFSA, 2019)

Zemlja	2018		2017		2016		2015		2014	
	PS*	I*	PS*	I*	PS*	I*	PS*	I*	PS*	I*
Austrija	7.999	90,7	7.204	82,1	7.083	81,4	6.258	72,9	6.514	76,6
Belgija	8.086	70,9	8.649	76,2	10.055	88,9	9.066	80,7	8.098	-
Bugarska	191	2,7	195	2,7	202	2,8	227	3,2	144	2,0
Hrvatska	1.965	47,9	1.686	40,6	1.524	36,4	1.393	33,0	1.647	38,8

Zemlja	2018		2017		2016		2015		2014	
	PS*	I*	PS*	I*	PS*	I*	PS*	I*	PS*	I*
Kipar	26	3,0	20	2,3	21	2,5	29	3,4	40	4,7
Češka Republika	22.895	215,8	24.326	230,0	24.084	228,2	20.960	198,9	20.750	197,4
Danska	4.559	78,9	4.255	74,0	4.712	82,6	4.327	76,5	3.773	67,0
Estonija	411	31,2	285	21,7	298	22,6	318	24,2	285	21,7
Finska	5.099	92,5	4.289	77,9	4.637	84,5	4.588	83,8	4.889	89,7
Francuska	7.491	56,0	6.579	49,2	6.698	50,3	6.074	45,7	5.958	45,2
Nemačka	67.585	81,6	69.251	83,9	73.736	89,7	69.921	86,1	70.571	87,4
Grčka	357	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Mađarska	7.117	72,8	7.807	79,7	8.556	87,0	8.342	84,6	8.444	85,5
Irska	3.044	63,0	2.779	58,1	2.511	53,1	2.453	52,4	2.593	56,3
Italija	1.356	-	1.060	-	1.057	-	1.014	-	1.252	-
Letonija	87	4,5	59	3,0	90	4,6	74	3,7	37	1,8
Litvanija	919	32,7	990	34,8	1.225	42,4	1.186	40,6	1.184	40,2
Luksemburg	625	103,8	613	103,8	518	89,9	254	45,1	873	158,8
Malta	333	70,0	231	50,2	212	47,1	248	56,4	288	67,7
Holandija	3.091	34,6	2.890	32,5	3.383	38,3	3.778	43,0	4.159	47,5
Poljska	719	1,9	874	2,3	773	2,0	653	1,7	650	1,7
Portugalija	610	5,9	596	5,8	359	3,5	271	2,6	-	-
Rumunija	573	2,9	467	2,4	517	2,6	311	1,6	256	1,3
Slovačka	8.339	153,2	6.946	127,8	7.623	140,5	6.949	128,2	6.744	124,5
Slovenija	1.305	63,1	1.408	68,2	1.642	79,5	1.328	64,4	1.184	57,4
Španija	18.411	57,6	18.860	-	15.542	-	13.227	-	11.481	-
Švedska	8.132	80,4	10.608	106,1	11.021	111,9	9.180	94,2	8.288	85,9
Velika Britanija	65.246	98,4	63.267	96,1	58.901	90,1	59.797	92,2	66.716	103,7
EU (ukupno)	246.571	64,1	246.194	64,9	246.980	66,4	232.226	63,0	236.818	66,3
Island	145	41,6	119	35,2	128	38,5	119	36,2	142	43,6
Norveška	3668	69,3	3.883	73,8	2.317	44,5	2.318	44,9	3.386	66,3
Švajcarska	7.675	90,1	7.219	85,4	7.980	94,4	7.070	84,5	7.571	91,5

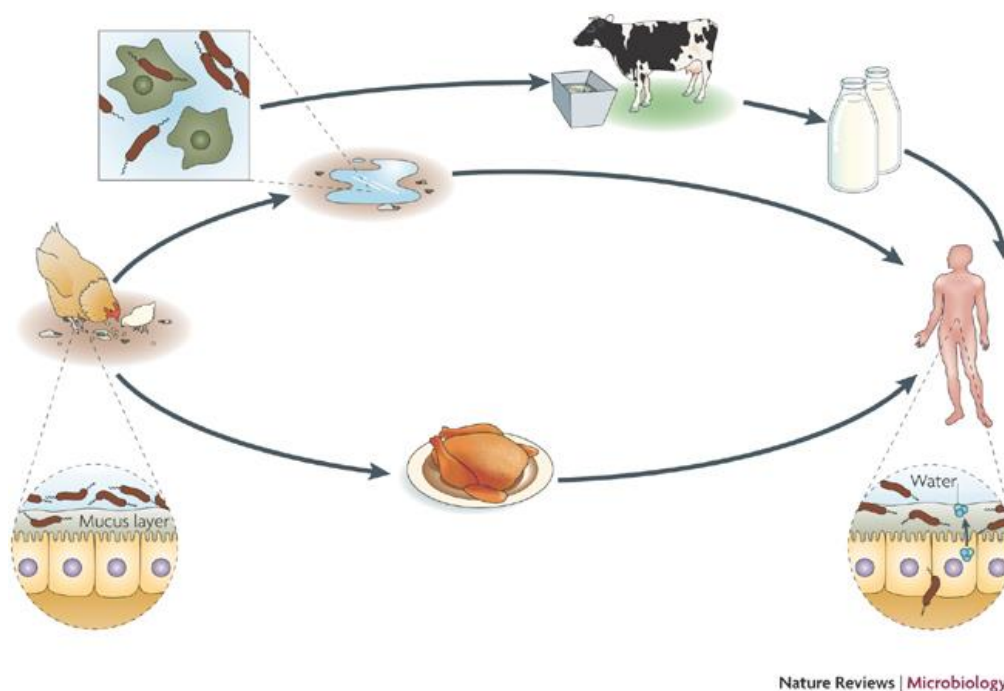
*napomena: PS – potvrđeni slučajevi; I – incidencija na 100.000 ljudi

Međutim, pošto se u većini slučajeva kampilobakterioza ne prijavljuje, procenjuje se da je pravi broj obolelih oko devet miliona svake godine u zemljama EU. Troškovi kampilobakterioze ljudi, za sistem javnog zdravlja u EU, procenjuju se da iznose oko 2,4 milijarde evra svake godine.

U Srbiji je prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, odnosno njihovog Centra za prevenciju i kontrolu bolesti, broj obolelih od kampilobakterioze bio 2014. godine 451 (Anon, 2015d), 2015. godine 482 (Anon, 2016), 2016. godine 581 (Anon, 2017), 2017. godine 591 (Anon, 2018) i 2018. godine 567 (Anon, 2019). To govori o povećanju

incidencije od 6,29/100.000 ljudi 2014. godine do 8,37/100.000 2017. godine, odnosno 8,10/100.000 stanovnika 2018. godine. U toku 2018. godine kampilobakterioza je dijagnostikovana u 20 od 25 okruga, a najveći broj prijavljenih slučajeva oboljenja bio je u Beogradu i Južnobačkom okrugu, dok je najveća stopa incidencije bila u Severnobanatskom okrugu. Najčešće oboleli su deca do četiri godine starosti (uzrasno specifična stopa incidencije 75/100.000 stanovnika), a zatim deca od 5 do 9 godina (25/100.000). Zabeležene su i sezonske varijacije broja obolelih, pa je tako najveći broj obolelih od aprila do septembra, a najmanji u periodu januar-mart (Anon, 2019).

Primarni prirodni domaćin termofilnih kampilobakterija je gastrointestinalni trakt domaćih i divljih ptica i sisara, odakle putem fekalnog izlučivanja iz klinički zdravih jedinki dospevaju u lanac hrane i kontaminiraju hranu i to meso, nepasterizovano mleko i proizvode od mleka i ponekad ribu i proizvode od ribe.



Slika 2.2. – Izvori i putevi infekcije *Campylobacter* spp. (Young i sar., 2007)

Glavni izvor infekcije za ljude je konzumiranje kontaminiranog živinskog mesa/proizvoda od živinskog mesa (*C. jejuni*) i hrana spremna za konzumiranje bez predhodne termičke obrade, uglavnom zbog kontaminacije posle proizvodnje; kao i ruke i radne površine u toku pripremanja hrane zbog nepoštovanja principa dobre higijenske i dobre proizvođačke prakse (Moore i sar., 2005).

Infektivna doza za čoveka može da bude manja od 500 CFU/g, dok je za decu još manja i smatra se da 100 CFU/g može izazvati bolest. Ipak, infektivna doza je vrlo varijabilana i u velikoj meri zavisi od opšteg zdravstvenog stanja osobe (EFSA, 2005).

Inkubacioni period iznosi 2 do 5 dana, ali može biti i 1 do 10 dana. Infekcija obično prolazi sa blagim do umerenim simptomima koji uključuju dijareju, koja često može imati primese krvi, abdominalni bol, groznicu, glavobolju, mučninu i/ili povraćanje (WHO - World Health Organisation, 2018). Simptomi obično prolaze spontano posle 1 do 7 dana, međutim u 20% slučajeva traju duže od jedne sedmice. Zbog odsustva specifičnih simptoma kampilobakteriozu je teško razlikovati od drugih akutnih gastrointestinalnih poremećaja, kao što su salmoneloza ili šigeloza. Zato je za definitivnu dijagnozu neophodno uraditi izolaciju *Campylobacter* spp. iz kliničkih uzoraka.

Teži oblik bolesti, kao sistemska infekcija, javlja se u manje od 1% slučajeva i to najčešće kod starijih, veoma mladih i imunokompromitovanih osoba. U ovim slučajevima pored enteritisa kampilobakterije izazivaju meningitis, endokarditis i septični abortus. Kod imunosupresivnih osoba, kao što su osobe obolele od HIV-a i novorođenčad, može nastati bakterijemija. Bakterijemija izazvana sa *Campylobacter* spp. ima visok mortalitet, >30%.

Smrtni ishod je vrlo redak i obično se javlja kod rizičnih kategorija (starijih, veoma mladih i imunokompromitovanih osoba). Prema US FDA (US Food and Drug Administration) studiji iz 2001. godine, u Sjedinjenim Američkim Državama je 99 smrtnih slučajeva godišnje povezano za kampilobakteriozom koja je prenetna hranom, i taj broj predstavlja 5,5% od ukupnih smrtnih slučajeva izazvanih trovanjem hranom na godišnjem nivou (US FDA, 2001). U Engleskoj i Velsu je 1992. godine bilo 59, a 2000. godine 86 smrtnih slučajeva (Adak i sar., 2002).

Hronična kampilobakterioza se javlja u vidu artritisa, hepatitisa, pankreatitisa, nefritisa i Guillain-Barré sindroma (GBS). GBS je autoimuni poremećaj perifernog nervnog sistema koji se karakteriše akutnom paralizom. Može nastati kao posledica reakcije organizma obolelog na gangliozid slične epitope na *C. jejuni*. Naime lipo-oligosaharidni kompleks GBS-povezanih sojeva *Campylobacter jejuni* ima kraj od sijalinske kiseline koji imitira ugljenohidratni deo gangliozida GM1a i GD1a kod ljudi (Nachamkin i sar., 2000; Gilbert i sar., 2004). Guillain-Barré paraliza može trajati nekoliko nedelja, ostati permanentna ili se završiti smrću, ali u svakom slučaju zahteva intenzivnu negu. Procenjuje se da 1 na svakih 1000 prijavljenih slučajeva kampilobakterioze dovodi do Guillain-Barré sindroma (EFSA, 2005).

U lečenju kampilobakterioze najvažnije je nadomestiti izgublenu tečnost usled dijareje i povraćanja. Antibiotička terapija obično nije potrebna pri blagim simptomima enteritisa, ali se mora primeniti u slučajevima kampilobakterijemije, imunosupresivnih pacijenata, trudnica i pacijenata sa dugotrajnim enteritisom koji prati krvava dijareja. Antimikrobni lekovi koji se preporučuju za lečenje kampilobakterioze su: eritomicin, tetraciklini i fluorohinoloni.

2.6 Antimikrobna rezistencija

Antimikrobna rezistencija se definiše kao nemogućnost ili smanjena mogućnost antimikrobnog leka da inhibira rast bakterijskih ćelija (EFSA, 2020). Antibiotici koji se koriste u veterinarskoj medicini često su isti ili pripadaju istim grupama kao i antimikrobni lekovi koji se koriste u humanoj medicini. Antimikrobna rezistencija se obično razvija i povećava kao posledica upotrebe istih antimikrobnih lekova kod ljudi i životinja (EFSA, 2012b). Upotreba antibiotika kod životinja namenjenih za proizvodnju hrane može da dovede do razvijanja rezistencije kod bakterija u organizmu tretiranih životinja. Ta otpornost bakterija na antimikrobne lekove koja se javlja kod životinja namenjenih za proizvodnju hrane može se preneti na ljude i to preko lanca hrane, vode i životne sredine, kao i direktnim kontaktom sa tim životinjama (EFSA, 2020).

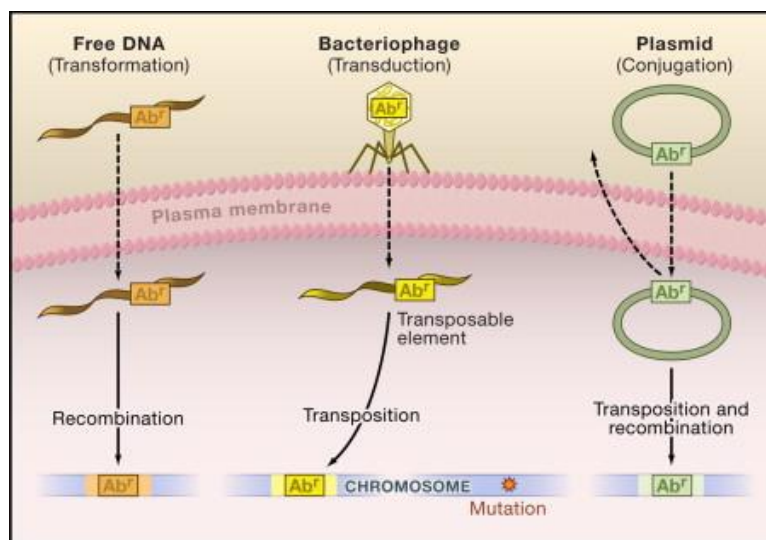
Upotreba antimikrobnih lekova kod životinja, namenjenih za proizvodnju hrane, može da ima za posledicu pojavu rezistencije bakterija u organizmu lečenih životinja, i moguć transfer rezistentnih bakterija putem hrane na ljude. Upotreba antibiotika, kao promotera rasta, u intenzivnoj živinarskoj proizvodnji doprinosila je razvoju rezistencije kod nekih antibiotika. Zato je uredbom Evropske unije No 1831/2003 zabranjena upotreba svih antimikrobnih lekova kao aditiva za hranu za životinje od januara 2006. godine (Anon, 2003).

Rezistencija bakterija prema antimikrobnim lekovima može biti prirodna ili stečena. Prirodna (urođena) rezistencija je ona gde određeni mikroorganizmi prirodno ne poseduju stukturalna (ciljna) mesta za vezivanje antimikrobnih lekova i samim tim lekovi ne mogu da deluju na njih. Stečena rezistencija je ona pri kojoj mikroorganizmi koji su inače osetljivi na određene antimikrobne lekove, preko različitih mehanizama postaju rezistentni (Byarugaba, 2010).

Opisano je više mehanizama na osnovu kojih mikroorganizmi stiču rezistenciju prema antimikrobnim lekovima. Najvažniji mehanizmi su: produkcija enzima koji razaraju antimikrobne lekove, prisustvo alternativnog enzima umesto enzima koga inhibira antimikrobni lek, promena u strukturi mesta za koje se vezuje antimikrobni lek, posttranskripcione i posttranslacione modifikacije u strukturi mesta za koje se vezuje antimikrobni lek, promena propustljivosti membrane prema antimikrobnom leku, alternativni efluks antimikrobnog leka (Byarugaba, 2010).

Bakterije mogu rezistenciju prema antimikrobnim lekovima da steknu mutacijom (vertikalnim prenosom gena rezistencije) ili unošenjem egzogenih gena iz drugih bakterijskih sojeva, putem horizontalnog prenosa gena rezistencije (EFSA, 2008).

Postoji nekoliko mehanizama za horizontalni prenos gena rezistencije. To su: konjugacija, transdukcija i transformacija. Konjugacija predstavlja mehanizam u kome se genetski materijal jedne bakterijske ćelije prenosi u drugu bakterijsku ćeliju preko proteinskog tunela koji privremeno povezuje te dve bakterijske ćelije. Ovakav vid transfera genetskog materijala je moguć između bakterija iste vrste, ali i između bakterija različitih vrsta, pa čak i različitih rodova. Materijal se prenosi preko plazmida ili transpozona. Ovo je najčešći način prenošenja gena rezistencije. Transdukcija je mehanizam prenosa gena rezistencije u kome bakteriofagi prenose gene iz jedne bakterijske ćelije u drugu. Bakteriofagi preuzimaju DNK bakterijske ćelije i posle lize te bakterijske ćelije i oslobađanja bakteriofaga, on unosi taj novi genetski materijal u drugu bakterijsku ćeliju. Dok je za procese konjugacije i transdukcije neophodna vijabilna ćelija davaoca, to nije slučaj kod transformacije. Uspešna transformacija i ekspresija antimikrobne rezistencije u bakterijskim ćelijama zasniva se na sledećim principima: oslobađanje DNK davaoca, unošenje te DNK od strane bakterija u blizini, inkorporacija te DNK u ćeliji primaoca i ekspresija te ugrađene DNK (EFSA, 2008), (slika 2.3).



Slika 2.3. – Mehanizmi horizontalnog prenosa gena rezistencije (Aleksun i Levy, 2007)

Kada je potrebno primeniti terapiju u lečenju kampilobakterioze ljudi lekovi izbora su makrolidni antibiotici (eritromicin), tetraciklini i fluorohinoloni (WHO, 2018).

Tetraciklini ostvaruju svoje bakteriostatsko dejstvo inhibiranjem sinteze proteina u bakterijskim ćelijama tako što se vezuju za receptore na bakterijskim ribozomima. Rezistenciju

prema tetraciklinima bakterije ostvaruju uglavnom preko tri mehanizma i to efluksom antimikrobnog leka, zaštitom receptora na ribozomima i modifikacijom antimikrobnog leka. Efluks se obavlja preko izvoznih proteina, kodiranih *tet* efluks genima, koji izbacuju tetracikline iz bakterijskih ćelija. Na ovaj način se smanjuje intracelularna koncentracija tetraciklina u bakterijskoj ćeliji i tako se štite ribozomi unutar ćelije. Efluks proteini za tetracikline su, po strukturi, slični sa efluks proteinima koji su povezani sa rezistencijom prema hloramfenikolu i kvinolonima. Efluks geni prenose se preko velikih plazmida i to konjugacijom (Byarugaba, 2010). Zaštita receptora na ribozomima nastaje preko proteina koji sprečavaju vezivanje tetraciklina za receptore na ribozomima. Ovi proteini su citoplazmatski proteini koji se vezuju za receptore na ribozomima i izazivaju promenu u ribozomalnoj konformaciji, koja na taj način sprečava vezivanje tetraciklina za ribozome, bez promene ili zaustavljanja sinteze proteina. Međutim, modifikacija antimikrobnog leka nastaje enzimskom promenom lekova (Byarugaba, 2010).

Nalidiksinska kiselina i ciprofloksacin pripadaju grupi kvinolonskih sintetičkih antimikrobnih lekova, pri čemu je nalidiksinska kiselina otkrivena 1962. godine i pripada prvoj generaciji ovih lekova, dok ciprofloksacin pripada trećoj generaciji fluoriranih kvinolona. Ovi antimikrobni lekovi svoj antibakterijski efekat ostvaruju inhibicijom određenih bakterijskih topoizomernih enzima, kao što je DNK-giraza i topoizomeraza IV. Ovi bakterijski enzimi menjaju topologiju dvolančane DNK unutar ćelija (Byarugaba, 2010).

Rezistencija prema kvinolonima nastaje preko dva mehanizma i to modifikacijom ciljnog enzima ili modifikacijom koja smanjuje koncentraciju leka u ćeliji. Ciljni enzimi se najčešće menjaju u blizini aktivnog mesta. Modifikacije bakterijske ćelije koje smanjuju koncentraciju antimikrobnog leka u ćeliji se dešavaju premo promene u ćelijskom zidu Gram negativnih bakterija, što posledično dovodi do smanjenja unosa kvinolona u bakterijsku ćeliju i povećanja antimikrobne rezistencije prema ovim lekovima (Byarugaba, 2010).

Gentamicin pripada grupi aminoglikozidnih antimikrobnih lekova koji svoju baktericidnu aktivnost ostvaruju tako što prodiru u ćeliju i ireverzibilno se vezuju za receptor na 30S subjednici bakterijskog ribozoma pri čemu nastaje inhibicija sinteze proteina. Rezistencija mikroorganizama prema ovim antimikrobnim lekovima je česta i nastaje različitim mehanizmima. Jedan od mehanizama je da aminoglikozidni molekul podleže acetilaciji, fosforilaciji ili adenilaciji. Pošto je ovaj proces pod uticajem plazmida, ovaj tip rezistencije može da se prenosi sa jedne na drugu bakteriju. Drugi mehanizam nastajanja rezistencije je smanjena permeabilnost bakterijske ćelije čime se onemogućava prodiranje leka (Jezdimirović, 2000).

Eritromicin pripada grupi makrolidnih antimikrobnih lekova i deluje tako što inhibiše sintezu proteina delujući na 50S podjedinicu bakterijskog ribozoma. Dokazana je kompletna ukrštena rezistencija prema svim makrolidnim antibioticima (Jezdimirović, 2000).

Prema izveštaju Evropske Unije o antimikrobnoj rezistenciji zoonoznih bakterija izolovanih iz ljudi, životinja i hrane u 2011. godini (EFSA, 2013b) izolati kampilobakterija izolovanih u slučajevima oboljenja ljudi pokazivali su, na nivou 13 članica EU, visoku rezistenciju prema ampicilinu (35,3%), ciprofloksacinu (44,4%), nalidiksinskoj kiselini (47,8%) i tetraciklinima (30,5%), dok je rezistencija prema eritromicinu bila niska do umerena (3,5%), što je veoma bitno pošto je eritromicin lek izbora pri lečenju kampilobakterioze. Ovi izolati su pokazivali visoku multirezistenciju, tj. rezistenciju prema najmanje tri antibiotika, od 14,8% u Austriji do 55,3% u Španiji. Korezistencija prema ciprofloksacinu i eritromicinu je bila niska, od 0,3% u Austriji do 6,7% u Estoniji. Visoka rezistencija prema ciprofloksacinu, nalidiksinskoj kiselini i tetraciklinima je zapažena u izolatima koji potiču iz živine, mesa brojlera, svinja i goveda, dok je niska rezistencija uočena prema eritromicinu i gentamicinu.

Prema izveštaju Evropske Unije o antimikrobnoj rezistenciji zoonoznih bakterija izolovanih iz ljudi, životinja i hrane u 2016. godini (EFSA, 2018b) izolati *Campylobacter jejuni* izolovani u slučajevima oboljenja ljudi pokazivali su, na nivou od 17 zemalja članica EU, veoma visok procenat rezistencije prema ciprofloksacinu (54,6%), sa ekstremno visokim procentima primećenim u nekoliko zemalja, i to u Portugaliji (94,0%), Estoniji (91,2%), Litvaniji (86,9%), Kiparu (86,8%), Italiji (85,0%) i Španiji (84,5%). Najmanja rezistencija prema ciprofloksacinu primećena je na Islandu (13,3%) i Danskoj (33,3%). Slična zapažanja uočena su i u nivoima rezistencije na tetracikline koji su bili visoki u celini (42,8%), a najveći procenti rezistencije prijavljeni su na Kiparu (86,8%), Portugaliji (82,0%), Španiji (78,5%), Italiji (67,5%), Estoniji (63,8%) i Litvaniji (63,6%), a najnižu rezistenciju su prijavile Danska (16,0%) i Norveška (19,7%). Nivo rezistencije na eritromicin bio je generalno relativno nizak (2,1%), ali je varirao između zemalja. Najveći udio izolata otpornih na eritromicin prijavljen je u Norveškoj (11,6%), Portugaliji (6,6%), Litvaniji (6,1%) i Malti (5,3%). Otpornost na gentamicin bila je generalno vrlo niska (0,4%), ali veća u Italiji (4,1%) i Slovačkoj (2,9%). Geografska raspodela rezistencije humanih *C. jejuni* izolata na ciprofloksacin pokazuje viši nivo rezistencije u zemljama južne i istočne Evrope i Baltičkih zemalja, dok su zemlje severne i centralne Evrope imale niži nivo rezistencije.

Humani izolati *Campylobacter coli* pokazivali su veoma visok procenat rezistencije prema ciprofloksacinu (63,8%) i tetraciklinima (64,8%), sa ekstremno visokim procentima (70,5-100,0%) rezistencije prema ciprofloksacinu u 9 od 16 zemalja članica EU koje su dostavile izveštaje

(Austrija, Estonija, Finska, Italija, Litvanija, Luksemburg, Malta, Portugalija i Španija). Rezistencija prema eritromicinu i gentamicinu bila je značajno viša kod *C. coli* izolata, u odnosu na *C. jejuni* izolate (11,0% prema 2,1% i 1,7% prema 0,4%, pojedinačno). Estonija, Portugalija, Italija, Španija i Finska su prijavile najviše nivoe rezistencije prema eritromicinu (63,2%, 50,0%, 27,3%, 23,7% i 22,8%, pojedinačno). Geografska raspodela rezistencije humanih *C. coli* izolata prema ciprofloksacinu pokazuje da je ona bila veoma česta u većini zemalja članica EU, koje su dostavile izveštaje, osim u Velikoj Britaniji i Portugaliji. U Italiji i Portugaliji svi ispitivani izolati bili su rezistentni na ciprofloksacin. Nivo rezistencije na eritromicin bio je primetno visok u Estoniji i Portugaliji (EFSA, 2018b).

U toku 2018. godine u zemljama EU prosečna rezistencija humanih izolata prema ciprofloksacinu je bila 59,3% (*C. jejuni* izolati) i 65,2% kod *C. coli* izolata. Rezistencija prema tetracilinima, kod humanih izolata *C. jejuni* je iznosila 47,2%, a kod *C. coli* izolata 71,3%. Rezistencija humanih izolata *C. jejuni* izolata prema eritromicinu je bila niska (1,8%), dok je kod *C. coli* izolata bila znatno viša i iznosila 14,3%. Rezistencija prema gentamicinu je bila niska za obe vrste kompilobakterija i iznosila je 0,9% kod *C. jejuni* i 1,4% kod *C. coli* (EFSA, 2020).

Geissler i sar. (2017) navode da kampilobakterije izolovane u slučajevima oboljenja ljudi u SAD-u, u periodu od 2004. do 2012. godine, pokazuju rezistenciju od 23,1% prema ciprofloksacinu i 2,0% prema eritromicinu.

Campylobacter jejuni izolati poreklom sa trupova živine, u 2011. godini, na nivou podataka iz 9 zemalja EU, pokazivali su visoku rezistenciju prema ciprofloksacinu (59,2%), nalidiksinskoj kiselini (56,9%) i tetraciklinima (46,9%), dok je rezistencija prema eritromicinu i gentamicinu bila niska (3,1% i 1,7%), što se može videti i u tabeli 2.4. Multirezistencija je uočena jedino u izolatima iz Nemačke, i to 2,7% (EFSA, 2013b).

Tabela 2.4. – Antimikrobna rezistencija *Campylobacter jejuni* izolata poreklom iz mesa brojlera u 9 zemalja članica EU u 2011. godini (EFSA, 2013b)

Zemlja	Ciprofloksacin		Eritromicin		Gentamicin		Nalidiksinska kiselina		Tetraciklini	
	N	% R	N	% R	N	% R	N	% R	N	% R
Austrija	84	53,6	84	0	84	0	84	50,0	84	23,8
Belgija	259	36,7	259	7,7	259	1,9	259	39,0	259	49,0
Danska	61	11,5	61	0	61	0	61	11,5	61	9,6
Nemačka	188	64,9	188	0,5	188	0	188	58,5	188	46,3
Mađarska	33	84,8	33	0	33	6,1	-	-	33	54,5
Italija	13	76,9	13	0	13	0	13	61,5	13	76,9
Holandija	83	63,9	83	3,6	83	0	83	63,9	83	49,4

Zemlja	Ciprofloksacin		Eritromicin		Gentamicin		Nalidiksinska kiselina		Tetraciklini	
	N	% R	N	% R	N	% R	N	% R	N	% R
Poljska	174	90,2	174	0	174	0	174	89,7	174	56,9
Rumunija	52	84,6	52	9,6	52	17,3	52	82,7	52	69,2
Ukupno (9 EU zemalja)	947	59,2	947	3,1	947	1,7	914	56,9	947	46,9

N – broj testiranih izolata; % R – procenat rezistentnih izolata;

Izolati *C. coli*, takođe poreklom iz mesa brojlera, na osnovu podataka iz 8 zemalja članica EU, takođe su pokazivali visoku rezistenciju prema ciprofloksacinu (77,7%), nalidiksinskoj kiselini (72,2%) i tetraciklinima (71,5%), dok je rezistencija prema eritromicinu iznosila 9,80%, a prema gentamicinu 1,8% (tabela 2.5) (EFSA, 2013b).

Tabela 2.5. – Antimikrobna rezistencija *Campylobacter coli* izolata poreklom iz mesa brojlera u 8 zemalja članica EU u 2011. godini (EFSA, 2013b)

Zemlja	Ciprofloksacin		Eritromicin		Gentamicin		Nalidiksinska kiselina		Tetraciklini	
	N	% R	N	% R	N	% R	N	% R	N	% R
Austrija	47	55,3	47	2,1	47	0	47	55,3	47	53,2
Belgija	81	63,0	81	11,1	81	1,2	81	51,9	81	72,8
Nemačka	82	86,6	82	17,1	82	0	82	81,7	82	85,4
Mađarska	61	90,2	61	3,3	61	3,3	-	-	61	63,9
Italija	14	71,4	14	50,0	14	0	14	50,0	14	78,6
Holandija	42	78,6	42	21,4	42	2,4	42	78,6	42	66,7
Poljska	157	82,2	157	0,6	157	0	157	80,9	157	70,7
Rumunija	59	79,7	59	16,9	59	10,2	59	78,0	59	76,3
Ukupno (8 EU zemalja)	543	77,7	543	9,8	543	1,8	482	72,2	543	71,5

N – broj testiranih izolata; % R – procenat rezistentnih izolata;

Slični podaci se uočavaju i u izveštajima o antimikrobnoj rezistenciji zoonoznih bakterija izolovanih iz ljudi, životinja i hrane u 2015. i 2016. godini, što se može videti u tabeli 2.6.

Tabela 2.6. – Antimikrobna rezistencija (%) *C. jejuni* i *C. coli* izolata poreklom iz mesa brojlera u 2015. i 2016. godini (EFSA, 2018b)

Izolati	Godina	Ciprofloksacin	Eritromicin	Gentamicin	Nalidiksinska kiselina	Tetraciklini
<i>C. jejuni</i> iz mesa brojlera	2015	68,2	2,6	-	67,5	41,1
	2016	64,9	2,2	0,7	63,3	48,6
<i>C. coli</i> iz mesa brojlera	2015	89,6	13,4	1,5	91,0	79,1
	2016	81,1	13,1	-	75,4	73,0

Naime *Campylobacter jejuni* izolati poreklom sa trupova živine, u toku 2015. i 2016. godine, pokazivali su veoma nisku rezistenciju prema gentamicinu (2015. godina nije utvrđena rezistencija, 2016. godina 0,7%) i eritromicinu (2015. godina 2,6%, 2016. godina 2,2%). Rezistencija prema tetraciklinima je bila visoka i to 41,1% u 2015. godini i 48,6% u 2016. godini. Takođe, rezistencija prema ciprofloksacinu i nalidiksinskoj kiselini je uobičajeno bila visoka i to prema ciprofloksacinu u 2015. godini 68,2%, i u 2016. godini 64,9%, dok je prema rezistencija prema nalidiksinskoj kiselini u 2015. godini iznosila 67,5%, a u 2016. godini 63,3%. Rezistencija kod *Campylobacter coli* izolata prema gentamicinu 2016. godine nije detektovana, a 2015. godine je bila veoma niska i iznosila je 1,5%. Rezistencija prema eritromicinu je bila umerena i iznosila je 13,4% u 2015. godini i 13,1% u 2016. godini. Izolati *C. coli* su bili veoma često rezistentni prema tetraciklinima (79,1% u 2015. godini i 73% u 2016. godini), ciprofloksacinu (89,6% u 2015. godini i 81,1% u 2016. godini) i nalidiksinskoj kiselini (91% u 2015. godini i 75,4% u 2016. godini) (EFSA, 2018b).

U SAD-u je u 2011. godini kod *Campylobacter jejuni* izolata poreklom iz mesa brojlera, uočena visoka rezistencija prema tetraciklinima (48,3%), ciprofloksacinu (22,4%) i nalidiksinskoj kiselini (20,9%), dok je rezistencija prema eritromicinu bila niska (0,5%), a prema gentamicinu nije ni postojala. *Campylobacter coli* izolati takođe iz mesa brojlera pokazivali su visoku rezistenciju prema tetraciklinima (49,0%), ciprofloksacinu (18,1%) i nalidiksinskoj kiselini (17,1%). Takođe je uočena visoka rezistencija prema gentamicinu (18,1%), dok je prema eritromicinu bila niska i iznosila je 4,8% (FDA NARMS, 2013). *Campylobacter* spp. izolati poreklom od ljudi, takođe su pokazivali visoku rezistenciju prema tetraciklinima (45,1%), ciprofloksacinu (24,2%) i nalidiksinskoj kiselini (24,8%), dok je rezistencija prema eritromicinu i gentamicinu bila niska (1,8% i 2,0%) (CDC NARMS, 2013). U tabeli 2.7. je prikazana rezistencija za period od 2002. do 2011. godine.

Tabela 2.7. – Antimikrobna rezistencija izolata poreklom iz mesa brojlera u SAD-u za period 2002. – 2011. godina

Izolati	Godina (N)	Ciprofloksacin	Eritromicin	Gentamicin	Nalidiksinska kiselina	Tetraciklini
<i>C. jejuni</i> iz mesa brojlera	2002 (198)	15,2%	-	-	-	38,4%
	2003 (325)	14,5%	-	0,3%	-	40,6%
	2004 (510)	15,1%	0,8%	-	15,1%	50,2%
	2005 (403)	15,1%	0,5%	-	14,9%	46,4%
	2006 (426)	16,7%	0,9%	-	16,7%	47,2%

Izolati	Godina (N)	Ciprofloksacin	Eritromicin	Gentamicin	Nalidiksinska kiselina	Tetraciklini
	2007 (332)	17,2%	0,6%	-	17,2%	48,5%
	2008 (329)	14,6%	1,2%	-	14,6%	49,8%
	2009 (404)	21,3%	1,0%	-	21,3%	45,8%
	2010 (355)	22,5%	0,6%	-	22,8%	36,3%
	2011 (393)	22,4%	0,5%	-	20,9%	48,3%
<i>C. coli</i> iz mesa brojlera	2002 (90)	10,0%	7,8%	-	-	44,4%
	2003 (142)	13,4%	7,0%	-	-	50,7%
	2004 (196)	16,3%	9,2%	-	16,3%	46,4%
	2005 (151)	29,1%	9,9%	-	29,1%	42,4%
	2006 (145)	22,1%	5,5%	-	20,7%	46,9%
	2007 (143)	25,9%	6,3%	0,7%	25,9%	39,9%
	2008 (181)	20,4%	9,9%	1,7%	20,4%	46,4%
	2009 (176)	18,2%	4,5%	5,7%	18,2%	38,1%
	2010 (148)	13,5%	4,1%	12,8%	13,5%	39,2%
	2011 (210)	18,1%	4,8%	18,1%	17,1%	49,0%

N – broj testiranih izolata

2.7 Metode izolacije i detekcije

2.7.1 Kulturalne metode izolacije i identifikacije

Pri laboratorijskoj dijagnostici uglavnom je potrebno da se kampilobakterije otkriju u fecesu pacijenata sa prolivom, kao i kod uzoraka fecesa životinja, uzoraka životinjskog materijala ili uzoraka hrane.

Uobičajena metoda izolacije crevnih kampilobakterija iz uzoraka fecesa je primarno zasejavanje na selektivne podloge, nakon čega sledi inkubacija na 42°C u mikroaerofilnim uslovima (Vandenberg i sar., 2006). Međutim kod uzoraka hrane i uzoraka iz životne sredine, pošto sadrže manji broj kampilobakterija, potrebno je prvo uraditi obogaćenje u tečnim bujonima, pre zasejavanja na čvrste podloge (Corry i sar., 1995). Postoji nekoliko bujona za obogaćenje koji se koriste (Bolton bujon, *Campylobacter* bujon za obogaćenje, Preston bujon). Prvu selektivnu podlogu za izolaciju *C. jejuni* i *C. coli* razvio je Skirrow 1977. godine. Od tada je razvijeno preko 40 čvrstih i tečnih selektivnih podloga za izolaciju kampilobakterija iz kliničkih uzoraka i uzoraka

hrane (Habib i sar., 2008; Kiess i sar., 2010; Potturi-Venkata i sar., 2007). Sve selektivne podloge sadrže osnovni medijum, bilo krv ili druge sastojke, kao npr. ugalj, koji umanjuje toksičnost kiseonika na kamilobakterije (Fitzgerald i sar., 2008) i različite kombinacije antibiotika na koje su termofilne vrste kamilobakterija rezistentne. Ti antibiotici (polimiksin, vankomicin, trimetoprim, rifampicin, cefperazon, cefalotin, kolistin, cikloheksamid i nistatin) suzbijaju rast mnogobrojne pozadinske mikrobne flore prisutne u uzorcima i tako omogućavaju izolaciju sporo rastućih kamilobakterija (Vandenberg i sar., 2005; Zhang i Sahin, 2020).

U najnovijoj standardnoj metodi (SRPS ISO, 2017a) za detekciju i izolaciju, kao i metodi za enumeraciju *Campylobacter* spp. (SRPS ISO, 2017b) koristi se mCCDA agar (modifikovani ugljeni cefperazon deoksiholat agar), kao selektivna podloga, dok se Bolton bujon koristi za obogaćenje.

2.7.2 Fenotipizacija

Kampilobakterije su biohemijski neaktivne u poređenju sa mnogim drugim bakterijama, i zato postoji samo nekoliko fenotipskih testova koji omogućavaju identifikaciju kamilobakterija do nivoa vrste. Biohemijska diferencijacija kampilobakter vrsta uključuje izvođenje nekoliko biohemijskih testova, kao što su test katalaze, test osetljivosti na nalidiksinsku kiselinu i cefalotin, test hidrolize hipurata i indoksil-acetata, test produkcije indola i H₂S. Generalno, *C. jejuni* se može razlikovati od drugih vrsta na osnovu reakcije hidrolize hipurata, jer je to jedina vrsta kampilobakterija koja ima gen N-benzoilglicin amidohidrolazu, tj. hipuraza gen, i zato pri reakciji hidrolize hipurata daje pozitivan rezultat. Međutim, primećena je varijabilnost na reakciju hidrolize hipurata kod nekih sojeva *C. jejuni*, što je rezultiralo negativnim rezultatima hidrolize hipurata (Denis i sar., 1999; Jensen i sar., 2005; Rautelin i sar., 1999). Ispitivanja osetljivosti na nalidiksinsku kiselinu i cefalotin korišćena su u prošlosti (Barrett i sar., 1988). I *C. jejuni* i *C. coli* rastu na 42 °C i rezistentni su na cefalotin i cefperazon, koji su zbog toga obavezan deo selektivnih podloga (Vandenberg i sar., 2006). Nasuprot tome, *C. upsaliensis* je senzitivna na cefalotin (SRPS ISO, 2017a). Osetljivost na nalidiksinsku kiselinu danas može da stvori poteškoće u interpretaciji rezultata, budući da su kampilobakter vrste, sve češće, rezistentne na fluorohinolone i pokazuju unakrsnu rezistenciju prema nalidiksinskoj kiselini (Engberg i sar., 2001). Prema tome, za fenotipsku identifikaciju izolata kampilobakterija ne mogu se više koristiti testovi osetljivosti na antimikrobne lekove (Fitzgerald i sar., 2008). Za identifikaciju vrsta može se primeniti više biohemijskih testova, poput detekcije katalaze koja nije prisutna kod *C. upsaliensis*, i detekcije hidrolize indoksil acetat, koja je negativna kod *C. lari* (SRPS ISO, 2017a).

2.7.3 Genotipizacija

Lančana reakcija polimeraze (PCR) je razvijena 1983. godine i od tada je postala standardna molekularna dijagnostička i istraživačka metoda. PCR je jednostavna, osetljiva, specifična i reproduktibilna tehnika. Svaki PCR ciklus sastoji se od tri faze (denaturacije, elongacije i terminacije), pri čemu se u toku jedne PCR reakcije u proseku odigra oko 40 ovakvih ciklusa. U ovoj analizi koristi se DNK polimeraza, enzim koji umnožava specifične fragmente DNK molekula upotrebom kratkih sekvenci, specifičnih oligonukleotida koji se dodaju reakciji (Powledge, 2004). Ovi oligonukleotidi se nazivaju prajmeri i imaju sekvence komplementarne ciljnim sekvencama u DNK molekulu mikroorganizma. PCR metodom se mogu amplificirati geni specifični za određenu taksonomsku grupu bakterija kao i geni odgovorni za virulentnost patogenih mikroorganizama. Ova tehnika našla je primenu u detekciji i identifikaciji *Campylobacter* spp. u hrani, vodi i izmetu (Datta i sar., 2003). Za brzu identifikaciju bakterijskih sojeva PCR metodom, nije neophodno dobijanje čistih kultura, kao što je slučaj sa konvencionalnim mikrobiološkim metodama. Nedostaci konvencionalne PCR tehnike odnose se na nemogućnost razlikovanja DNK molekula koji potiču od živih i mrtvih ćelija, izostanak kvantitativnih rezultata, kao i na vreme koje je potrebno za pripremu agar-gela (Rodríguez-Lázaro i Hernández, 2006). Nadalje, sve komercijalno dostupne PCR tehnike još uvek zahtevaju korak predobogaćivanja uzorka, jer se tako smanjuje rizik od dobijanja lažno pozitivnih rezultata usled detekcija mrtvih mikroorganizama (Fung, 2002).

Real-time PCR (RTi-PCR) je tehnika koja se bazira na konvencionalnoj PCR reakciji koja prati sintezu novih molekula tokom PCR reakcije u stvarnom vremenu (real time), upotrebom fluorescentne tehnologije. Suštinska prednost RTi-PCR je u tome što precizno razlikuje i kvantifikuje specifične sekvence DNK u uzorku iako su one kvantitativno jako male, pa se stoga često označava kao kvantitativna PCR tehnika (qPCR) (Heid i sar., 1996).

Multipleks PCR (m-PCR) je metoda koja se upotrebljava za paralelnu identifikaciju nekoliko gena koji pripadaju istom patogenu ili potiču iz mešavine različitih mikroorganizama (Chamberlain i sar., 1988). Ovom tehnikom može da se amplifikuju dve ili više ciljanih sekvenci istovremenom upotrebom više jedinstvenih setova prajmera i okviru jedne PCR reakcije. Ova metoda je isplativa i pogodna za korišćenje, ali optimizacija ove metode je dugotrajna (Eberle i Kiess, 2012).

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), tj. gel elektroforeza u pulsnom električnom polju je tehnika karakterizacije bakterijskih izolata i njihove diferencijacije u subtipove na osnovu sekvencioniranja njihove DNK nakon digestije upotrebom restrikcionih enzima. Tokom ovog postupka, kompletna bakterijska DNK se izoluje i iseca restrikcionim enzimima do dijagnostičkih

DNK fragmenata. Ovi restrikcioni enzimi isecaju DNK na mestima gde je prisutna kratka, specifična sekvenca i tako daju 8 do 25 traka DNK molekula koji sadrže od 40 do 600 kilobaznih (kb) parova (Weidmann, 2002). Za razdvajanje ovih DNK fragmenta, različitih veličina, primenjuje se posebna tehnika elektroforeze, pri kojoj se menja smer električnog polja. Pri svakoj promeni smera električnog polja, manji DNK fragmenti će početi da se kreću u novom smeru brže nego oni veće molekularne mase. Usled toga, veći DNK fragmenti zaostaju, obezbeđujući pri tom separaciju od manjih DNK fragmenata (Stjepanović i sar., 2007). PFGE subtipizacija pokazuje visok nivo diskriminacije u detekciji bakterijskih patogena hrane i usled toga predstavlja „zlatni standard” u molekularnoj epidemiologiji i istraživanju slučajeva masovnog trovanja hranom. Iako je interpretacija PFGE podataka teška, čineći ovu tehniku neprikladnom kao alat za rutinsku upotrebu tokom ispitivanja epidemije (Sails i sar., 2003), ona se široko koristi u genetskim i epidemiološkim istraživanjima *C. jejuni* i *C. coli* (Natsos i sar., 2019).

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), tj. analiza polimorfnosti dužine umnoženih (amplifikovanih) fragmenata DNK je novije razvijena tehnika genotipizacije koja se zasniva na selektivnoj amplifikaciji restrikcioni fragmenata DNK dobijenih digestijom genomske DNK (Vos i sar., 1995). Ova tehnika ne zahteva informacije o sekvenci izučavanog organizma. Tehnika podrazumeva tri faze: isecanje DNK restrikcioni enzimima i vezivanje specifičnih dvolančanih adaptera, selektivnu amplifikaciju restrikcioni fragmenata i elektroforezu amplifikovanih fragmanata u gelu. Metoda omogućava da se 50-100 restrikcioni fragmentata analizira simultano na gelu. Dakle, samo oni fragmenti koji sadrže specifične nukleotide u toku restrikcije se detektuju i analiziraju. Metoda se može prilagoditi bilo kojoj vrsti bakterija. Međutim, ograničenje predstavljaju enzimi i specifični nukleotidi koji se koriste, jer moraju biti optimizovani za svaku vrstu.

Multi Locus Sequence Typing (MLST) je metoda genotipizacije koja se bazira na dodeljivanju alela svakom genskom lokusu direktno na osnovu sekvenciranja nukleotida (Enright i Spratt, 1999). Sekvenciranje nukleotida otkrivaju se sve varijacije na genskom lokusu. Pri ovom postupku ciljaju se visoko konzervirani delovi genoma (tzv. „house-keeping“ geni), pa se tako mogu registrovati promene koje nastaju na nivou nukleotida. Optimalna dužina sekvenci, za svaki izolat, treba da bude 450-500 kilobaznih parova, zato što ova dužina DNK fragmenata omogućava precizno sekvenciranje i to upotrebom jednog para prajmera, a istovremeno pruža dovoljno informacija za identifikaciju različitih alela u populaciji bakterijskih patogena (Enright i Spratt, 1999). Velika prednost ove metode je dostupnost baze podataka (npr. PubMLST) koju mogu da koriste javnozdravstvene i istraživačke zajednice i gde se podaci o sekvencioniranju mogu

upoređivati. Takođe, istraživači mogu rezultate svojih istraživanja da unesu u te baze podataka (Maiden, 2006). Trenutno je MLST vodeća metoda molekularne tipizacije za kampilobakterije. Dingle i sar. (2001) razvili su specifični MLST sistem za karakterizaciju *Campylobacter jejuni*, koji se sve više koristi u epidemiološkim studijama, dok se proširena MLST metoda, koju su razvili Miller i sar. (2005) koristi ne samo za karakterizaciju *C. jejuni*, već i za *C. coli*, *C. lari* i *C. upsaliensis*. Prednosti upotrebe MLST uključuju visoku diskriminacijsku moć, obnovljivost, jednostavnost interpretacije i prenosivosti informacija u laboratorijama (Dingle i sar., 2001).

3. Cilj i zadaci istraživanja

Na osnovu podataka iz literature pretpostavlja se da u nastajanju kampilobakterioze ljudi značajnu ulogu imaju meso i proizvodi od mesa živine, a da povećana rezistencija na antimikrobne lekove otežava lečenje kampilobakterioze ljudi. Stoga je, u okviru ove doktorske disertacije, za cilj postavljeno da se utvrdi učestalosti nalaza *Campylobacter* spp. na trupovima živine na liniji klanja, da se uporede izolati sa trupova živine sa sojevima kampilobakterija izolovanih u slučajevima oboljenja ljudi, kao i da se ispita osetljivosti izolata kampilobakterija prema antimikrobnim lekovima.

Shodno postavljenim ciljevima rada, zadaci u okviru ove doktorske disertacije su bili sledeći:

1. Utvrditi učestalost nalaza *Campylobacter* spp. na trupovima živine na liniji klanja,
2. Izvršiti identifikaciju izolata *Campylobacter* spp. sa trupova živine,
3. Ispitati filogenetsku srodnost izolata *Campylobacter* spp. sa trupova živine i izolata humanog porekla sekvenciranjem gena *dnaJ*,
4. Utvrditi antimikrobnu osetljivost izolata *Campylobacter* spp. prema antimikrobnim lekovima primenom disk difuzione metode i određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija primenom kvantitativnog disk difuzionog testa (E-test, epsilometar test) uz interpretaciju MIK koncentracija prema EUCAST smernicama.

4. Materijal i metode istraživanja

4.1 Materijal

4.1.1 Trupovi živine

U cilju utvrđivanja učestalosti nalaza *Campylobacter* spp. na trupovima živine i određivanja njihove osetljivosti na antimikrobne lekove, uzorkovano je 115 trupova živine na linijama klanja tri klanice na teritoriji Republike Srbije.

4.1.2 Sojevi mikroorganizama

Izolati: *Campylobacter* spp. izolovani sa trupova živine (89 izolata), referentni sojevi ATCC *C. jejuni*, *C. coli* i *C. lari* i 5 izolata kamilobakterija izolovanih u slučajevima oboljenja ljudi.

4.1.3 Hranljive podloge i reagensi

- **Puferisana peptonska voda**

Sastav:

- enzimski razgrađeni kazein	10,0 g
- dinatrijum hidrogen fosfat dodekahidrat	9,0 g
- natrijum hlorid	5,0 g
- kalijum dihidrogen fosfat	1,5 g
- destilovana voda	1000 ml

Priprema:

Osnovne komponente rastvorene su u vodi. pH vrednost je podešena tako da posle sterilizacije iznosi $7,2 \pm 0,2$. Pripremljena puferisana voda sterilisana je 15 minuta pri 121 °C.

- **Bolton bujon sa suplementom**

a) Sastav za osnovnu podlogu:

- enzimski digest životinjskih tkiva	10,0 g
--------------------------------------	--------

- laktalbumin hidrolizat	5,0 g
- ekstrakt kvasca	5,0 g
- natrijum hlorid	5,0 g
- natrijum piruvat	0,5 g
- natrijum metabisulfit	0,5 g
- natrijum karbonat	0,6 g
- A-ketoglutarna kiselina	1,0 g
- hemin (rastvoren u 0,1% NaOH)	0,01 g
- voda	1000 ml

Priprema:

Dehidrirana gotova osnovna podloga rastvorena je u sterilisanoj destilovanoj vodi. pH podloge je podešen tako da posle sterilizacije iznosi $7,4 \pm 0,2$ pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Osnovna podloga je razlivena u flašice sa uskim grlom odgovarajućeg kapaciteta i sterilisana u autoklavu 15 minuta na $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

b) Sastav za antibiotski rastvor:

- Cefperazon	0,02 g
- Vankomicin	0,02 g
- Trimetoprim laktat	0,02 g
- Amfotericin B	0,01 g
- Etanol/sterilna destilovana voda 50/50	5 ml

Priprema:

Komponente su rastvorene u 50/50 mešavini etanola i sterilne destilovane vode.

c) Kompletna podloga čiji je sastav:

- osnovna podloga	1000 ml
- antibiotski rastvor	5 ml

Priprema

U osnovnu podlogu, na temperaturi od 47-50 °C, dodat je antibiotski rastvor i sve je to promešano. Podloga je razlivena aseptično u flašice sa uskim grlom odgovarajuće zapremine.

- **Modifikovani ugljeni cefperazon deoksiholat agar (mCCD agar)**

a) Sastav za osnovnu podlogu:

- Mesni ekstrakt	10,0 g
- Enzimski digest životinjskih tkiva	10,0 g
- NaCl	5,0 g
- Ugalj	4,0 g
- Kazein hidrolizat	3,0 g
- Na-deoksiholat	1,0 g
- Gvožđe(II)sulfat	0,25 g
- Na-piruvat	0,25 g
- Agar	8,0-18,0 g ^l - u zavisnosti od čvrstine gela
- Voda	1000 ml

Priprema

Dehidrirana gotova osnovna podloga rastvorena je u sterilisanoj destilovanoj vodi i zagrevana do ključanja. pH podloge je podešen tako da posle sterilizacije iznosi $7,4 \pm 0,2$ pri 25 °C. Osnovna podloga je razlivena u flašice sa uskim grlom odgovarajuće zapremine i sterilisana u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

b) Sastav za antibiotski rastvor:

- Cefperazon	0,032 g
- Amfotericin B	0,01 g
- Voda	5 ml

Priprema

Komponente su rastvorene u vodi i sterilisane filtracijom pomoću acetatnog filtera od 0,45µm.

c) Kompletna podloga čiji je sastav:

- osnovna podloga	1000 ml
-------------------	---------

- antibiotski rastvor 5 ml

Priprema

U osnovnu podlogu, na temperaturi od 47-50 °C, dodat je rastvor antibiotika. Oko 15 ml gotove podloge naliveno je u sterilne Petrijeve šolje. Neposredno pre upotrebe ploče sa podlogom su osušene u sušnici u trajanju od 30 minuta (dok sa površine agara nije iščezla vlaga).

- CampyFood ID agar – CFA (proizvođač Biomerieux, France)
- Muller Hinton agar sa 5% ovčije krvi

4.1.4 Reagensi za VIDAS tehniku

Mini VIDAS je kompaktni imunohemijski analizator koji se sastoji od:

- centralne obradne jedinice, koja kontroliše ceo sistem i čini je tastatura sa numeričkim i funkcionalnim tasterima, LCD i termalni printer,
- analitičke jedinice

Svi ovi elementi su integrisani u isti modul.

Primenom ELFA tehnologije (Enzyme Linked Fluorescent Assay) vrši se detekcija antigena *Campylobacter* spp.

4.1.5 Kitovi za VIDAS tehniku

Plastični kitovi (proizvođač Biomerieux, France) se sastoje od plastičnog rama sa deset bunarčića koji su sa unutrašnje strane obloženi antitelima usmerenih ka *Campylobacter* spp. specifičnim antigenima. Automatskom pipetom u prvi bunarčić kita naliva se 0,1 ml ispitivanog uzorka i proces ispitivanja prisustva antigena *Campylobacter* spp. se obavlja automatski. Ako su antigeni *Campylobacter* spp. prisutni u uzorku, oni će se vezati sa unutrašnje strane bunarčića, dok se nevezane komponente izbacuju ispiranjem. Tokom poslednje faze ispitivanja, dodaje se supstrat 4-metil-umbeliferil-fosfat (4-MUP), koji dovodi do nastanka fluorescentnog proizvoda 4-metil-umbiliferona, čija se fluorescencija meri na 450 nm. Na kraju analize, rezultati se automatski analiziraju za svaki uzorak. Dobijeni rezultati se zatim porede sa internom referencom i interpretiraju se kao pozitivni/negativni.

4.1.6 Reagensi za ispitivanje genetskih karakteristika 16S rRNK

- Master MasterPure Complete DNA and RNA Purification kit (Tissue and Cell Lysis solution, MPC protein Precipitation Reagent, TE buffer) - kit za izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina, proizvođač Epicentre, USA;
- Proteinaza K – proizvođač Merck, Nemačka;
- Izopropanol – proizvođač Sigma Aldrich, Nemačka;
- Etanol 75% – proizvođač Sigma Aldrich, Nemačka;
- SYBR Green MasterMix (2×) – kit za pripremu RealTime PCR reakcione smeše, proizvođač Invitrogen, USA;
- Set prajmera za ispitivanje hipervarijabilnog regiona gena za sintezu 16S rRNK – 16S-f, 16S-r (100 μM) - proizvođač Invitrogen, USA. Spisak prajmera dat je u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. – Spisak korišćenih prajmera za određivanje pripadnosti rodu *Campylobacter*

Prajmer	Target gen	Dužina amplifikovane sekvence	Sekvenca
16S-f 16S-r	16S rRNK	287 bp	5'- CTGCTTAACACAAGTTGAGTAGG -3' 5'- TTCTGACGGTACCTAAGGAA -3'

4.1.7 Reagensi za određivanje pripadnosti vrstama *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* i *Campylobacter lari* pomoću metode multipleks PCR

- MasterPure Complete DNA and RNA Purification kit (Tissue and Cell Lysis solution, MPC protein Precipitation Reagent, TE buffer) - kit za izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina, proizvođač Epicentre, USA;
- Proteinaza K – proizvođač Merck, Nemačka;
- Izopropanol – proizvođač Sigma Aldrich, Nemačka;
- Etanol 75% – proizvođač Sigma Aldrich, Nemačka;
- Amplitaq Gold PCR Master Mix (2×) – kit za pripremu reakcione smeše, proizvođač Invitrogen, USA;
- Agarozni gel u prahu, proizvođač Invitrogen, USA;
- Etidijum bromid – proizvođač Sigma Aldrich, Nemačka
- 10×TBE Buffer – proizvođač Gibco, Life Technologies
- GeneRuler 100 bp DNA Plus Ladder – boja za vizuelizaciju amplifikovanih sekvenci u elektroforetskom polju, proizvođač Thermo Scientific, Velika Britanija;

- Set prajmera za ispitivanje pripadnosti vrstama *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* i *Campylobacter lari* – jej-f, jej-r, col-f, col-r, lar-f, lar-r (100 µM) - proizvođač Invitrogen, USA. Spisak prajmera korišćenih za ispitivanje dat je u tabeli 4.2.

Tabela 4.2. – Spisak korišćenih prajmera za određivanje pripadnosti rodu *Campylobacter*

Prajmer	Target gen	Dužina amplifikovane sekvence	Sekvenca
jej-f jej-r	<i>oxrd</i> 1414	161 bp	5'- CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT -3' 5'- CCATAAGCACTAGCTAGCTGAT -3'
col-f col-r	<i>ask</i>	502 bp	5'- GGTATGATTTCTACAAAGCGAG -3' 5'- ATAAAAGACTATCGTCGCGTG -3'
lar-f lar-r	<i>glyA</i>	251 bp	5'- TAGAGAGATAGCAAAAGAGA -3' 5'- TACACATAATAATCCCACCC -3'

4.1.8 Diskovi antibiotika

Za ispitivanje osetljivosti na antimikrobne lekove korišćeni su komercijalno proizvedeni diskovi koji su sadržavali sledeće antimikrobne lekove: 5 µg ciprofloksacina (hinoloni), 30 µg nalidiksinske kiseline (hinoloni), 30 µg tetraciklina (tetraciklini), 15 µg eritromicina (makrolidi) i 10 µg gentamicina (aminoglikozidni antibiotici) proizvođača Oxoid (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK).

4.1.9. Trake za E-test

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antimikrobnih lekova korišćene su komercijalno proizvedene E trake koje su sadržavale sledeće koncentracije antimikrobnih lekova: 0,002 – 32 µg/ml ciprofloksacina (hinoloni), 0,016 – 256 µg/ml nalidiksinske kiseline (hinoloni), 0,016 - 256 µg/ml tetraciklina (tetraciklini), 0,016 - 256 µg/ml eritromicina (makrolidi) i 0,016 - 256 µg/ml gentamicina (aminoglikozidni antibiotici) proizvođača Biomerieux (Biomerieux, Francuska).

4.2 Metode

4.2.1 Uzorkovanje na klanici i transport uzoraka

Uzorkovani su trupovi živine iz tri klanice na teritoriji Republike Srbije, koje su različitog kapaciteta klanja (dve su velike industrijske klanice, dok je jedna bila zanatska) i koje imaju značajnu ulogu u snabdevanju tržišta živinskim mesom. Trupovi su uzorkovani na dva mesta duž linije klanja i to neposredno posle evisceracije i posle hlađenja.

Uzorkovani trupovi živine su stavljeni u sterilne plastične kese kako bi se sprečilo razlivanje sadržaja i unakrsna kontaminacija. Svi uzorkovani trupovi su podvrgavani ispiranju sa peptonskom vodom. U svaku kesu sa živinskim trupom je naliveno 400 ml peptonske vode i svaka kesa je protresana u trajanju od 60 sekundi. Nakon toga ispirci živinskih trupova presipani su u sterilne staklene boce. Transport uzoraka je obavljan u ručnom frižideru, na temperaturi od + 4 °C. Uzorci su istog dana dopremani u laboratoriju gde je započet postupak ispitivanja na prisustvo kampilobakterija.

4.2.2. Detekcija *Campylobacter* spp. primenom automatizovanog kvalitativnog testa mini Vidas (Biomerieux Francuska)

Pod aseptičnim uslovima je uzimano 25 ml ispirka živinskog trupa i to je nalivano sa 225 ml Bolton bujona bez krvi. Uzorak je potom homogenizovan i inkubiran pri mikroaerofilnim uslovima u termostatu prvo 4 sata na temperaturi od 37 °C, pa zatim 44 sata pri temperaturi od 41,5 °C.

Priprema uzorka za izradu imunoenzimske probe:

Nakon inkubacije, 1 ml uzorka prenet je u posebnu epruvetu. Preostali deo uzorka je obeležen i odložen u stalak za epruvete pored uređaja, na sobnoj temperaturi do dobijanja rezultata automatizovanog kvalitativnog testa pomoću mini Vidas aparata (Biomerieux Francuska). Odvojena količina uzorka je odneta na destruktora kako bi se izvršila destrukcija ćelija kampilobakterija toplotom u cilju pripreme za imunoenzimsku probu kojom se utvrđuje da li se u ispitivanom uzorku nalaze antigeni *Campylobacter* spp. U destrukturu (Techne, Dri Block DB 3D, slika 4.1) na temperaturi od 95 °C u trajanju od 15 minuta, vrši se razlaganje ćelijskog zida bakterije.



Slika 4.1. – Destruktor (Techne, Dri Block DB 3D)

Nakon 15 minuta, kada je ćelijski zid bakterija razložen, 0,1 ml uzorka je automatskom pipetom prenet u plastični ram koji se postavlja u mini Vidas aparat.

SRP (Solid Phase Receptacle) je oblikovani nastavak vrha pipete napravljen od polipropilenskog ili polistirenskog materijala. Tokom izrade unutrašnja površina je obložena antigenom ili antitelom za apsorpciju što joj omogućava da apsorbuje rastvorljive proteine.

Svaki reagens strip sadrži jedno udubljenje za uzorak, osam udubljenja za reagens i jednu optičku kivetu



Slika 4.2. – Aparat miniVidas

Nakon urađene analize aparat štampa rezultate analize na papiru (slika 4.3). Negativni rezultati su smatrani definitivno negativnim uzorcima, dok su pozitivni uzorci dalje analizirani tako što smo ih zasejali na hranjive ploče (mCCD agar i CampyFood ID agar).

```
mini VIDAS Report
Section: B
Completed: 14:50:48 28Apr12
Campylobacter (CAM)
Ver: R5.3.0
Lot#: 120911-0
Standard used:
Completed: 17:15:11 27Apr12
RFV = 4735
TV Negative < 0.10
TV Positive >= 0.10

Position: B1
Sample ID: 4608.01
Background: 115 RFV: 3043
TV: 0.64 Result: Positive

Position: B2
Sample ID: 4608.02
Background: 115 RFV: 4472
TV: 0.94 Result: Positive

Position: B3
Sample ID: 4608.03
Background: 118 RFV: 11077
TV: 2.33 Result: Positive

Position: B4
Sample ID: 4608.04
Background: 113 RFV: 11618
TV: 2.45 Result: Positive

Position: B5
Sample ID: 4608.05
Background: 112 RFV: 11242
TV: 2.37 Result: Positive

Position: B6
Sample ID: 4608.06
Background: 117 RFV: 10959
TV: 2.31 Result: Positive
```

Slika 4.3. – Izgled rezultata sa miniVIDAS aparata

4.2.3 Izolacija *Campylobacter* spp. na mCCD agaru

Preostali deo uzorka, koji je ostavljen do dobijanja rezultata sa mini Vidas aparatu, zasejan je na mCCD agar. Zasejane podloge su inkubirane 48 sati na 41,5 °C. Karakteristične kolonije *Campylobacter* spp. na mCCD agaru su sivkaste, često sa metalnim sjajem, pljosnate, vlažne, sa tendencijom širenja (slika 4.4).



Slika 4.4. – Karakteristične kolonije *Campylobacter* spp. na mCCD agaru

4.2.4 Izolacija na CampyFood ID agar (CFA) ploči

Karakteristične kolonije kampilobakterija, koje su izrasle na mCCD agaru, presejane su na hromogenu komercijalnu podlogu CampyFood ID agar (CFA), proizvođača Biomerieux, France. Zasejane podloge su inkubirane 24 sata na 41,5 °C, u mikroaerofilnim uslovima. Karakteristične kolonije *Campylobacter* spp. na CampyFood agaru su burgundi-crvene do narandžastvo-crvene boje (slika 4.5).



Slika 4.5. – Karakteristične kolonije *Campylobacter* spp. na CampyFood agaru

Takve kolonije su u sterilnim uslovima, ezom prenete u kriogene ampule i zamrznute na -18 °C. Pri toj temperaturi izolati *Campylobacter* spp. su čuvani za dalja ispitivanja.

4.2.5 Detekcija *Campylobacter* spp. pomoću 16S rRNK

Nakon analize genoma referentnih sojeva ATCC 33291 *Campylobacter jejuni*, ATCC 43478 *Campylobacter coli* i ATCC 35223 *Campylobacter lari*, „BLAST“ softverom, za dokazivanje pripadnosti izolata rodu *Campylobacter* izabran je hipervarijabilni region gena odgovornog za sintezu 16S ribozomalne RNK. Softverskom analizom konstruisani su parovi prajmera koji se komplementarno vežu ispred i iza odgovarajuće sekvence gena za sintezu 16S rRNK.

Tokom ispitivanja ukupno je izolovano 97 uzoraka nukleinskih kiselina (89 izolata, 5 kamilobakterija izolovanih u slučajevima oboljenja ljudi i uzorci referentnih sojeva ATCC 33291 *Campylobacter jejuni*, ATCC 43478 *Campylobacter coli* i ATCC 35223 *Campylobacter lari*).

U svaku minutubu u kojoj su se nalazile precipitirane bakterijske ćelije dodato je po 0,3 mL Tissue and Cell rastvora i po 1 µL Proteinaze K koncentracije 50 µg/µL. Uzorci su zatim postavljeni u vodeno kupatilo na temperaturu od 65 °C u trajanju od 15 minuta. Uzorci su posle inkubiranja u vodenom kupatilu stavljeni na led pet minuta. Zatim je u svaki uzorak dodato po 0,15 mL reagensa MPC Protein Precipitation. Uzorci su onda mešani na vibratoru za epruvete 10 sekundi, a zatim su centrifugirani 10 minuta pri 13.000 obrtaja/min. Supernatant je zatim izpipetiran u nove minutube i u svaku je dodato po 0,5 mL izopropanola. Nukleinske kiseline su zatim precipitirane centrifugiranjem koje je trajalo 10 minuta pri 13.000 obrtaja/min, izopropanol je odliven, a dobijeni precipitat je ispran 75% etanolom dva puta, a potom je sav rezidualni etanol uklonjen. Precipitat nukleinskih kiselina, koji je pri tome dobijen, rastvoren je u 35 µL pufera za čuvanje DNK i uskladišten u zamrzivač na temperaturu od -30 °C.

Koncentracija i čistoća svakog pojedinačnog uzorka DNK ispitana je na UV spektrofotometru. Za dalji rad, uzorci DNK normalizovani su na koncentraciju od 100 µg/mL i čistoću $\lambda_{260/280} = 1,8-2,0$.

Dobijeni izolati DNK ispitani su RealTime PCR tehnikom. Za ispitivani gen pripremljena je reakciona smeša čiji je sastav dat u tabeli 4.3.

Tabela 4.3. – Sastav reakcione smeše za *Real Time* PCR

Ukupni volumen smeše (μL)	20,0
Sastav i koncentracije komponenti:	
2×Puffer (μL)	10,0
16S-f (μL)	1,0
16S-r (μL)	1,0
Sterilna dd H ₂ O (μL)	7,0
DNK ispitivanog uzorka (μL)	1,0

Program ispitivanja gena za sintezu 16S rRNK *Real Time* PCR metodom dat je u tabeli 4.4.

Tabela 4.4. – Program za *Real Time* PCR

Inicijalna denaturacija	95°C	10 min
40 ciklusa	95°C	15 s
	60°C	30 s

4.2.6 Određivanje pripadnosti vrstama *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* i *Campylobacter lari*

Nakon analize genoma referentnih sojeva ATCC 33291 *Campylobacter jejuni*, ATCC 43478 *Campylobacter coli*, ATCC 35223 *Campylobacter lari*, „BLAST“ softverom, za dokazivanje pripadnosti izolata svakoj od navedenih vrsta izabrani su sledeći geni:

- Oksidoreduktaza (*oxrd* 1441) - za dokazivanje pripadnosti vrsti *Campylobacter jejuni*
- Aspartokinaza (*ask*) – za dokazivanje pripadnosti vrsti *Campylobacter coli*
- Serin hidroksimetil transferaza (*glyA*) - za dokazivanje pripadnosti vrsti *Campylobacter lari*

Softverskom analizom konstruisani su parovi prajmera koji se komplementarno vežu ispred i iza odgovarajuće sekvence za svaki od navedenih gena.

Tokom ispitivanja ukupno je izolovano 97 uzoraka nukleinskih kiselina (89 izolata, 5 kamilobakterija izolovanih u slučajevima oboljenja ljudi i uzorci referentnih sojeva ATCC 33291 *Campylobacter jejuni*, ATCC 43478 *Campylobacter coli* i ATCC 35223 *Campylobacter lari*).

U svaku minitubu u kojoj su se nalazile precipitirane bakterijske ćelije dodato je po 0,3 mL Tissue and Cell rastvora i po 1 μ L Proteinaze K koncentracije 50 μ g/ μ L. Uzorci su zatim postavljeni u vodeno kupatilo na temperaturu od 65 °C u trajanju od 15 minuta. Uzorci su posle inkubiranja u vodenom kupatilu stavljeni na led pet minuta. Zatim je u svaki uzorak dodato po 0,15 mL reagensa MPC Protein Precipitation. Uzorci su onda mešani na vibratoru za epruvete 10 sekundi, a zatim su centrifugirani 10 minuta pri 13.000 obrtaja/min. Supernatant je zatim izpipetiran u nove minitube i u svaku je dodato po 0,5 mL izopropanola. Nukleinske kiseline su zatim precipitirane centrifugiranjem koje je trajalo 10 minuta pri 13.000 obrtaja/min, izopropanol je odliven, a dobijeni precipitat je ispran 75% etanolom dva puta, a potom je sav rezidualni etanol uklonjen. Precipitat nukleinskih kiselina, koji je pri tome dobijen, rastvoren je u 35 μ L pufera za čuvanje DNK i uskladišten u zamrzivač na temperaturu od -30 °C.

Koncentracija i čistoća svakog pojedinačnog uzorka DNK ispitana je na UV spektrofotometru. Za dalji rad, uzorci DNK normalizovani su na koncentraciju od 100 μ g/mL i čistoću $\lambda_{260/280} = 1,8-2,0$.

Dobijeni DNK izolati ispitani su multipleks PCR tehnikom. Za ispitivane gene pripremljena je reakciona smeša čiji je sastav dat u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. – Sastav reakcione smeše za mutipleks PCR

Ukupni volumen smeše (μ L)	50,0
Sastav i koncentracije komponenti:	
2 \times Pufer (μ L)	25,0
jej-f (μ L)	2,0
jej-r (μ L)	2,0
col-f (μ L)	2,0
col-r (μ L)	2,0
lar-f (μ L)	2,0
lar-r (μ L)	2,0
Sterilna dd H ₂ O (μ L)	11,0
DNK ispitivanog uzorka (μ L)	2,0

Program ispitivanja multipleks PCR metodom dat je u tabeli 4.6.

Tabela 4.6. – Program za multipleks PCR

Inicijalna denaturacija	95°C	10 min
25 ciklusa	95°C	30 s
	58°C	90 s
	72°C	60 s
Finalna elongacija	72°C	7 min

Nakon amplifikacije, po 10 μ L dobijenog amplifikata pomešano je sa 2 μ L boje za elektroforezu i mešavina je izpipetirana u bunarčiće dvopostotnog agaroznog gela obojenog etidijum bromidom. Gel je stavljen u kadu i podvrgnut elektroforezi pri naponu od 120 V, jačini struje od 400 mA tokom 30 minuta. Nakon elektroforeze, gelovi su stavljeni na UV transiluminator radi vizuelizacije traka, nakon čega su snimljeni sistemom za fotografisanje gelova GelDoc (Eppendorf, Nemačka).

4.2.7 Sekvenciranje i određivanje filogenetske srodnosti

Kao osnova za molekularnu identifikaciju izolovanih sojeva *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* i *Campylobacter lari* i određivanje njihove filogenetske srodnosti korišćena je sekvenca DNK veličine 1100 baznih parova koja je visoko konzervisana kod različitih rodova bakterija. Ovaj gen (*dnaJ*) kodira sintezu proteina toplotnog šoka familije 40 (HSP40), odnosno ko-reguliše sintezu sigma 32 faktora toplotnog šoka.

Ukupno 71 uzorak (64 izolata poreklom sa trupova živine, 5 humanih izolata i uzorci referentnih sojeva ATCC 33291 *Campylobacter jejuni*, ATCC 43478 *Campylobacter coli* i ATCC 35223 *Campylobacter lari*) izolovane DNK amplifikovano je parom prajmera *dnaJ-f* i *dnaJ-r*. Dobijeni amplifikati vizuelizovani su na 1,5% agarozu gelu, a zatim su prečišćeni na *Qiaquick mini spin* (Qiagen, Hilden, Nemačka) kolonama. Nakon ponovne provere vizuelizacijom amplifikata kao trake od približno 750 bp u agarozu gelu, uzorci su pripremljeni za sekvenciranje.

Sekvenciranje je izvršeno u kompaniji *GATC BIOTECH*, Keln, Nemačka. Za sekvenciranje je korišćen 71 uzorak od po 20 μ L prečišćenog amplifikata. Korišćena je tehnika *One Shot Read MP* na aparatu *Roche GS FLX Titanium 454*. Radi što preciznije identifikacije sekvencirana su oba lanca fragmenta DNK. Rezultati sekvenciranja predstavljeni su u obliku hromatograma i datoteka u FASTA formatu. Za identifikaciju izolata, datoteke u FASTA formatu učitane su u *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* softver i odabran je algoritam za prepoznavanje visokosličnih sekvenci kod mikroorganizama. Obradom podataka o sekvenciranim delovima gena za sintezu

sigma 32 faktora toplotnog šoka dobijeni su rezultati identifikacije izolata kampilobakterija u vidu naziva vrste i/ili podvrste kao i o procentu poklapanja redosleda baza referentnog soja u odnosu na ispitivani soj.

Da bi se ispitala filogenetska srodnost dobijenih sojeva, njihove sekvence nukleotida poređane su i poravnate korišćenjem softverskog alata ClustalW Omega Multiple Sequence Alignment (The European Bioinformatics Institute). Poravnate sekvence ispitane su Neighbour-joining metodom (ATCC referentni sojevi, humani izolati i izolati iz klanica). Divergencija sekvenci prikazane je pomoću Bootstrap vrednosti (izražene kao procenat od 1000 replikata).

4.2.8 Ispitivanje osetljivosti *Campylobacter* spp. na antimikrobne lekove

4.2.8.1 Disk difuziona metoda

Osetljivost izolata *Campylobacter* spp. na antibiotike je ispitana disk difuzionom metodom po Kirby-Baueru na Mueller Hinton agaru sa dodatkom 5% defibrinisane ovčije krvi prema uputstvu Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Upotrebljeni su diskovi koji su sadržavali sledeće antimikrobne lekove: 5 µg ciprofloksacina (hinoloni), 30 µg nalidiksinske kiseline (hinoloni), 30 µg tetraciklina (tetraciklini), 15 µg eritromicina (makrolidi) i 10 µg gentamicina (aminoglikozidni antibiotici). Suspenzija mikroorganizama je dobijena manuelnim protresanjem epruvete, kako bi se postiglo potrebno zamućenje prema McFarland standardu, da bi se zatim sterilnom ezom ravnomerno nanela na površinu Mueller-Hinton agara. Nakon toga automatskim uređajem (Oxoid, Velika Britanija) su postavljeni diskovi na površinu Mueller Hinton agara.

Tako pripremljena podloga je inkubirana 24 sata na temperaturi od 42 °C. Nakon inkubacije merena je zona inhibicije rasta ispitujućih kampilobakterija oko diska sa antimikrobnim lekom, i ocenjivanje je vršeno prema EUCAST i CLSI uputstvu. Ispitivani izolati su na osnovu veličine zone inhibicije rasta proglašavani kao rezistentani, intermedijarani i senzitivni (osetljivi) (tabela 4.7). Veličina zone inhibicije je merena etaloniranim nonijusom (šubler, kljunasto merilo).

Tabela 4.7. – Okviri za tumačenje rezultata disk difuzionom metodom po CLSI:

Antimikrobni lekovi	Potencija	Zona inhibicije rasta (mm)		
		Senzitivan	Intermedijaran	Rezistentan
Ciprofloksacin	5 µg	≥ 25	24 – 21	≤ 20
Nalidiksinska kiselina	30 µg	-	-	< 14 ^(ID)
Tetraciklini	30 µg	≥ 25	24 – 21	≤ 20
Eritromicin	15 µg	≥ 16	15 – 13	≤ 12
Gentamicin	10 µg	≥ 16	15	≤ 14

4.2.8.2 Kvantitativna disk difuziona metoda (E-test)

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije korišćen je kvantitativni disk difuzioni test (E-test, epsilometar test). E-testom se određuju minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) datih antibiotika, izražene u $\mu\text{g/ml}$, koje će inhibirati rast određenih bakterija. Kao referentna podloga za E-test korišćen je Mueller Hinton agar sa dodatkom 5% defibrinisane ovčije krvi, kao i u disk difuzionoj metodi. Suspenzija mikroorganizama je pripremana na isti način kao i disk difuzionoj metodi, tj. dobijena je manuelnim protresanjem epruvete, kako bi se postiglo potrebno zamućenje prema McFarland standardu, da bi se zatim sterilnom ezom ravnomerno nanela na površinu Mueller-Hinton agara. Nakon toga su postavljene E test trake sa gradijentom, tako da strana na kojoj je nalazi MIK skala bude okrenuta ka poklopcu ploče i da maksimalna koncentracija bude najbliža ivici ploče, vodeći računa da čitava traka u potpunosti dodiruje površinu podloge.

Tako pripremljena podloga je inkubirana 24 sata na temperaturi od 42 °C. Nakon inkubacije javljala se zona inhibicije rasta ispitujućih kampilobakterija oko E test traka sa antibiotikom oblika elipse, i ocenjivanje je vršeno prema EUCAST i CLSI uputstvu. Očitavanje se vršilo uzimanjem onog broja gde se porasle kolonije dodiruju sa E test trakom i ta vrednost predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK) antibiotika.

4.3 Statistička obrada podataka

U statističkoj analizi dobijenih rezultata izvedenog eksperimenta, kao statistička metoda korišćen je Hi-kvadrat test za poređenje učestalosti neparametrijskih obeležja. Značajnost razlika utvrđena je na nivou značajnosti od 5%. Statistička analiza dobijenih rezultata urađena je u statističkom paketu PrizmaPad 6.00. Dobijeni rezultati ispitivanja prikatan su tabelarno i grafički.

5. Rezultati istraživanja

U toku istraživanja ukupno je pregledano 115 uzoraka ispiraka trupova živine, 5 izolata poreklom od ljudi i 3 referentna ATCC soja *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* i *Campylobacter lari*.

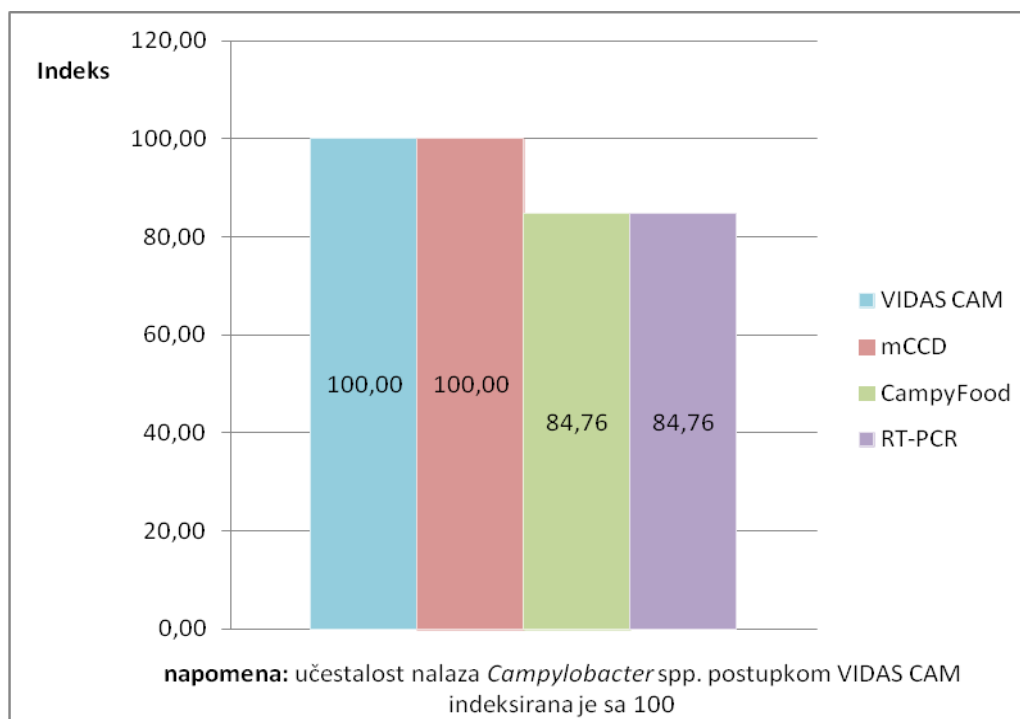
5.1 Rezultati ispitivanja učestalosti nalaza *Campylobacter* spp. na trupovima živine

Uzorkovano je 115 trupova živine na linijama klanja tri klanice (dve su velike industrijske klanice – objekat „A” i objekat „B”, dok je jedna bila zanatska – objekat „C”) na teritoriji Republike Srbije.

Tabela 5.1. – Učestalost nalaza *Campylobacter* spp. na trupovima živine

Uzorkovano (n)	Postupak i učestalost nalaza (n i %)							
	VIDAS CAM		mCCD		CampyFood		RealTime PCR	
	n	%	n	%	n	%	n	%
115	105 ^{A,B}	91,30	105 ^{C,B}	91,30	89 ^{A,C}	77,39	89 ^{B,D}	77,39

legenda: ista slova A, B, C, D – $p < 0,05$



Grafikon 5.1. – Indeksirane vrednosti učestalosti nalaza *Campylobacter* spp. na trupovima živine u zavisnosti od primenjenog postupka

Iz indeksiranih vrednosti učestalosti nalaza *Campylobacter* spp. uočava se istovetna učestalost nalaza dobijenih postupkom VIDAS CAM i mCCD, kao i istovetna učestalost nalaza *Campylobacter* spp. pri upotrebi postupaka CampyFood i RT-PCR. Učestalost nalaza *Campylobacter* spp. upotrebom postupaka CampyFood i RT-PCR bila je značajno manja ($p < 0,05$) u odnosu na učestalost nalaza pri upotrebi postupka VIDAS CAM, odnosno mCCD (tabela. 5.1). Indeksirane vrednosti za VIDAS CAM i mCCD su bile 100, a za ostala dva postupka 84,76 (grafikon 5.1).

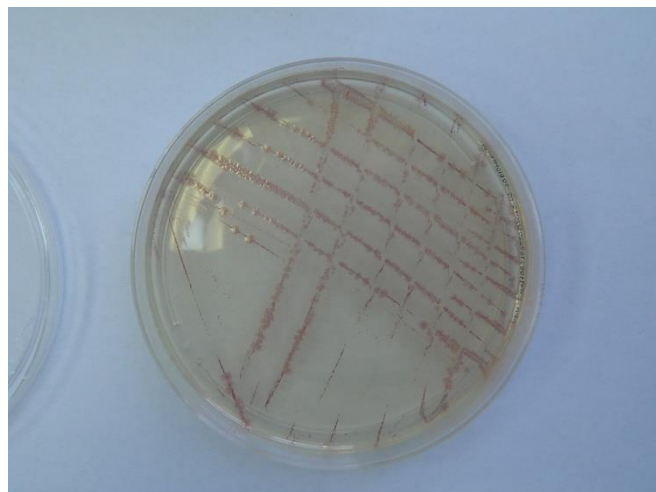
Primenom ELFA tehnologije (Enzyme Linked Fluorescent Assay) pomoću automatizovanog kvalitativnog testa mini VIDAS, urađen je skrining (trijaža) uzorkovanih ispiraka trupova živine, pri čemu smo dobili 105 potencijalno pozitivnih uzoraka, koje smo dalje analizirali tako što smo ih zasejali na mCCD agar i CampyFood ID agar.

Na mCCD agaru od 105 zasejanih uzoraka izraslo je svih 105. Karakteristične kolonije *Campylobacter* spp. na mCCD agaru su bile sivkaste, često sa metalnim sjajem, pljosnate, vlažne, sa tendencijom širenja (slika 5.1).



Slika 5.1. – Karakteristične kolonije *Campylobacter* spp. na mCCD agaru

Svih 105 karakterističnih kolonija kampilobakterija, koje su izrasle na mCCD agaru, presejane su na CampyFood ID agar, pri čemu su na 89 ploča izrasle karakteristične kolonije *Campylobacter* spp. koje su bile burgundi-crvene do narandžasto-crvene boje (slika 5.2).



Slika 5.2. - Karakteristične kolonije *Campylobacter* spp. na CampyFood agaru

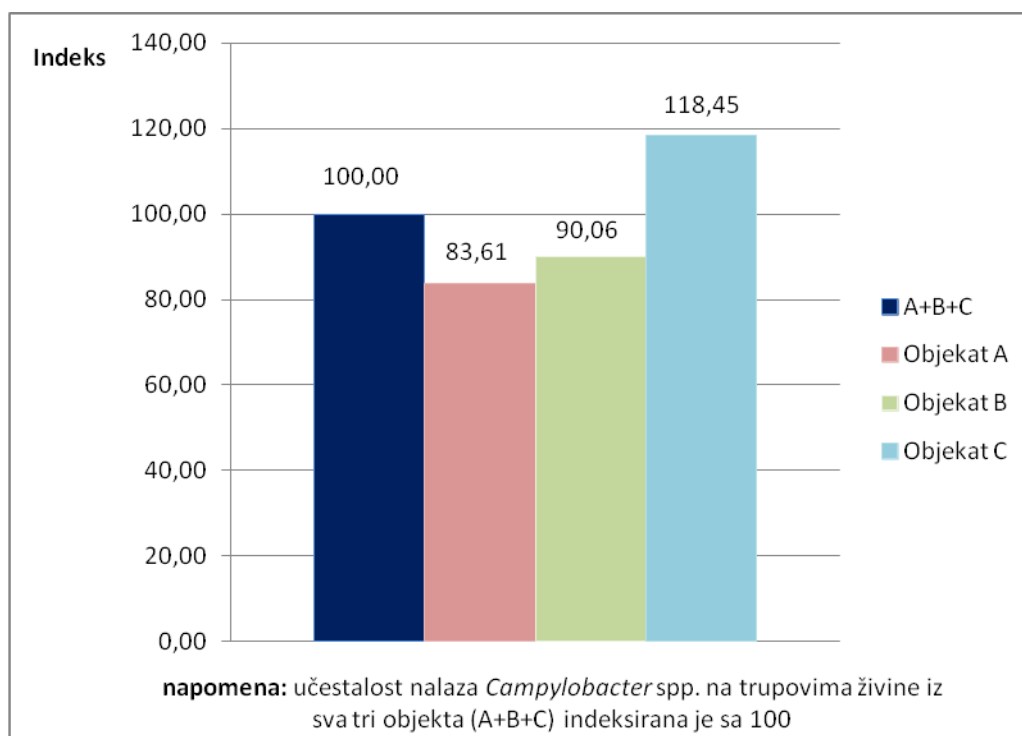
Nakon ove identifikacije svih 89 izolata je ispitano RealTime PCR tehnikom, da bi se dokazala pripadnost rodu *Campylobacter*.

Tabela 5.2. – Učestalost nalaza *Campylobacter* spp. na trupovima živine

OBJEKAT	Uzorkovano	Pozitivno	Prevalencija, %
A	34	22 ^A	64,71
B	33	23 ^B	69,70
C	48	44 ^{A,B}	91,67
A+B+C	115	89	77,39

legenda: ista slova A, B – $p < 0,05$

Od ukupnog broja pregledanih uzoraka trupova živine (115), 89 uzoraka identifikovano je kao *Campylobacter* spp., što predstavlja prevalenciju od 77,39%. U objektu „A” je uzorkovano 34 uzorka, od kojih je 22 (64,71%) identifikovano kao *Campylobacter* spp., u objektu „B” je uzorkovano 33 uzorka, od kojih je 23 (69,70%) identifikovano kao *Campylobacter* spp., dok je u objektu „C” uzorkovano 48 uzoraka, od kojih je 44 (91,67%) identifikovano kao *Campylobacter* spp., što je bilo statistički značajno više ($p < 0,05$) u odnosu na industrijske objekta (objekti „A” i „B”) (tabela 5.2).



Grafikon 5.2. – Indeksirane vrednosti učestalosti nalaza *Campylobacter* spp. na trupovima živine iz različitih objekata

Kada se prosečna prevalencija učestalosti nalaza prikaže indeksiranim vrednostima (indeks 100 je prosečna učestalost za sva tri objekta A+B+C) uočava se da je indeksirana vrednost za objekat „A” 83,61, objekat „B” 90,06, a objekat „C” 118,45 (grafikon 5.2).

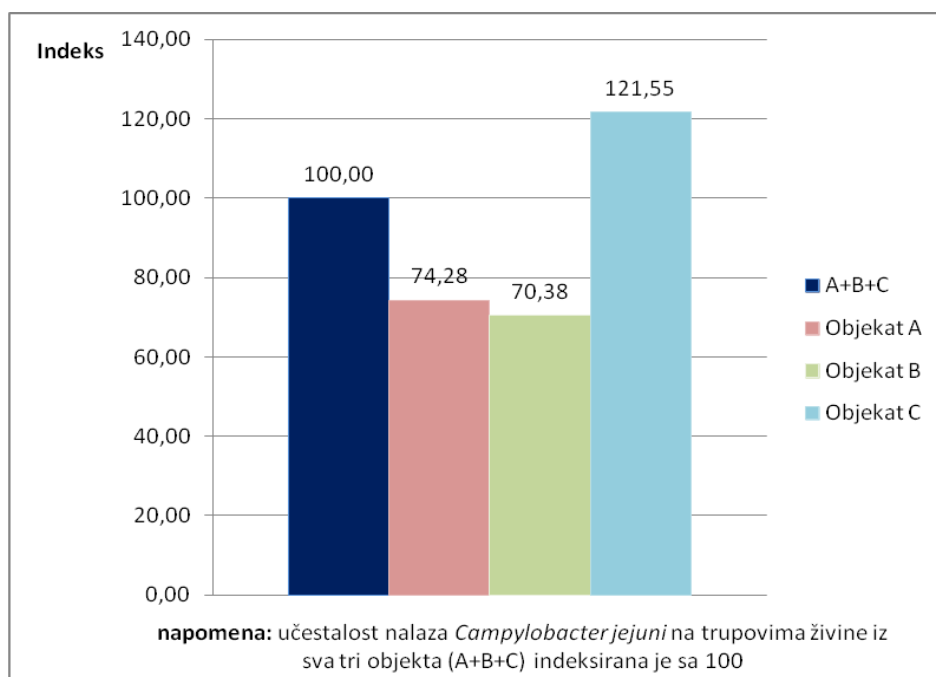
5.2 Rezultati identifikacije izolata *Campylobacter* spp. sa trupova živine

Identifikacija izolata *Campylobacter* spp. sa trupova živine je utvrđena pomoću multipleks PCR metode, pri čemu je 35 izolata identifikovano kao *Campylobacter jejuni*, 29 izolata kao *Campylobacter coli*, dok je u 14 uzoraka ustanovljena mešana kultura *C. jejuni* i *C. coli*.

Tabela 5.3. – Identifikacija i učestalost nalaza izolata *Campylobacter* spp. na trupovima živine

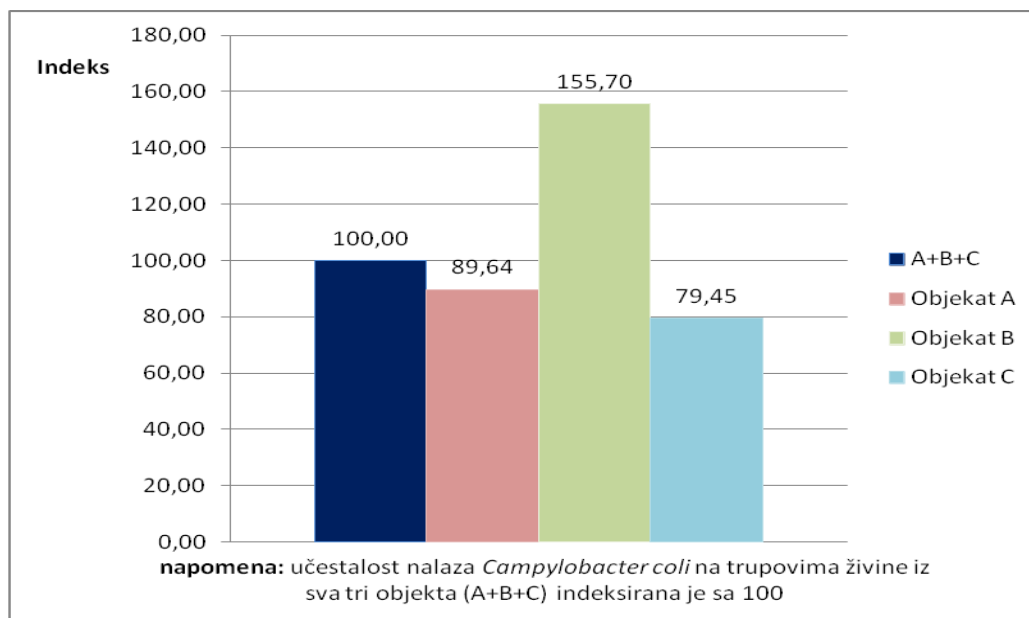
OBJEKAT	<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Campylobacter coli</i>		Mešane kulture		UKUPNO	
	n	%	n	%	n	%	n	%
A	5	33,33	5	33,33	5	38,33	15	100
B	6	31,58	11	57,89	2	10,52	19	100
C	24	54,54	13	29,54	7	15,91	44	100
A+B+C	35	44,87	29	37,18	14	17,95	78	100

Iz tabele 5.3. se vidi da je 44,87% ispitanih izolata identifikovano kao *Campylobacter jejuni*, 37,18% kao *Campylobacter coli*, dok je u 17,95% izolata detektovana mešana kultura ove dve vrste.



Grafikon 5.3. – Indeksirane vrednosti učestalosti nalaza *Campylobacter jejuni* na trupovima živine iz različitih objekata

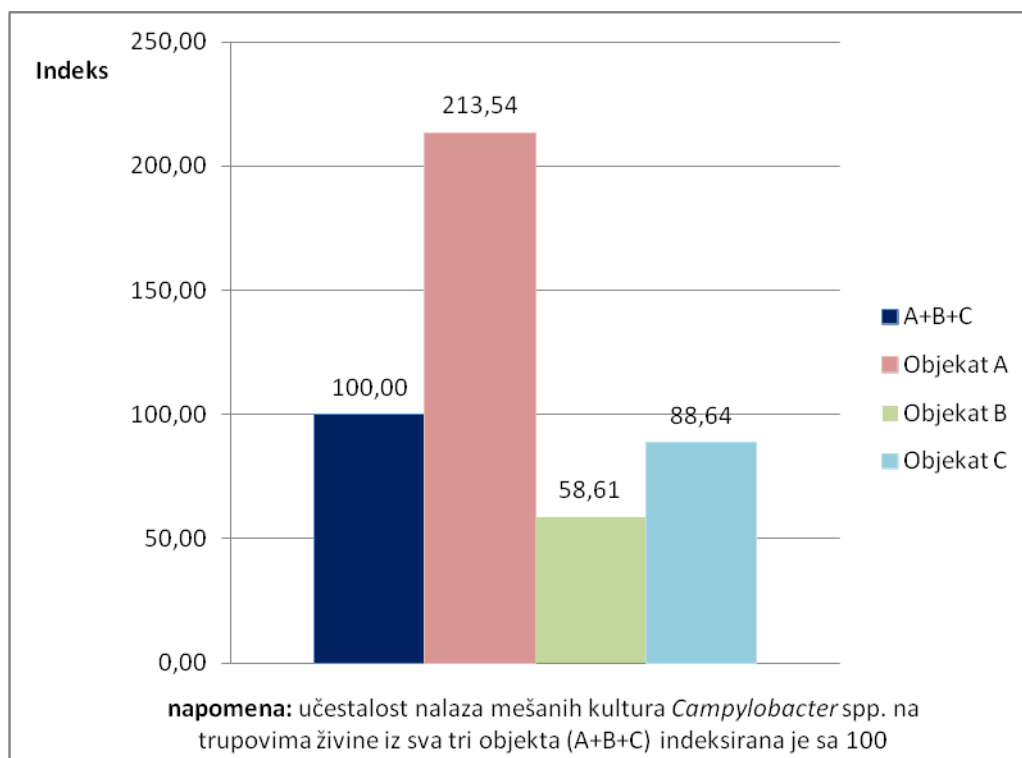
Iz indeksiranih vrednosti prikazanih grafikonom 5.3 se uočava da je učestalost nalaza *Campylobacter jejuni* na trupovima živine manja objektima „A”, odnosno „B”, a veća u objektu „C” u odnosu na prosečnu učestalost nalaza u sva tri objekta (A+B+C).



Grafikon 5.4. – Indeksirane vrednosti u učestalosti nalaza *Campylobacter coli* na trupovima živine iz različitih objekata

Učestalost nalaza *Campylobacter coli* na trupovima živine iz objekta „B” je daleko veća (indeks 155,70) u odnosu na indeksirane vrednosti nalaza *C. coli* na trupovima živine iz sva tri

objekta (A+B+C), dok je u objektu „A” indeksirana vrednost bila 89,64, a u objektu „C” 79,45 (grafikon 5.4).



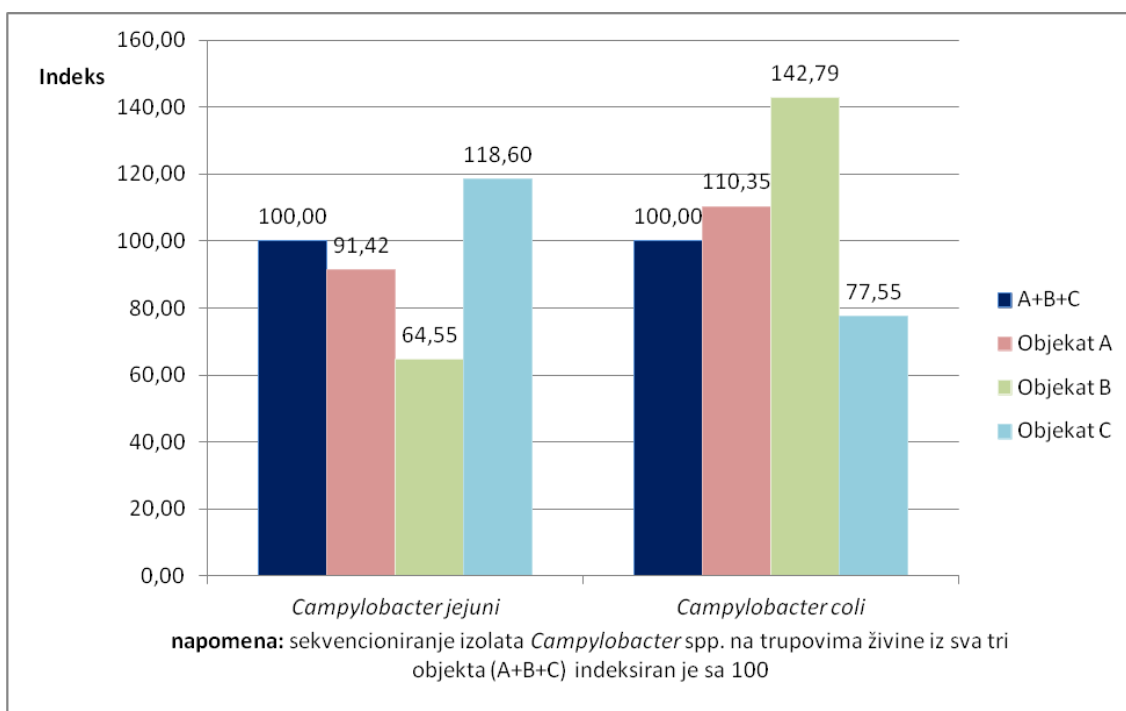
Grafikon 5.5. – Indeksirane vrednosti u učestalosti nalaza mešanih kultura *Campylobacter* spp. na trupovima živine iz različitih objekata

Indeksirane vrednosti prikazane grafikonom 5.5 pokazuju da je daleko najveća učestalost mešanih kultura bila na trupovima živine iz objekta „A” (indeks 213,54), a znatno manja na trupovima živine iz objekta „C” (indeks 88,63), a naročito na trupovima živine iz objekta „B” (indeks 58,61).

Tabela 5.4. – Sekvenciranje izolata *Campylobacter* spp.

OBJEKAT	Sekvenciranih izolata		<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Campylobacter coli</i>	
	n	%	n	%	n	%
A	10	100	5	50,00	5	50,00
B	17	100	6	35,30	11	64,70
C	37	100	24	64,86	13	35,14
A+B+C	64	100	35	54,69	29	45,31

Iz table 5.4. se vidi da je od ukupno 64 sekvencioniranih izolata sa trupova živine 35, odnosno 54,69% identifikovano kao *Campylobacter jejuni*, dok je 29, odnosno 45,31% identifikovano kao *Campylobacter coli*.



Grafikon 5.6. – Usporedni prikaz sekvencioniranja izolata *Campylobacter* spp. iz različitih objekata

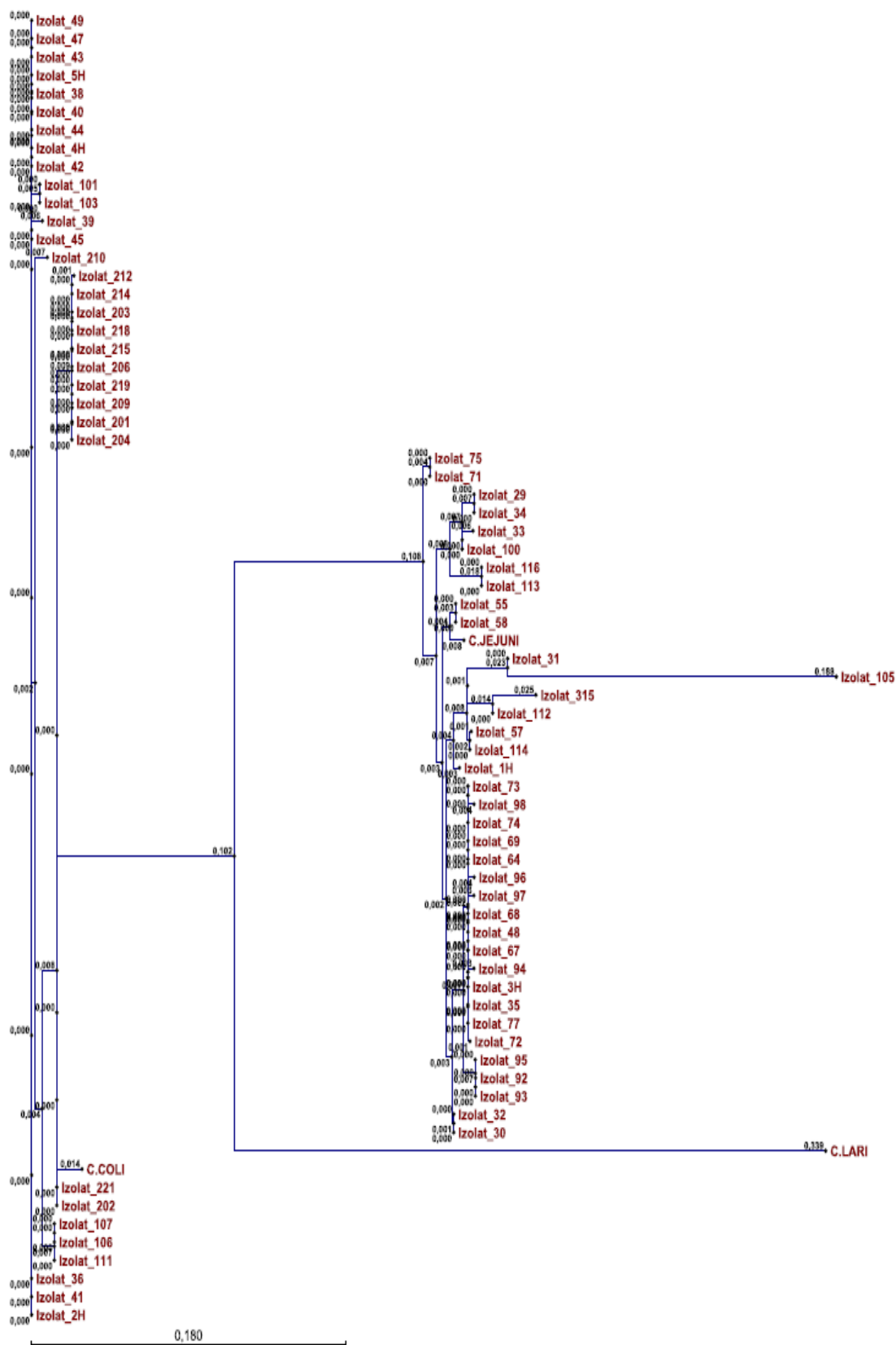
Izolat *Campylobacter jejuni* je najčešće sekvencioniran sa trupova živine iz objekta „C” (indeks 118,59), a *Campylobacter coli* sa trupova živine iz objekta „B” (indeks 142,79) (grafikon 5.6).

5.3 Rezultati filogenetske srodnosti izolata *Campylobacter* spp. sa trupova živine i izolata humanog porekla

Od ukupno 69 sekvencioniranih izolata (64 poreklom sa trupova živine i 5 izolata izolovanih u slučajevima oboljenja ljudi) 37 je označeno kao *Campylobacter jejuni* (35 sa trupova živine i 2 humana izolata), dok je 32 izolata detektovano kao *Campylobacter coli* (29 sa trupova živine i 3 humana izolata). Iz tabele 5.5 se vidi da 5 izolata *C. jejuni* potiče iz objekta „A”, 6 izolata iz objekta „B” i 24 iz objekta „C”. Iz objekta „A” potiče 5 izolata *C. coli*, iz objekta „B” 11 izolata, dok iz objekta „C” potiče 13 izolata *C. coli*.

Tabela 5.5. – Spisak sekvencionirani izolata *C. jejuni* i *C. coli* i njihovo poreklo

Izolat	Rezultat sekvenciranja	Poreklo (objekat) izolata	Izolat	Rezultat sekvenciranja	Poreklo (objekat) izolata
29	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	36	<i>C. coli</i>	Objekat B
30	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	38	<i>C. coli</i>	Objekat B
31	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	39	<i>C. coli</i>	Objekat B
32	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	40	<i>C. coli</i>	Objekat B
33	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	41	<i>C. coli</i>	Objekat B
34	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	42	<i>C. coli</i>	Objekat B
35	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	43	<i>C. coli</i>	Objekat B
48	<i>C. jejuni</i>	Objekat B	44	<i>C. coli</i>	Objekat B
55	<i>C. jejuni</i>	Objekat A	45	<i>C. coli</i>	Objekat B
57	<i>C. jejuni</i>	Objekat A	47	<i>C. coli</i>	Objekat B
58	<i>C. jejuni</i>	Objekat A	49	<i>C. coli</i>	Objekat B
64	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	101	<i>C. coli</i>	Objekat A
67	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	103	<i>C. coli</i>	Objekat A
68	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	106	<i>C. coli</i>	Objekat A
69	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	107	<i>C. coli</i>	Objekat A
71	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	111	<i>C. coli</i>	Objekat A
72	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	201	<i>C. coli</i>	Objekat C
73	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	202	<i>C. coli</i>	Objekat C
74	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	203	<i>C. coli</i>	Objekat C
75	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	204	<i>C. coli</i>	Objekat C
77	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	206	<i>C. coli</i>	Objekat C
92	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	209	<i>C. coli</i>	Objekat C
93	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	210	<i>C. coli</i>	Objekat C
94	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	212	<i>C. coli</i>	Objekat C
95	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	214	<i>C. coli</i>	Objekat C
96	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	215	<i>C. coli</i>	Objekat C
97	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	218	<i>C. coli</i>	Objekat C
98	<i>C. jejuni</i>	Objekat C	219	<i>C. coli</i>	Objekat C
100	<i>C. jejuni</i>	Objekat A	221	<i>C. coli</i>	Objekat C
105	<i>C. jejuni</i>	Objekat A	2H	<i>C. coli</i>	Humani izolati
112	<i>C. jejuni</i>	Objekat B	4H	<i>C. coli</i>	Humani izolati
113	<i>C. jejuni</i>	Objekat B	5H	<i>C. coli</i>	Humani izolati
114	<i>C. jejuni</i>	Objekat B			
116	<i>C. jejuni</i>	Objekat B			
315	<i>C. jejuni</i>	Objekat B			
1H	<i>C. jejuni</i>	Humani izolati			
3H	<i>C. jejuni</i>	Humani izolati			



Grafikon 5.7. – Klasteri, subklasteri i grane izolata *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*

Grafikonom 5.7 prikazani su klasteri, subklasteri i grane *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* iz kojih može da se vidi filogenetska srodnost pojedinih izolata. Od 37 izolata *C. jejuni*, 35 potiče iz tri objekta „A”, „B” i „C” (tabele 5.4 i 5.5), a dva izolata su humani. Od 32

izolata *C. coli* 29 potiče iz objekata „A”, „B” i „C” (tabele 5.4 i 5.5), a tri su humani izolati. Grafikonom je prikazan i klaster *Campylobacter lari*, koji potiče od referentnog soja. *C. lari* nije dokazan na trupovima živine u okviru ovog eksperimenta.

Tabela 5.6. – Poreklo, srodnost, broj izolata i broj grana *Campylobacter jejuni*

Poreklo (objekat) izolata	Srodnost	Broj izolata u grani	Broj grana	Ukupno izolata
A	istorodnost	1	1	1
A	istorodnost	2	1	2
B	istorodnost	2	2	4
C	istorodnost	1	6	6
C	istorodnost	2	3	6
C	istorodnost	3	2	6
1H	istorodnost	1	1	1
A + C	srodnost	2	1	2
A + B	srodnost	2	1	2
B + C + C	srodnost	3	1	3
3H + C + C + C	srodnost	4	1	4
UKUPNO			20	37

Izolati *C. jejuni* potiču iz tri objekta (A, B, C), a dva soja su humani izolati (1H i 3H). Od izolata iz objekta „A” jedan izolat nema srodnosti sa drugim izolatima, dok su dva izolata istorodna. Jedan od izolata iz objekta „A” je srodan izolatu iz objekta „C”, a jedan izolat iz objekta „A” srodan je jednom izolatu iz objekta „B”. Po dva izolata iz objekta „B” nalaze se u dve posebne grane (istorodni), jedan je srodan izolatu iz objekta „A” (kao što je već rečeno), a jedan je srodan sa dva izolata iz objekta „C”. Šest izolata iz objekta „C” čine po jednu granu (nemaju srodnost sa drugim izolatima). Po dva izolata iz objekta „C” su istorodni i nalaze se u po tri grane, dok se po tri istorodna izolata nalaze u dve grane. Jednu posebnu granu čine tri izolata iz objekta „C” i humani izolat 3H. Humanu izolat 1H nema srodnost sa ostalim izolatima *C. jejuni*. Filogenetskim ispitivanjem izolati (37 izolata) su razvrstani u 20 grana, od čega su četiri grane sa srodnim izolatima, pri čemu je jedan humani izolat (3H) srodan sa tri izolata iz objekta „C” (tabela 5.6).

Tabela 5.7. – Poreklo, srodnost, broj izolata i broj grana *Campylobacter coli*

Poreklo (objekat) izolata	Srodnost	Broj izolata u grani	Broj grana	Ukupno izolata
A	istorodnost	2	1	2
A	istorodnost	3	1	3
B	istorodnost	1	1	1
C	istorodnost	1	1	1
C	istorodnost	2	1	2
C	istorodnost	10	1	10
8xB + 5H + 4H	srodnost	10	1	10
B + B + 2H	srodnost	3	1	3
UKUPNO			8	32

Izolati (32 ukupno) *C. coli* nalaze se u osam filogenetski različitih grana od čega je šest istorodnih, a dve su srodne. Od pet izolata iz objekta „A” u jednoj grani su dva, a u drugoj tri izolata. Jedan izolat iz objekta „B” čini granu koja nema srodnost sa ostalim izolatima. Izolati *C. coli* iz objekta „C” nalaze se u tri grane, pri čemu u jednom slučaju jedan izolat čini jedni granu, u drugoj grani su dva izolata, a u trećoj je 10 izolata. U jednoj od srodnih grana nalazi se osam izolata iz objekta „B” i dva humana izolata (5H i 4H), dok su u drugoj srodnoj grani dva izolata iz objekta „B” i jedan humani izolat (2H) (tabela 5.7).

5.4 Rezultati antimikrobne osetljivosti izolata *Campylobacter* spp. prema antimikrobnim lekovima primenom disk difuzione metode

Osetljivost izolata *Campylobacter* spp. na odabrane antimikrobne lekove je ispitana disk difuzionom metodom po Kirbi Bauer-u. U tabeli 5.8 dati su rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Campylobacter* spp. na antimikrobne lekove dobijeni disk difuzionom metodom.

Tabela 5.8. – Rezultati ispitivanja antimikrobne osetljivosti *Campylobacter* spp. izolata dobijeni disk difuzionom metodom

Antimikrobni lekovi	Osetljiv (senzitiv)		Intermedijerno		Rezistentan	
	broj	%	broj	%	broj	%
Ciprofloksacin	13	14,61	23	25,84	53	59,55
Nalidiksinska kiselina	29	32,58	-	-	60	67,42
Tetraciklini	22	24,72	13	14,61	54	60,67
Eritromicin	44	49,44	10	11,24	35	39,33
Gentamicin	71	79,78	6	6,74	12	13,48

Izolati *Campylobacter* spp. poreklom sa trupova živine pokazivali su visoku osetljivost prema gentamicinu (79,78%), dok je osetljivost prema eritromicinu iznosila 49,44%, nalidiksinskoj kiselini 32,58%, tetraciklinima 24,72%, a prema ciprofloksacinu 14,60%.

Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Campylobacter jejuni* na antimikrobne lekove, dobijeni disk difuzionom metodom, dati su u tabeli 5.9.

Tabela 5.9. – Rezultati ispitivanja antimikrobne osetljivosti *Campylobacter jejuni* izolata dobijeni disk difuzionom metodom

Antimikrobni lekovi	Osetljiv (senzitiv)		Intermedijerno		Rezistentan	
	broj	%	broj	%	broj	%
Ciprofloksacin	6	17,14	12	34,29	17	48,57
Nalidiksinska kiselina	17	48,57	-	-	18	51,43
Tetraciklini	8	22,86	6	17,14	21	60,00
Eritromicin	15	42,86	6	17,14	14	40,00
Gentamicin	30	85,71	0	-	5	14,29

Najveći broj izolata *Campylobacter jejuni* poreklom sa trupova živine pokazivali su visoku osetljivost prema gentamicinu (85,71%), dok je osetljivost prema nalidiksinskoj kiselini iznosila 48,57%, eritromicinu 42,86%, tetraciklinima 22,86%, a prema ciprofloksacinu 17,14%.

Rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Campylobacter coli* na antimikrobne lekove, dobijeni disk difuzionom metodom, dati su u tabeli 5.10.

Tabela 5.10. – Rezultati ispitivanja antimikrobne osetljivosti *Campylobacter coli* izolata dobijeni disk difuzionom metodom

Antimikrobni lekovi	Osetljiv (senzitiv)		Intermedijerno		Rezistentan	
	broj	%	broj	%	broj	%
Ciprofloksacin	1	3,45	8	27,59	20	68,97
Nalidiksinska kiselina	5	17,24	-	-	24	82,76
Tetraciklini	11	37,93	3	10,34	15	51,72
Eritromicin	18	62,07	2	6,90	9	31,03
Gentamicin	24	82,76	2	6,90	3	10,34

Najveći broj izolata *Campylobacter coli* poreklom sa trupova živine pokazivali su visoku osetljivost prema gentamicinu (82,76%) i eritromicinu (62,07%), dok je osetljivost prema tetraciklinima iznosila 37,93%, nalidiksinskoj kiselini 17,24%, a prema ciprofloksacinu 3,45%.

Izolati *Campylobacter jejuni* su pokazivali najveću rezistenciju prema tetraciklinima (60,00%), zatim prema nalidiksinskoj kiselini (51,43%) i ciprofloksacinu (48,57%), dok je rezistencija prema eritromicinu iznosila 40,00%, a prema gentamicinu 14,29% (tabela 5.9). Izolati *C. coli* su pokazivali najveću rezistenciju prema nalidiksinskoj kiselini (82,76%), zatim prema ciprofloksacinu (68,97%) i tetraciklinima (51,72%), dok je rezistencija prema eritromicinu iznosila 31,03%, a prema gentamicinu 10,34% (tabela 5.10).

Od ispitivanih izolata *C. jejuni* 14,29% bilo je osjetljivo na svih pet antibiotika (ciprofloksacin, nalidiksinsku kiselinu, tetraciklin, eritromicin i gentamicin), multirezistentnih je bilo 42,86%, a korezistentnih (rezistentnih na po dva antibiotika) bilo je na nalidiksinsku kiselinu i ciprofloksacin 14,29%, tetracikline i ciprofloksacin 8,57%, i na nalidiksinsku kiselinu i tetracikline 2,86% (tabela 5.11).

Kod izolata *C. coli* nije bilo izolata osjetljivih na sve ispitivane antibiotike, multirezistentnih je bilo 44,83%, a korezistentnih je bilo na nalidiksinsku kiselinu i ciprofloksacin 31,03%, a na tetracikline i ciprofloksacin 6,90% izolata. Nije bilo izolata koji su istovremeno bili rezistentni na nalidiksinsku kiselinu i tetracikline (tabela 5.11).

Tabela 5.11. – Rezultati ispitivanja osjetljivosti i rezistencije na pet antibiotika dobijenih disk difuzionom metodom

Izolati	Osjetljivi na sve ispitane antibiotike		Multirezistentni		Korezistencija					
					nalidiksinska kiselina i ciprofloksacin		tetraciklini i ciprofloksacin		nalidiksinska kiselina i tetraciklini	
	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%	broj	%
<i>C. jejuni</i> (N=35)	5	14,29	15	42,86	5	14,29	3	8,57	1	2,86
<i>C. coli</i> (N=29)	0	-	13	44,83	9	31,03	2	6,90	0	-

5.5 Rezultati antimikrobne osjetljivosti izolata *Campylobacter* spp. prema antimikrobnim lekovima primenom kvantitativnog disk difuzionog testa (E-testa)

Osetljivost 38 izolata *Campylobacter* spp., od čega 27 izolata *C. jejuni* i 11 izolata *C. coli*, je ispitana na odabrane antimikrobne lekove određivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija primenom kvantitativnog disk difuzionog testa (E-test, epsilometar test) uz interpretaciju MIK koncentracija prema EUCAST smernicama. U tabeli 5.12 dati su rezultati ispitivanja osjetljivosti izolata *Campylobacter* spp. na antimikrobne lekove dobijeni E-testom.

Tabela 5.12. – Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti *Campylobacter* spp. izolata dobijeni E-testom

Antimikrobni lekovi	Osetljiv (senzitiv)		Intermedijerno		Rezistentan	
	broj	%	broj	%	broj	%
Ciprofloksacin	4	10,53	13	34,21	21	55,26
Nalidiksinska kiselina	13	34,21	-	-	25	65,79
Tetraciklini	12	31,58	4	10,53	22	57,89
Eritromicin	20	52,63	5	13,16	13	34,21
Gentamicin	34	89,47	1	2,63	3	7,89

Izolati *Campylobacter* spp. poreklom sa trupova živine pokazivali su visoku osjetljivost prema gentamicinu (89,47%), dok je osjetljivost prema eritromicinu iznosila 52,63%, nalidiksinskoj kiselini 34,21%, tetraciklinima 31,58%, a prema ciprofloksacinu 10,53%.

Rezultati ispitivanja osjetljivosti 27 izolata *Campylobacter jejuni* na antimikrobne lekove dobijeni E-testom dati su u tabeli 5.13.

Tabela 5.13. – Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti *Campylobacter jejuni* izolata dobijeni E-testom

Antimikrobni lekovi	Osetljiv (senzitiv)		Intermedijerno		Rezistentan	
	broj	%	broj	%	broj	%
Ciprofloksacin	4	14,81	10	37,04	13	48,15
Nalidiksinska kiselina	12	44,44	-	-	15	55,56
Tetraciklini	7	25,93	4	14,81	16	59,26
Eritromicin	13	48,15	4	14,81	10	37,04
Gentamicin	24	88,89	0	-	3	11,11

Najveći broj izolata *Campylobacter jejuni* poreklom sa trupova živine pokazivali su visoku osjetljivost prema gentamicinu (88,89%), dok je osjetljivost prema eritromicinu iznosila 48,15%, nalidiksinskoj kiselini 44,44%, tetraciklinima 25,93%, a prema ciprofloksacinu 14,81%.

Rezultati ispitivanja osjetljivosti 11 izolata *Campylobacter coli* na antimikrobne lekove dobijeni E-testom dati su u tabeli 5.14.

Tabela 5.14. – Rezultati ispitivanja antimikrobne osjetljivosti *Campylobacter coli* izolata dobijeni E-testom

Antimikrobni lekovi	Osjetljiv (senzitiv)		Intermedijerno		Rezistentan	
	broj	%	broj	%	broj	%
Ciprofloksacin	0	-	3	27,27	8	72,73
Nalidiksinska kiselina	1	9,09	-	-	10	90,91
Tetraciklini	5	45,45	0	-	6	54,55
Eritromicin	7	63,64	1	9,09	3	27,27
Gentamicin	10	90,91	1	9,09	0	-

Najveći broj izolata *Campylobacter coli* poreklom sa trupova živine pokazivali su visoku osjetljivost prema gentamicinu (90,91%) i eritromicinu (63,64%), dok je osjetljivost prema tetraciklinima iznosila 45,45%, a prema nalidiksinskoj kiselini 9,09%, dok prema ciprofloksacinu nije utvrđena.

Izolati *Campylobacter jejuni* su pokazivali najveću rezistenciju prema tetraciklinima (59,26%), zatim prema nalidiksinskoj kiselini (55,56%) i ciprofloksacinu (48,15%), dok je rezistencija prema eritromicinu iznosila 37,04%, a prema gentamicinu 11,11% (tabela 5.13). Izolati *C. coli* su pokazivali najveću rezistenciju prema nalidiksinskoj kiselini (90,91%), zatim prema ciprofloksacinu (72,73%) i tetraciklinima (54,55%), dok je rezistencija prema eritromicinu iznosila 27,27%, a prema gentamicinu nije ni registrovana (tabela 5.14).

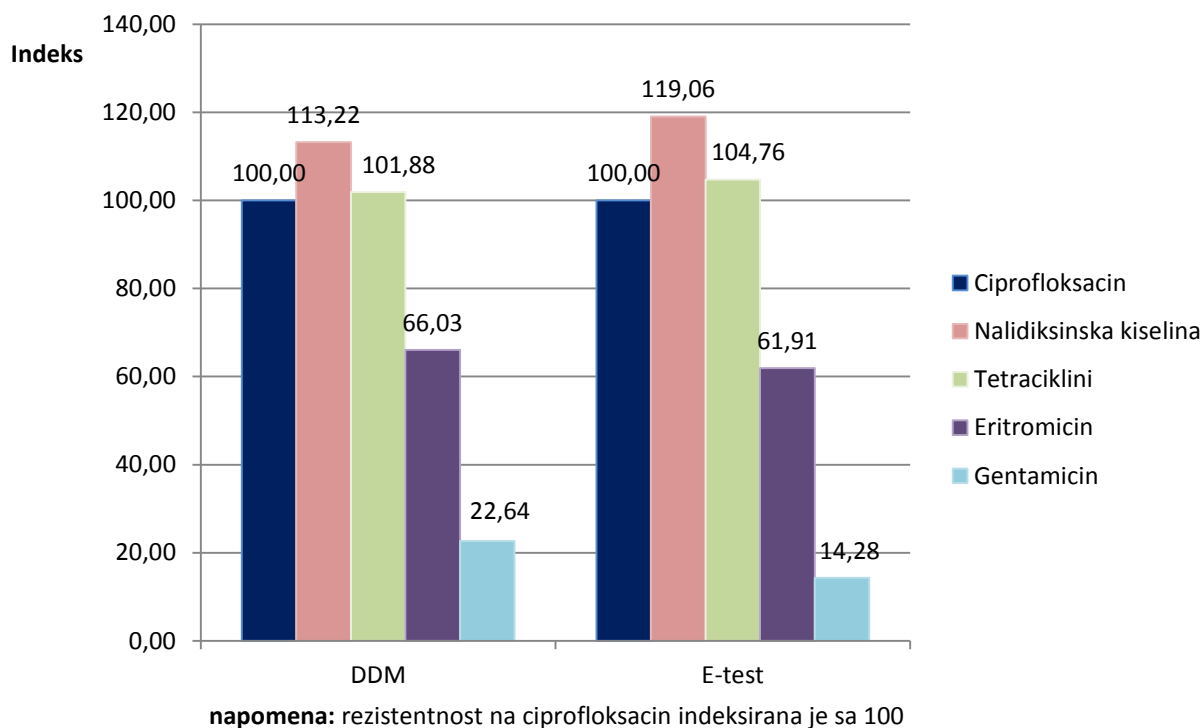
Tabela 5.15. – Uporedna analiza rezultata rezistentnosti kampilobakterija na odabrane antimikrobne lekove, dobijenih disk difuzionom metodom i E-testom

Antimikrobni lekovi	<i>Campylobacter spp.</i>		<i>Campylobacter jejuni</i>		<i>Campylobacter coli</i>	
	DDM (%)	E-test (%)	DDM (%)	E-test (%)	DDM (%)	E-test (%)
Ciprofloksacin	59,55	55,26	48,58	48,15	68,97	72,73
Nalidiksinska kiselina	67,42	65,79	51,43	55,56	82,76	90,91
Tetraciklini	60,67	57,89	60,00	59,26	51,72	54,55
Eritromicin	39,32	34,21	40,00	37,04	31,03	27,27
Gentamicin	13,48	7,89	14,29	11,11	10,34	0

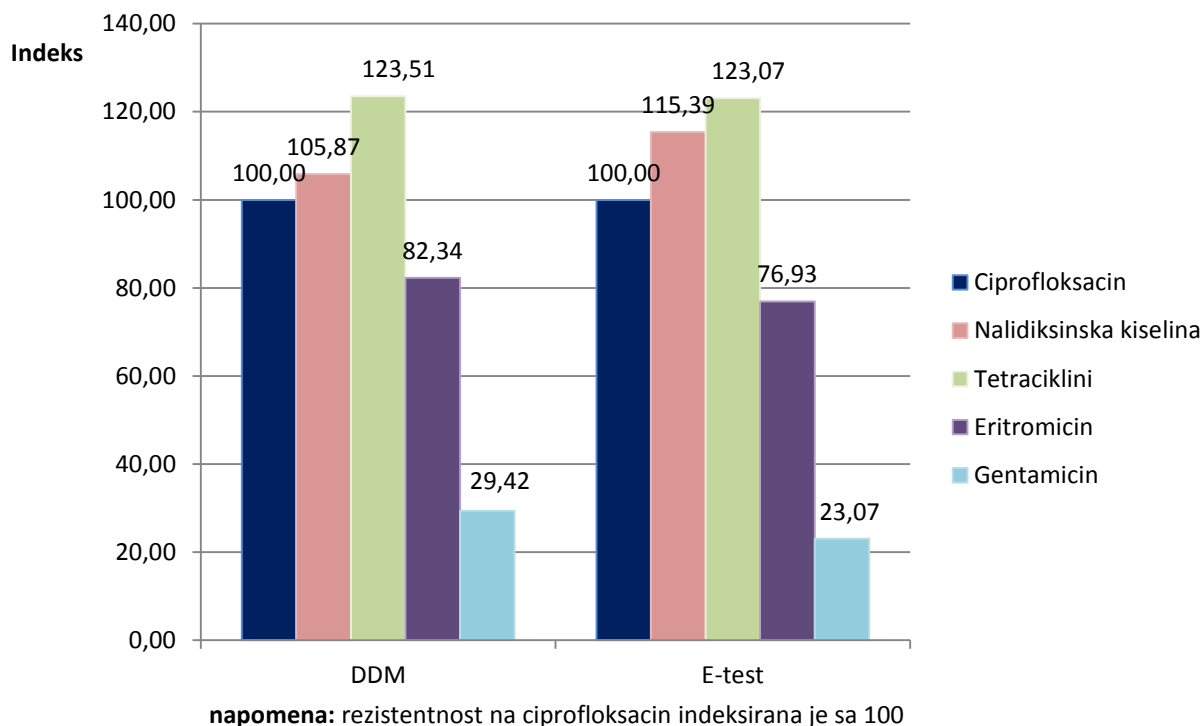
napomena: DDM – disk difuziona metoda

Uporedna analiza rezistentnosti *Campylobacter spp.* pokazuje da je učestalost nalaza rezistencije na svih pet antibiotika bila veća kada je korišćena disk difuziona metoda u odnosu na E-test. Disk difuzionom metodom je utvrđena i veća učestalost rezistentnosti *C. jejuni* kod četiri od pet antibiotika u odnosu na E-test. Veća učestalost utvrđena je upotrebom E-testa kod nalidiksinske kiseline u odnosu na disk difuzionu metodu. Veća učestalost rezistencije *C. coli* utvrđena je E-testom kod ciprofloksacina, nalidiksinske kiseline i tetraciklina, a manja kod eritromicina u odnosu

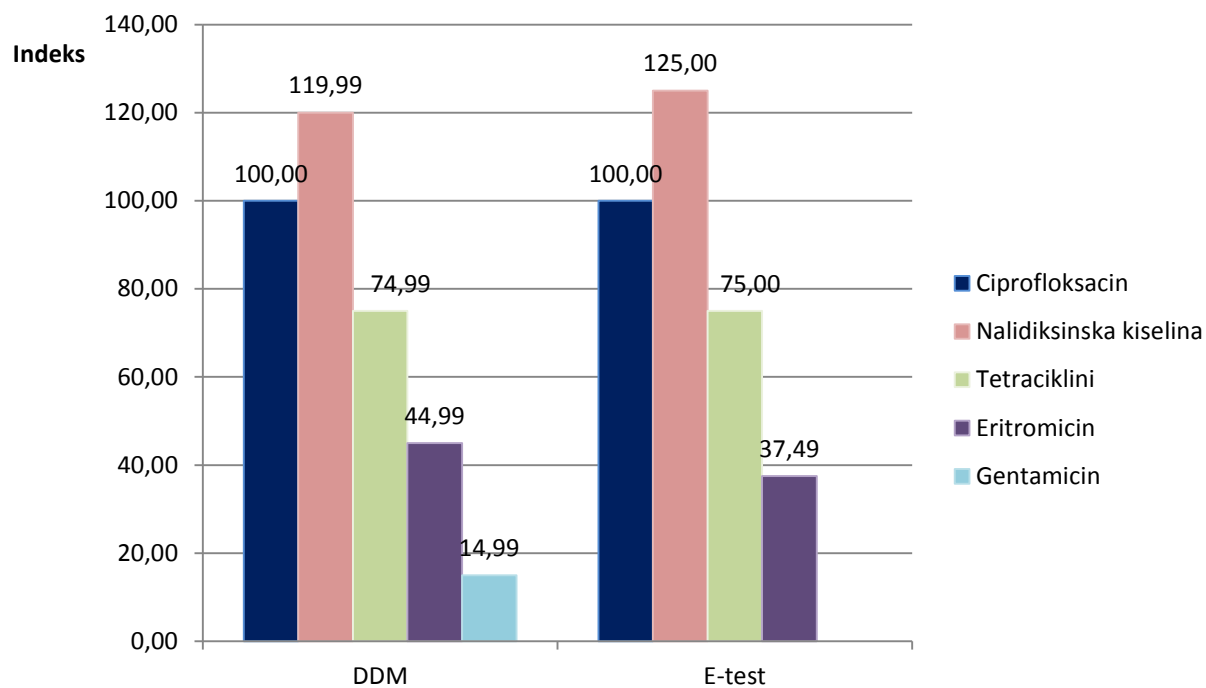
na disk difuzionu metodu. E-testom nije utvrđena rezistentnost *C. coli* kod gentamicina, a kod disk difuzione metode bila je 10,34% (tabela 5.15).



Grafikon 5.8. – Uporedna analiza rezistentnosti *Campylobacter* spp. na odabrane antimikrobne lekove dobijene disk difuzionom metodom (DDM) i E-testom



Grafikon 5.9. – Uporedna analiza rezistentnosti *Campylobacter jejuni* na odabrane antimikrobne lekove dobijene disk difuzionom metodom (DDM) i E-testom



napomena: rezistentnost na ciprofloksacin indeksirana je sa 100

Grafikon 5.10. – Uporedna analiza rezistentnosti *Campylobacter coli* na odabrane antimikrobne lekove dobijene disk difuzionom metodom (DDM) i E-testom

6. Diskusija

6.1 Kampilobakterioza ljudi i životinja

6.1.1 Kampilobakterioza ljudi

Prvo saopštenje o kampilobakterijama datira iz 1886. godine kada je Theodor Escherich opisao nekultivisane bakterije spiralnog oblika. Kasnije, 1927. godine bakterije izolovane iz fecesa goveda sa simptomima dijareje označene su kao *Vibrio jejuni*, a 1944. godine iz fecesa svinja sa simptomima dijareje izolovane su bakterije označene kao *Vibrio coli*. Međutim zbog svojih osobina (mikroaerofilnost, nefermentativnost) 1963. godine je predloženo da se rod *Campylobacter* izdvoji od roda *Vibrio* spp. Butzler i sar. (1973) su svojim radom o nalazu kampilobakterija kod ljudi sa simptomima dijareje ukazali na njihov značaj za zdravlje ljudi. Danas su kampilobakterije najčešći uzročnici gastroenteritisa kod ljudi u svetu. Brojne zemlje u poslednjih desetak godina ulažu ogromne napore da različitim merama, u svim fazama proizvodnje i prometa, smanje nivo kontaminacije hrane (mesa, pre svega) kampilobakterijama, ali bez značajnijih rezultata. Zbog visoke kontaminacije hrane bolesti prenosive hranom se najčešće povezuju sa kampilobakterijama, a oboljenje ljudi je jos uvek teško prevenirati (Nicorici i Ghodducci, 2017).

Campylobacter spp. je paradoksalan mikroorganizam. U hrani se ne razmnožava pri temperaturama ispod 30 °C, takođe ne i u vazduhu zbog prisustva kiseonika kao i u nedostatku vlage (optimalan a_w 0,997, ne raste ispod 0,987). Široko je rasprostranjen u živom svetu, ali se najčešće nalazi kod živine i divljih ptica jer su mu to domaćini sa najvišom temperaturom tela (Wieczorek i sar., 2015). Pored toga nalazi se i kod drugih domaćih i divljih životinja, nepasterizovanom mleku, plodovima voda i vodi (Anon, 2015a).

Izvor infekcije ljudi kampilobakterijama je najčešće meso živine 46%-77%, meso goveda, 19-31%, u nekim zemljama voda (8,4%), meso svinja (6%), a pominju se meso ovaca (2,3%) i životna sredina (bez bliže odrednice), psi, divlje ptice (Skarp i sar., 2016).

Kampilobakterijama se čovek najčešće zarazi preko životinja i proizvoda životinjskog porekla. Najčešće je izvor zaraze nedovoljna termička obrada mesa ili kros-kontaminacija između sirove i termički obrađene hrane. Ovo se uglavnom događa na mestu pripreme hrane, ako nisu striktno odvojeni postupci sa sirovom od postupaka sa gotovom (termički obrađenom) hranom. U 50% do 70% slučajeva kampilobakterioza ljudi je vezana za meso živine (Javid, 2019).

Infektivna doza koja se manifestuje simptomima kampilobakterioze kod ljudi je 1.000 do 10.000 bakterija. Kod zdravih osoba infektivna doza manja od 10.000 obično ne izaziva oboljenje,

ali kod imunokompromitovanih osoba (osobe sa slabim imunitetom) dovoljna je i doza od 500 bakterija pa da dođe do pojave bolesti (Javid, 2019).

Simptomi kampilobakterize se javljaju nekoliko dana posle konzumiranja kontaminirane hrane, a ispoljavljaju se kao abdominalni bol, jaka dijareja, a ponekad i kao povraćanje. Posle perioda inkubacije simptomi bolesti traju dva dana, a ponekad i do dve nedelje. Rizične grupe su osobe koje boluju od nekih hroničnih bolesti (reaktivni arthrititis, bolesti nervnog sistema). Oboleli gube tečnost i elektrorite, pa se to mora nadoknaditi odgovarajućim količinama tečnosti i elektrolitima.

Prema podacima Instituta za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, odnosno njegovog Centra za prevenciju i kontrolu bolesti, broj obolelih od kampilobakterioze bio je 2014. godine 451 (Anon, 2015d), 2015. godine 482 (Anon, 2016), a 2016. godine 581 (Anon, 2017). To govori o povećanju incidencije od 6,29/100.000 ljudi 2014. godine do 8,20/100.000 ljudi 2016. godine. Broj obolelih bio je 2018. godine 567 (incidencija 8,1/100.000 stanovnika). Kampilobakterioza je dijagnostikovana u 20 od 25 okruga, a najveći broj prijavljenih slučajeva oboljenja bio je 2018. godine u Beogradu i Južnobačkom okrugu, dok je najveća stopa incidencije bila u Severnobačkom okrugu. Najčešće oboleli su deca do četiri godine starosti (uzrasno specifična stopa incidencije 75/100.000 stanovnika), a zatim deca od 5 do 9 godina (25/100.000). Zabeležene su i sezonske varijacije broja obolelih, pa je tako najveći broj obolelih od aprila do septembra, a najmanji u periodu januar-mart (Anon, 2019).

Učestalost pojavljivanja kampilobakterioze kod ljudi prati se u pojedinim zemljama sveta. Tako u Velikoj Britaniji je kampilobakterioza najčešća bolest prenosiva hranom. Od nje oboli preko pola miliona ljudi u ovoj zemlji (gastroenteritis poznat kao kampilobakterioza). Godišnje se 72.000 slučajeva potvrdi laboratorijskim nalazom, a približno 100 slučajeva se završi smrtnim ishodom. (Anon, 2015b, Anon, 2015c).

Kampilobakterije su najfrekventniji zoonozni agens u EU budući da je 2017. godine zabeleženo 246.158 slučajeva kampilobakterioze. Broj registrovanih oboljenja je veći u odnosu na prethodne godine. Razume se da učestalost kampilobakterioze nije ista u svim zemljama što može da se zaključi iz činjenice da kontaminiranost trupova živine, kao glavnog izvora infekcije, znatno varira u zemljama članicama EU (od 5% do 100%) (EFSA, 2018a).

U SAD je zabeleženo 800 hiljada slučajeva kampilobakterioze kod ljudi (Bolinger i Kathariou, 2017). Kampilobakterioza je zabeležena širom sveta, ali sistematizovanih podataka o njenoj učestalosti kod ljudi je veoma malo, naročito u nerazvijenim i zemljama u razvoju. U razvijenim zemljama učestalost kampilobakterioze ljudi je 4,4 do 9,3 obolela na 1.000 stanovnika (WHO, 2013). Na Novom Zelandu je zabeležena najveća nacionalna učestalost kampilobakterioze u

maju 2006. godine kada je obolelo 400 ljudi na 100 hiljada stanovnika, što je rezultiralo donošenjem nacionalne strategije za sprečavanje kampilobakterioze (Baker i sar., 2006). Navedena mera je dala rezultate i učestalost kapilobakterioze bila je znatno manja već naredne dve godine (Jeffs, 2019). Infekcija kampilobakterijama nije vezana za rasu, češća je kod muškaraca nego kod žena, a takođe je učestalija kod dece nego kod odraslih osoba. U SAD je 2010. godine kampilobakterioza zabeležena kod dece mlađe od pet godina u 24,4 slučaja na 100 hiljada stanovnika (Anon, 2011). U zemljama u razvoju kampilobakterioza je vrlo česta kod dece mlađe od pet godina. Tako, u Bangladešu 38% dece mlađe od dve godine je asimptomski inficirano kampilobakterijama (Javid, 2019).

Kampilobakterije su utvrđene kod ljudi i životinja širom sveta, a naročitu opasnost za javno zdravlje imaju u nerazvijenim i zemljama u razvoju. U ovim zemljama stanovništvo je često podhranjeno, naročito deca. U Podsaharskoj Africi umre godišnje 3,8 miliona dece starosti do pet godina, od čega jedna četvrtina od bakterijskih dijareja, a među njima je kampilobakterioza (Kotloff i sar., 2012). Ispitivanja u Aziji, Latinskoj Americi i Africi pokazuju da su kampilobakterije najučestaliji patogen kod dece budući da je utvrđen kod dece u 84,95% slučajeva (ispitivanja na 1892 deteta) što ima za posledicu i povećanje učestalosti dijareja pa i smrtnih ishoda (Amour i sar., 2016; Platts-Mills i sar., 2015). U Senegalu je kod 65% brojlera utvrđeno prisustvo kampilobakterija, a u Južnoj Africi u ruralnim sredinama kod 68% brojlera, a u zatvorenim sistemima držanja kod 47% brojlera. (Bester i Essack, 2012).

6.1.2 Izvori infekcije kampilobakterijama

Kampilobakterije se nalaze u digestivnom traktu, usnoj šupljini i reproduktivnim organima mnogih toplokrvnih životinja kao i kod ljudi. U najvećem broju slučajeva njihovo prisustvo je kod domaćina asimptomatsko, ali se izlučuju fecesom pa se otuda mogu naći u životnoj sredini (otpadne vode) (Spicker, 2013). Domaće i divlje ptice su najčešći rezervoar ove bakterije i najčešći njeni prenosioci na ljude. Danas se kampilobakterioza ljudi najčešće vezuje za meso živine, naročito brojlera (piladi), a visoka učestalost kampilobakterioze nije samo posledica česte kontaminacije mesa živine ovom bakterijom već i činjenica da je zadnjih godina potrošnja mesa živine u svetu porasla i da je veća od potrošnje mesa svinja (Skarp i sar., 2016). Infektivna doza kampilobakterija je mala, svega nekoliko stotina ćelija, a simptomi bolesti se ispoljavaju za jedan do deset dana (Humphrey i sar., 2007).

Dobro je poznato da je živina najčešći uzročnik kampilobakterioze i da kampilobakterioza nastaje kao posledica konzumiranja kontaminiranog mesa živine. Kontaminacija mesa živine vezuje se za procese klanja i obrade trupova živine u klanici. Najčešće se trupovi kontaminiraju sadržajem

digestivnog trakta prilikom evisceracije. Sam postupak obrade trupa je kompleksan, brz i vrlo često danas u velikoj meri automatizovan što pruža znatnu mogućnost kontaminacije trupa kampilobakterijama. To zahteva striktnu primenu dobre proizvođačke prakse što doprinosi zaštiti javnog zdravlja. Ima mišljenja da se limitom od 1000 CFU/g bakterija rizik po javno zdravlje umanjuje za više od 50% (Wieczorek i sar., 2015). Za kampilobakterije je poznato da imaju malu infektivnu dozu pa se u nekim zemljama kontaminiranost tupova kategoriše prema broju bakterija (CFU/g). Tako u V. Britaniji postoje tri kategorije trupova. Preko 1.000 CFU/g; 100-1000 CFU/g i ispod 100 CFU/g (Anon, 2015c). Ova klasifikacija koju je uradila FSA (V. Britanija) ima za cilj da smanji broj klanica kod kojih je nivo kontaminacije kampilobakterijama veći od 1000 CFU/g. Od ukupnog broja klanica 2008. godine 27% je bilo sa brojem kampilobakterija većim od 1000 CFU/g, da bi se taj broj klanica smanjio na 10% krajem 2015. godine. Zbog toga je urađen program koji se odnosio na ceo lanac proizvodnje mesa živine od farme do trpeze (Program poznat kao "Acting on *Camylobacter Together*" (Anon, 2015a).

Kampilobakterije se unutar farme živine (brojlara) brzo prenose između jedinki čemu doprinose uslovi gajenja (gustina naseljenosti, vlažnost prostirke), pa nije iznenađenje da sve jedinke budu nosioci ove bakterije, koja se uglavnom nalazi u cekumu. Nalaz kampilobakterija kod živine ne znači i pojavu karakterističnih simptoma kampilobakterioze, pa ni uticaj na proizvodne rezultate. Obzirom da kod životinja (živine) nema znakova bolesti one se na kraju tova upućuju na klanje (Collet, 2012; Torok i sar., 2009). Savremene klanice za živinu su u velikoj meri automatizovane, visoko produktivne, o čemu govori podatak o mogućnosti da se tri trupa obrade u jednoj sekundi. Tako intenzivan proces može ponekad da ima za posledicu bakterijsku kontaminaciju trupova, pre svega kampilobakterijama. Najčešće je uzrok kontaminacije trupova uzrokovana prosipanjem sadržaja digestivnog trakta i kontaktima između trupova. Klanje živine i obrada trupova je serijski proces sa brojnim mogućnostima kros-kontaminacije u različitim tačkama proizvodnog procesa ne samo kontaktom između trupova već i kontaktom sa kontaminiranom opremom (Facciola i sar., 2017). Kontaminacija trupova brojlera može da bude veoma visoka (više od 10^3 CFU/g), što ima značaj za javno zdravlje i potrebu da se zaštiti potrošač. Zbog toga je neophodno da se smanji kontaminiranost trupova (Lindqvist i Lindblad, 2008).

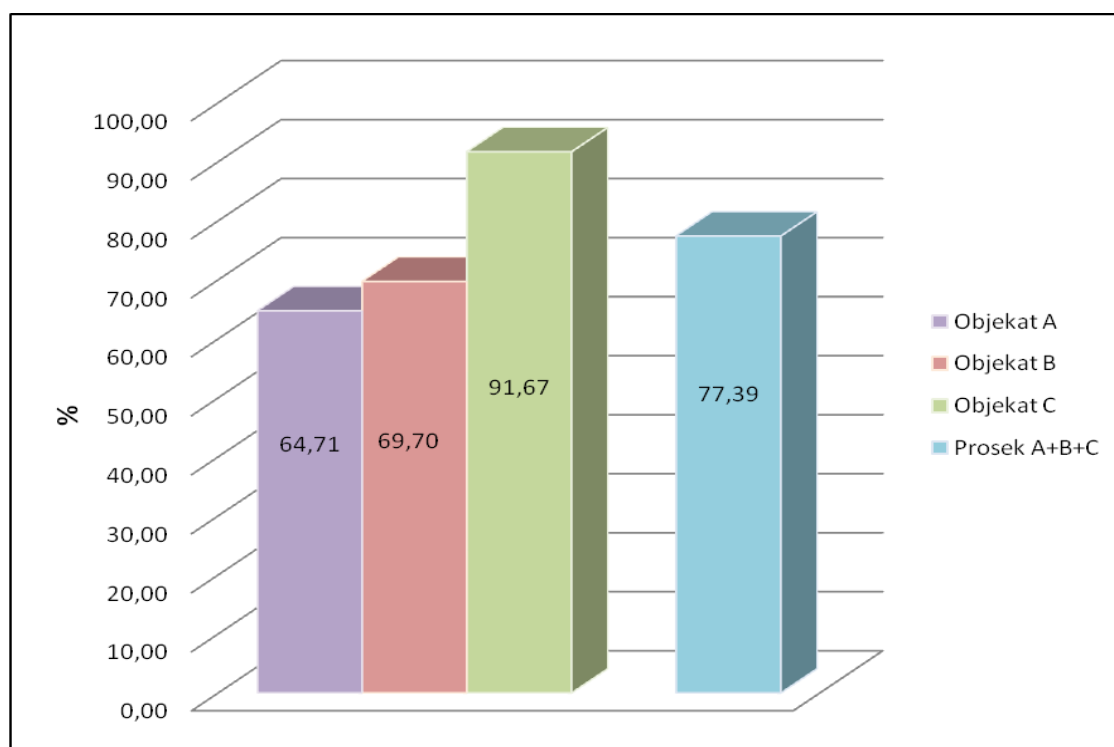
U klanici je moguća kros-kontaminacija između različitih jata živine i da bi se to izbeglo pri redosledu klanja prvo treba klati jato koje nije ili je manje zaraženo, a zatim ostala jata tako da se jato koje je najzaraženije kolje poslednje. Za dobijanje podataka o zaraženosti jata neophodno je koristiti brze metode detekcije i kvantifikacije kampilobakterija, kao što je to PCR (De Boer i sar., 2015).

6.1.3 Učestalost nalaza kampilobakterija kod živine

Lanac proizvodnje mesa počinje u primarnoj proizvodnji, odnosno na farmama velikih i malih proizvođača, transporta do klanice, klanja životina i obrade trupa, a zatim rasecanje trupa i usmeravanja delova trupa u veliko i maloprodaju ili u preradu. Proizvodi od mesa takođe idu u veliko i maloprodaju. Meso i proizvodi od mesa završavaju kod potrošača bilo u domaćinstvima bilo u restoranima (restorani društvene ishrane, ugostiteljstvo). U čitavom ovom lancu proizvodnje postoji manja ili veća mogućnost kontaminacije mesa i proizvoda od mesa kampilobakterijama, naročito kad se radi o mesu i proizvodima od mesa živine. Veća učestalost nalaza kampilobakterija na farmama rezultira i većom kontaminacijom trupova u klanici (Skarp i sar., 2016). Proizvodnja i promet mesa nisu na identičan način organizovani u svim zemljama sveta pa čak ni unutar jedne države, pa se to odražava i na nalaz kampilobakterija na farmama (u jatu) u klanici i prometu. Otuda su i podaci o učestalosti kampilobakterioze ljudi u različitim zemljama sveta veoma različiti. Razume se da učestalost pojavljivanja kampilobakterioze zavisi i od obima potrošnje mesa živine, načina i običaja pripreme itd (Skarp i sar., 2016). Prema podacima EFSA (EFSA, 2015) iz 2013. godine u zemljama EU učestalost pojave kampilobakterioze kod ljudi na 100 hiljada stanovnika bila je od 28,9 (Estonija) do 104 V. Britanija. U SAD je ta učestalost u 2014. godini, na isti broj stanovnika, bila 13,5, u Kanadi (2012. godine) 29,3, u Australiji (2010. godine) 112,3 i na Novom Zelandu (2013. godine) 152,9 (McCarthy i sar., 2012; Strachan i sar., 2013; Spencer i sar., 2012; Mason i sar., 2013). Na učestalost nalaza kampilobakterija na farmi utiču brojni faktori (gustina jata, godišne doba, starost brojlera, opšti zdravstveni status, mortalitet, biosigurnosne mere itd). Transport ne utiče značajno na status kampilobakterija, izuzev ako duže traje. Tokom obrade trupa nakon klanja brojlera kontaminacija trupova može da bude veoma izražena, naročito na mestu evisceracije i prosipanja sadržaja digestivnog trakta (Skarp i sar., 2016). Učestalost kontaminacije mesa živine u prometu je veoma varijabilna u zemljama EU, pa je tako u Austriji, Francuskoj i Španiji 70% i veća, Poljskoj i Sloveniji 50% i 54% (pojedinačno) a najmanja u Finskoj, 11% (Scarp i sar., 2016).

Najučestaliji nalaz *Campylobacter* spp. utvrđen je na trupovima živine zaklanih u objektu „C” (91,67% kontaminiranih trupova) i to može da ima više različitih uzroka, počevši od toga da se možda radi o jatu koje je u većoj meri inficirano od živine koja se klala u objektima „A”, odnosno „B” (tabela 5.2 i grafikoni 5.2 i 6.1). Međutim, verovatnije je da je uzrok veće učestalosti kontaminacije trupova živine zaklane u objektu „C” vezan za higijenske uslove u toku obrade trupova, odnosno za uslove u pojedinim fazama i operacijama obrade trupa. U manjim objektima često se u praksi trupovi posle evisceracije i pranja potapaju u bazene sa vodom gde se zadržavaju duže ili kraće vreme iza čega se postavljaju na kolica i odvoze na hlađenje. Proces obrade trupa je

prema tome diskontinuiran i vreme od evisceracije do hlađenja je sasvim sigurno duže nego kod industrijskih klanica. Rezultati ovog dela ispitivanja prikazani su u tabeli 5.2, grafikonu 5.2 i grafikonu 6.1. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da je učestalost nalaza *Campylobacter* spp. (77,39%) veća nego što je to prosečno za Evropsku Uniju (46,70%) (EFSA, 2016), ali je činjenica da u EU učestalost nalaza *Campylobacter* spp. značajno varira u različitim zemljama članicama EU.



Grafikon 6.1. – Učestalost nalaza *Campylobacter* spp. na trupovima živine sa različitih klanica

Nalaz kampilobakterija u mesu živine (trupovima) u svetu je veoma varijabilan, pa je u zemljama EU od 4,9% do 100% (EFSA, 2010), prosečno za Evropu 2015. godine 46,7% (EFSA, 2016). Rezultati iz Senegala i Južne Afrike govore da je učestalost nalaza na trupovima živine 73,1%. U Podсахarskoj Africi učestalost je 81,9% kod brojlera zaklanih u klanicama, a u Nigeriji kod brojlera u prometu 100%, a u supermarketima Južne Afrike od 10% do 100% (Mbewe i sar., 2014).

Prema istraživanjima Sakridisa i sar. (2019), od 50 ispitanih trupova brojlera kampilobakterije su utvrđene kod 49 (98%) trupova. Utvrđene su i na opremi, kao i na rukama radnika (samo po pet briseva sa pet mesta). Učestalost nalaza u ovoj studiji je daleko veća nego što je to prikazano u sumarnom prikazu za EU u 2017. godini kada je učestalost bila 37,4% (EFSA, 2018a). Ovo i slična saopštenja ukazuju da je kontaminiranost trupova brojlera različita u različitim zemljama EU (Italija 5,7% i 20,7%, Francuska 64,7%, UK 65%, Belgija 51,9%, Estonija 35%)

(EFSA, 2018a). U ranijim studijama u Grčkoj učestalost nalaza kampilobakterija na trupovima živine bila je manja (Sakaridis i sar., 2019).

Prevalencija kampilobakterija u jatima živine je od 35% do 90%. Nalazi na trupovima živine u klanici od pozitivnih jata su i do 80% (Hofshagen i sar., 2011; Colles i sar., 2010). Istraživanja takođe pokazuju da je u maloprodaji nalaz kampilobakterija u mesu živine od 90% do 100% i to u nekoliko zemalja u svetu (Moran i sar., 2009; Suzuki i Yamamoto, 2009).

Nicorici i Ghoddusi (2017) su ispitivali broj kampilobakterija u uzorcima živine (vrat, leđa, jetra) iz četiri supermarketa i četiri iz lokalne prodavnice mesa. Između broja kampilobakterija u uzorcima iz četiri supermarketa, odnosno između broja kampilobakterija u uzorcima četiri lokalne prodavnice nisu bile statistički značajne razlike. Međutim, razlika između broja kampilobakterija u uzorcima živine iz supermarketa i onih iz lokalnih prodavnica bila je značajna (741 CFU/g supermarketi i 6.918 CFU/g lokalne prodavnice). U uzorcima jetre iz lokalnih prodavnica broj kampilobakterija bio je 1.349 CFU/g, a supermarketa 525 CFU/g. Ove razlike rezultat su mnogo boljih higijenski uslova u supermarketima, u odnosu na higijenu u lokalnim prodavnicima. Pri redukciji broja kampilobakterija za dva logaritma značajno se smanjuje učestalost pojave kampilobakterioze kod ljudi. Prema podacima istih autora broj kampilobakterija veći od 1000 CFU/g bio je kod 44% uzoraka kože vrata, 41% uzoraka kože leđa i 52% uzoraka jetre. Broj kampilobakterija između 100 i 1000 CFU/g utvrđen je kod 34% uzoraka kože vrata, 22% uzoraka kože leđa i 32% uzoraka jetre, dok je broj kampilobakterija manji od 100 CFU/g utvrđen kod 22% uzoraka kože vrata, 37% uzoraka kože leđa i 16% uzoraka jetre.

Di Giannatale i sar. (2019) u obimnoj studiji saopštavaju o učestalosti nalaza kampilobakterija u mesu živine i goveda. Ispitana su 1243 uzorka mesa brojlera od čega je 578 bilo uzoraka bataka i 665 uzoraka grudi. Učestalost nalaza kampilobakterija bila je u mesu bataka 21,80%, a grudi 23,53% (u proseku 17,38%). Pored toga ispitana su i 1203 uzorka goveđeg mesa, a učestalost nalaza kampilobakterija bila je svega 0,58%.

Nalaz kampilobakterija u mesu živine zavisi od brojnih faktora, pa i načina obrade rasečenih delova trupa. Meso bataka sadrži veći broj kampilobakterija od mesa grudi, a meso grudi sa kožom sadrži uvek veći broj kampilobakterija od mesa grudi bez kože (Di Giannatale i sar., 2019).

U svojim istraživanjima Han i sar. (2016) govore o vezi između starosti brojlera i učestalosti nalaza kampilobakterija. Jednodnevni brojleri su inficirani kampilobakterijama i toga dana u fecesu njihov broj je bio i najveći, a najmanji je bio 22. dana (veći nego 31. dana) što se objašnjava razvojem imunog sistema. Starost kod inficiranih životinja ima značajan efekt na broj limfocita i ekspresiju citokina u cekumu kao i na sastav mikroflore digestivnog trakta, pa i na kolonizaciju kampilobakterija.

6.1.4 Sprečavanje kontaminacije trupova živine

Ispitivanja su pokazala da postoji zavisnost između nivoa higijene u klanici i nivoa kontaminacije trupova živine. Poboljšanjem uslova u toku izvođenja operacija obrade trupa u klanici se značajno redukuje nivo kontaminacije trupa. Ovo ukazuje na veliki značaj striktnog poštovanja principa dobre proizvođačke prakse u toku obrade trupova, što doprinosi osiguranju javnog zdravlja (Zweifel i sar., 2015).

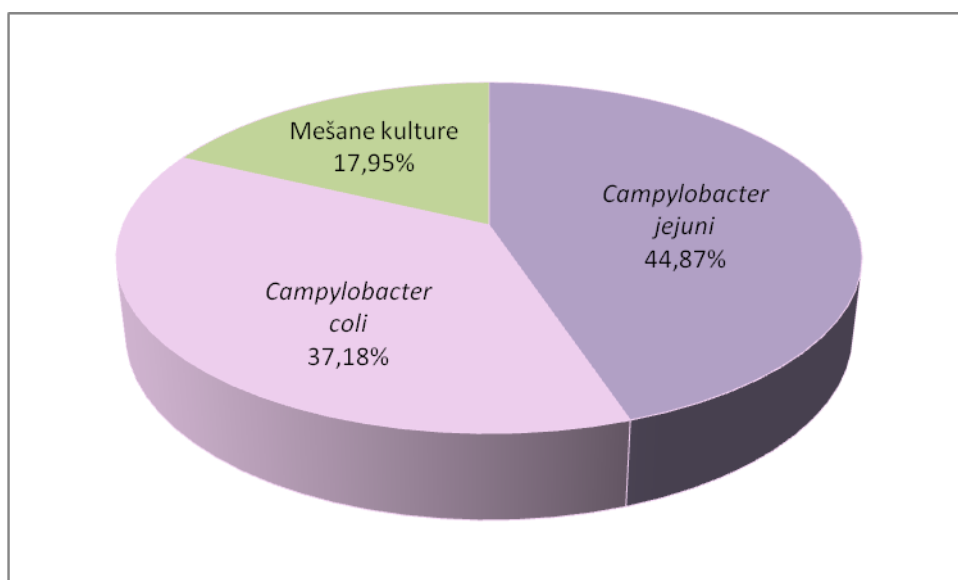
Ispitivanja Boltona (2015) pokazuju da su *Campylobacter* spp. delimično osetljive na isušivanje i da do njihove redukcije dolazi na površini trupova svinja, jagnjadi i goveda zbog toga što se trupovi hlade u struji vazduha. Trupovi živine se hlade vlažnim postupkom, a vlažna površina omogućava preživljavanje kampilobakterija. Ovo potvrđuju i nalazi Seliwiorstowa i sar. (2015) koji su utvrdili da se imerzionim načinom hlađenja ne smanjuje broj kampilobakterija na trupovima živine. Međutim ako se trupovi hlade vazdušno dolazi do značajnog smanjenja broja kampilobakterija na površini trupova, naročito ako hlađenje traje duže vreme.

U V. Britaniji FSA je opisala alterativni metod hlađenja trupova živine prskanjem kiselim rastvorom natrijum hlorita i limunske kiseline kojim se nivo kontaminacije trupova kampilobakterijama smanjuje za 2,1 logaritama (Anon, 2015b). Upotreba hlorisane vode sa koncentracijom većom od one koja se koristi u vodi za piće u EU nije dozvoljena. Zbog toga je FSA sugerisala striktnu kontrolu proizvodnog procesa kako na farma tako i klanicama zasnovanoj na dobroj proizvođačkoj i dobroj higijenskoj praksi (GMP, GHP) (Allen i sar., 2007).

6.2 *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* u mesu živine

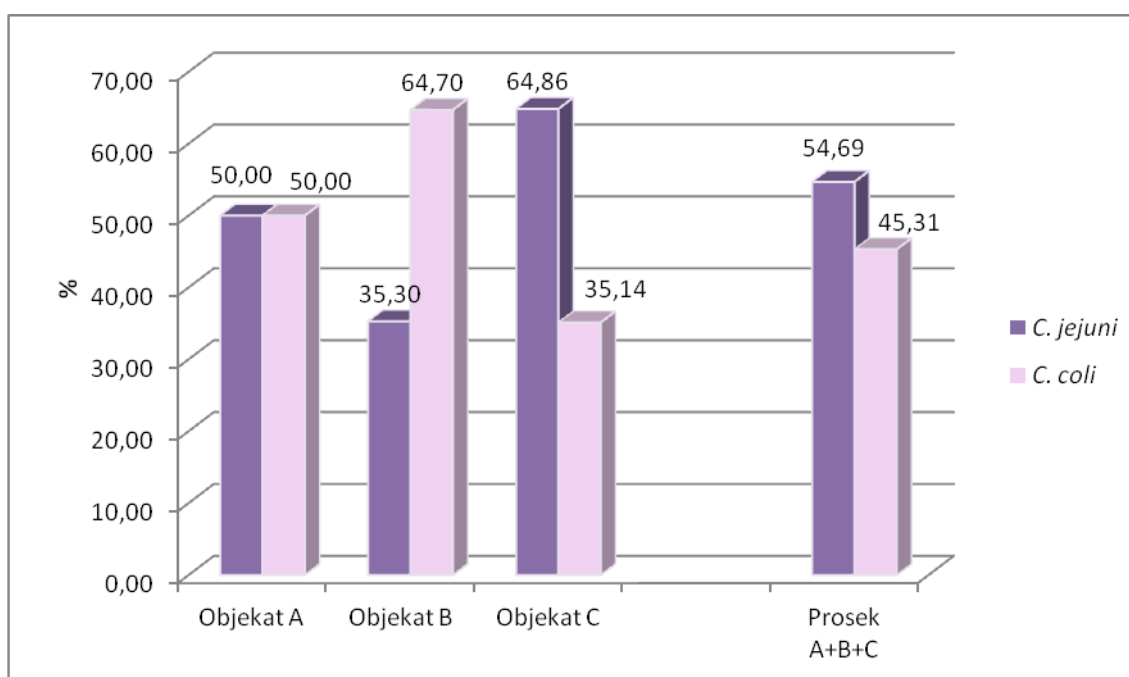
Kampilobakterije su najčešći uzročnik bakterijskog gastroenteritisa u EU. Najčešće patogene vrste *C. jejuni* i *C. coli* bile su uzročnik 245.658 slučajeva kampilobakterioze u EU u 2016. godini, što je bilo više od oboljenja izazvanih sa *E. coli*, *Salmonella* i *Listeria* (Mourkas i sar., 2019). Prema podacima EFSA (EFSA, 2011) 80,6% izolata kampilobakterija je potvrđeno kao *C. jejuni*, a 7,1% kao *C. coli*. Zbog toga je i prilagođena nova bakteriološka podloga koja omogućava razlikovanje ove dve bakterije. Tradicionalne mikrobiološke metode za detekciju i kvantifikaciju bakterija zbog svojih nedostaka se sve više napuštaju, pa se prednost daje bržim i sigurnijim metodama kao što je to PCR (De Boer i sar., 2015; Linton i sar., 1996; Wang i sar., 2002).

Naši rezultati pokazuju da je učestalost *Campylobacter jejuni* (44,87%) veća od učestalosti nalaza *Campylobacter coli* (37,18%) na trupovima živine. Učestalost nalaza mešanih kultura je 17,95% (grafikon 6.2). U literaturi ima različitih podataka o učestalosti nalaza dve najčešće vrste *Campylobacter* spp. (*Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*).



Grafikon 6.2. – Identifikacija izolata *Campylobacter* spp. sa trupova živine

Sekvencioniranje izolata *Campylobacter* spp. ukazuje na jednaku zastupljenost izolata *C. jejuni* i *C. coli* u objektu „A”, veću zastupljenost *C. coli* u objektu „B”, kao i veću zastupljenost *C. jejuni* u objektu „C”. Ukoliko gledamo sva tri objekta *C. jejuni* bio je zastupljen sa 54,69%, a *C. coli* sa 45,31% (tabela 5.4 i grafikon 6.3).



Grafikon 6.3. – Sekvenciranje izolata *Campylobacter* spp.

U industrijski razvijenim zemljama *C. jejuni* je najčešće izolovana vrsta kampilobakterija kod ljudi sa simptomima dijareje, a zatim je to *C. coli* (Scallan i sar., 2015; Scallan i sar., 2011). Studijama je utvrđeno i da druge vrste kampilobakterija (*C. hyoinintestinalis* i *C. concious*) mogu

da uzrokuju dijareje naročito kod dece (François i sar., 2018; Platts-Mills i sar., 2014). Schiaffino i sar. (2019) su od marta 2010. do februara 2016. godine analizirali 10.008 uzoka fecesa dece bez dijareje, 3.174 uzorka fecesa dece sa dijarejom i 22 uzorka fecesa dece čiji status nije bio defisan. Dobijeno je 970 izolata *Campylobacter* spp. od čega su 664 (6,6%) izolata bila od dece bez dijareje, a 252 (7,9%) izolata od dece sa dijarejom. Samo jedan izolat (4,5%) poticao je od dece sa nedefinisanim statusom u pogledu dijareje. *C. jejuni* utvrđen je u 596 (65,0%) uzoraka, od čega je 169 (28,4%) uzoraka bilo od dece sa dijarejom. Utvrđeno je da je 321 (35%) uzorak pripadao drugim vrstama kampilobakterija (non-*C. jejuni*) od kojih su 83 (25,9%) bili od dece sa dijarejom.

Od kampilobakterija najzastupljenije vrste su *C. jejuni*, *C. coli* i *C. lari* i to su vrste najčešći uzročnici kampilobakterioze kod ljudi (Vencia i sar., 2014). *C. jejuni* uzrokuje 80-90%, a *C. coli* 5-10% oboljenja ljudi (Maćkiw i sar., 2012).

Od ispitanih izolata 49 (89,4%) je identifikovano (PCR) kao *C. coli*, četiri (6%) kao *C. jejuni*, a tri (4,6%) su pripadala ostalim vrstama kampilobakterija. Ovo je kontradiktorno većini podataka iz literature budući da je daleko češći nalaz na trupovima živine bio *C. jejuni* nego *C. coli*. Međutim, autori smatraju da je to posledica činjenice da su brisevi uzimani sa ohlađenog trupa (Sakaridis i sar., 2019).

Ispitivanja Mezhera i sar. (2016) pokazuju da je od 209 uzoraka mesa brojlera (pojedini delovi trupa) i proizvoda od mesa brojlera (hamburgeri, kobasice itd.) samo 5,7% bilo kontaminirano kampilobakterijama. Posmatrajući samo uzorke mesa brojlera učestalost nalaza kampilobakterija je bila je 6,8% (162 uzorka, 11 pozitivnih). Od 11 pozitivnih uzoraka sedam su bili *C. coli*, tri *C. jejuni*, a jedan uzorak nije bio diferenciran. Od 34 uzorka mesa ćuraka ni jedan nije bio kontaminiran kampilobakterijama. Učestalost nalaza kampilobakterija u uzorcima uzetim iz prometa bila je 6,4%, a uzoraka iz klanice 3,8% što govori da postupci rukovanja sa mesom u prometu povećavaju kontaminaciju mesa. Utvrđeno je da je kontaminacija kampilobakterijama upakovanog mesa ređa (2,7%) od kontaminacije neupakovanog mesa (10,7%). Prethodni rezultati o kontaminiranosti mesa živine u Italiji govore o značajno većoj kontaminaciji (Nobile i sar., 2013). Mezhera i sar. (2016) smatraju da je to rezultat poboljšanog nivoa higijene u klanicama. Odnos broja *C. jejuni* i *C. coli* u studiji Mezhera i sar. (2016) govori o većem učešću *C. coli*, što su u Italiji utvrdili i Nobile i sar. (2013). Uopšteno govoreći rezultati koji se odnose na učestalost nalaza *C. jejuni* i nalaza *C. coli* su u često protivurečni (Suzuki i Yamamoto, 2009).

Carron i sar. (2017) su u Nigeriji na malim farmama brojlera utvrdili da je učestalost nalaza kampilobakterija od 33% do 44%, a mesa u prometu u jednom delu zemlje 60%, a drugom 64%. Od ukupnog broja izolata (428) 63% je identifikovano kao *C. jejuni*.

Učestalost nalaza *Campylobacter* spp. kod brojlera i u mesu brojera u Maleziji ispitivali su Sinulingga i sar. (2020). Ispitano je 210 uzoraka uzetih od živih brojera (kloakalni bris) sa sedam farmi i 110 uzoraka mesa brojlera iz prometa (11 marketa i pet supermarketa). Izolacija bakterija rađena je na osnovu morfoloških osobina, ispitivanja pokretljivosti i biohemijskih testova, a potvrda identifikacije *Campylobacter* spp. PCR testom (mPCR). U 50,9% uzoraka briseva kloake brojlera i 26,6% uzoraka mesa brojlera utvrđeno je prisustvo *Campylobacter* spp. Najčešći je bio nalaz *C. jejuni* (69,5%), zatim, *C. coli* (16,2%), *C. fetus* (9,3%) i *C. upsaliensis* (2,5%).

Kanaan i Abdulwahid (2019) su iz prometa (supermarketi, Bagdad) uzeli 85 uzoraka mesa živine i to 45 uzoraka mesa brojlera i 40 uzoraka mesa ćuraka sa ciljem da ispituju učestalost nalaza kampilobakterija i njihovu rezistenciju na odabrane antibiotike. Od ukupno 85 uzoraka mesa u 54 (63,5%) utvrđeno je prisustvo *Campylobacter* spp., pri čemu je *C. jejuni* utvrđen u 37 (68,5%) uzoraka, a *C. coli* u 17 (31,5%) uzoraka mesa. U mesu brojlera učestalost nalaza *C. jejuni* bila je 81,5%, a *C. coli* 18,5%, dok je učestalost nalaza *C. jejuni* u mesu ćuraka bila 55,6%, a *C. coli* 44,4%. Ranije studije u Iranu pokazuju veću učestalost nalaza kampilobakterija u mesu živine (75% i 93,75%) ali u nekim drugim provincijama (Kanaan i Khashan, 2018; Abd i Al-Nasrawi, 2015).

6.3 Filogenetska srodnost izolata *Campylobacter* spp. sa trupova živine i izolata humanog porekla

Filogenetska srodnost između izolata *Campylobacter jejuni*, odnosno *Campylobacter coli* iz različitih objekata za klanje živine („A“, „B“, „C“) i izolata ovih bakterija humanog porekla (dva izolata *Campylobacter jejuni* i tri izolata *Campylobacter coli*) prikazana je tabelama 5.6, odnosno 5.7. Grafički prikaz srodnosti dat je grafikonima 6.4, odnosno 6.5.

Grana 1		Grana 2		Grana 3	Grana 4	Grana 5		Grana 6	
75	71	29	34	33	100	116	113	55	58
Grana 7		Grana 8		Grana 9		Grana 10	Grana 11	Grana 12	
31	105	315	212	57	114	1H	73	98	
Grana 13			Grana 14	Grana 15	Grana 16			Grana 17	
74	69	64	96	97	68	48	67	94	
Grana 18				Grana 19			Grana 20		
3H	35	77	72	95	92	93	32	30	
Legenda:									
Objekat A									
Objekat B									
Objekat C									
Humani izolati									

Grafikon 6.4. – Klasteri, subklasteri i grane izolata *Campylobacter jejuni*

Grana 1										Grana 2		
49	47	43	5H	38	40	44	4H	42	45	36	41	2H
Grana 3		Grana 4		Grana 5		Grana 6						
101	103	39		210		107	106	111				
Grana 7										Grana 8		
212	214	203	218	215	206	219	209	201	204	221	202	
Legenda:												
Objekat A												
Objekat B												
Objekat C												
Humani izolati												

Grafikon 6.5. – Klasteri, subklasteri i grane izolata *Campylobacter coli*

Iz datih grafikona uočava se češća srodnost između izolata *Campylobacter jejuni* iz različitih objekata nego što je ta srodnost izolata *Campylobacter coli* iz različitih objekata. Tako je srodnost utvrđena između po jednog izolata iz objekta „A“ i „B“ (grana 9), jednog izolata iz objekta „A“ i jednog izolata iz objekta „C“ (grana 7). Utvrđena je i srodnost između jednog izolata iz objekta „B“ i dva izolata iz objekta „C“ (grana 16) (grafikon 6.4).

Između izolata *Campylobacter coli* iz različitih objekata („A“, „B“, „C“) niti u jednom slučaju nije utvrđena srodnost (grafikon 6.5).

Između tri izolata *Campylobacter jejuni* i jednog humanog izolata (3H) utvrđena je srodnost (grana 18) (grafikon 6.4). Utvrđena je srodnost između osam izolata *Campylobacter coli* poreklom iz objekta „B“ i dva humana izolata *Campylobacter coli* (izolati 5H i 4H) (grana 1). Takođe je utvrđena srodnost između dva izolata *Campylobacter coli* iz objekta „B“ i jednog humanog izolata *Campylobacter coli* (izolat 2H) (grana 2) (grafikon 6.5).

O srodnosti izolata *Campylobacter* spp. iz različitih izvora ima podataka u literaturi. Filogenetska analiza omogućava u kliničkim slučajevima kampilobakterioze da se utvrde izvori infekcije, budući da je poznato da kampilobakterioze imaju različite domaćine, odnosno da mogu da potiču iz životne sredine (Dearlove i sar., 2016). Ovo je i način da se ustanovi filogenetska distribucija izolata *Campylobacter* spp. (Baig i sar., 2015). Prema nalazima Chukwu i sar. (2019) od osam grana *Campylobacter* spp. u četiri grane bili su srodni izolati poreklom iz vode i humani izolati. U tri grane bili su izolati humanog porekla, a u jednoj grani bio je izolat iz vode.

Asakura i sar. (2019) su ispitivanjima filogenetskog diverziteta i antimikrobne rezistencije 119 izolata *C. coli* zaključili da je meso živine i goveda glavni izvor infekcije kog ljudi u Japanu, mada to može da bude i meso svinja.

Rod *Campylobacter* brzo evolvira i sa brojnim potencijalom rekombinacije može da generiše niše specifičnih genotipova (Asakura i sar, 2019). To može da ima za posledicu različitu patogenost unutar vrste, da utiče na adaptabilnost kod domaćina, morfologiju ćelije, sposobnost stvaranja biofilma (Sheppard i Maiden, 2015; Esson i sar., 2016; Pascoe i sar., 2015).

Filogenetske analize pokazuju da je npr. ST-828 cc *C. coli* „odgovoran“ za najveći broj infekcija ljudi u zapadnim zemljama sveta i da je sličan (srodan) izolat utvrđen i u Japanu (Asakura i sar., 2019; Ioannidou i sar., 2013; Sheppard i sar., 2010).

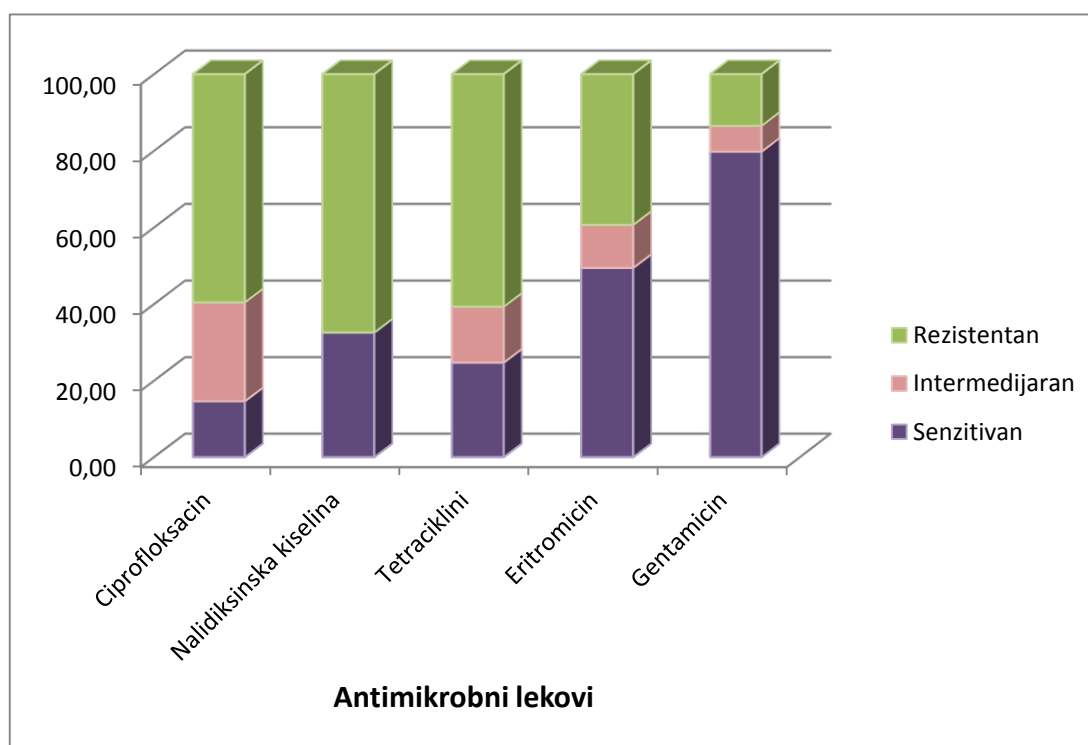
Izolat *C. coli* ST-860 nađen je kod ljudi i kod živine, a izolat *C. coli* ST-1068 kod goveda i ljudi. Prema podacima u bazi *Campylobacter* MLTS (29. juli 2018) ukupno 118 sojeva ST-860 je

deponovano, od čega je 27 iz Japana i potiču iz mesa živine ili su humanog porekla. Ovaj soj (ST-860) je često utvrđen u Luksemburgu (Asakura i sar., 2019; Mossong i sar., 2016).

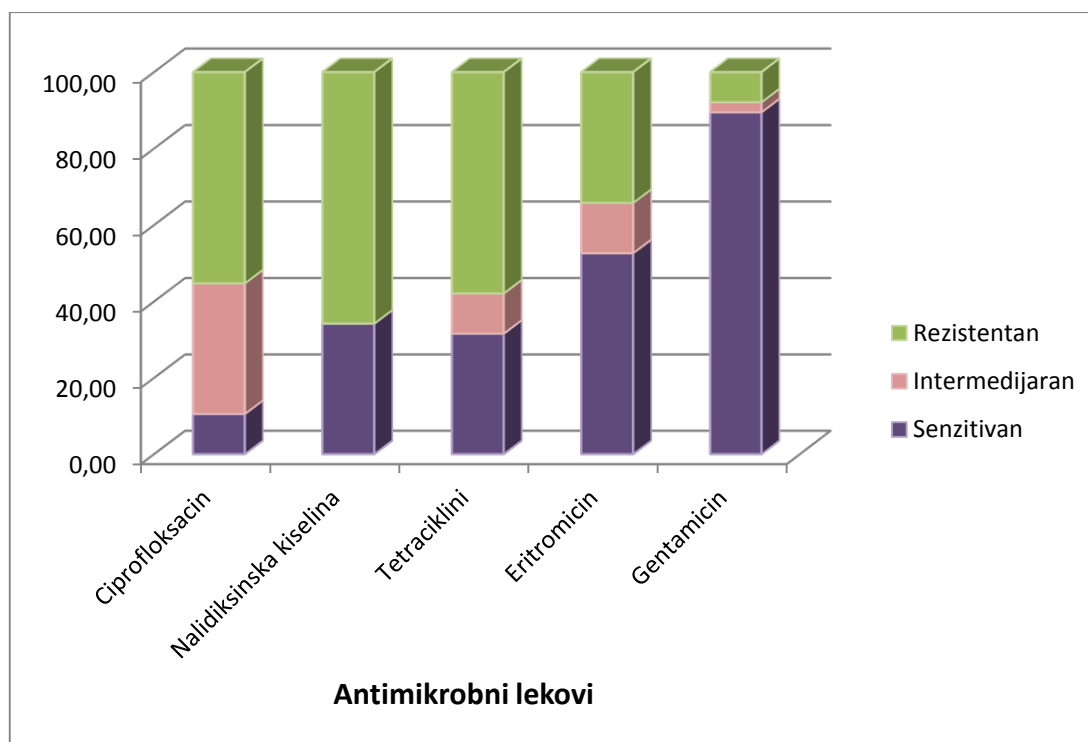
6.4 Rezistencija na antibiotike

Poslednjih godina sve veća učestalost rezistencije kampilobakterija na antibiotike otežava uspešno lečenje kampilobakterioze kod ljudi. Široka upotreba antibiotika u humanoj i veterinarskoj medicinskoj praksi dovela je do sve češće rezistencije bakterija, uključujući i kampilobakterije, na antibiotike. U stočarskoj proizvodnji, posebno živinarstvu, antibiotici su korišćeni ne samo u terapijske svrhe, već i u preveniranju oboljenja, pa i zbog boljih proizvodnih rezultata (Dingle i sar., 2005; Landers i sar., 2012).

Izolati *Campylobacter* spp. su najsenzitivniji i prema disk difuzionoj metod (79,78%) i prema E-testu (89,47%) prema gentamicinu. Osetljivost prema antimikrobnim lekovima utvrđena disk difuzionom metodom ima sledeći opadajući niz: gentamicin > eritromicin > nalidiksinska kiselina > tetraciklini > ciprofloksacin. Isti opadajući niz osetljivosti prema odabranim antimikrobnim lekovima utvrđen je i E-testom (tabele 5.8 i 5.12 i grafikoni 6.6 i 6.7).



Grafikon 6.6. – Antimikrobna osetljivost *Campylobacter* spp. izolata dobijena disk difuzionom metodom



Grafikon 6.7. – Antimikrobna osetljivost *Campylobacter* spp. izolata dobijena E-testom

Kampilobakterije su najčešće rezistentne na fluorokvinolone, posebno najčešće korišten ciprofloksacin. Ovaj antibiotik se često koristi kod lečenja respiratornih bolesti, bolesti urinarnog trakta, kože, artritisa i gastrointestinalnih infekcija (Dryden i sar., 1996). U više zemalja sveta (Turska, V. Britanija, Kanada, Meksiko) kod ljudi i brojlera utvrđena je visoka učestalost kampilobakterija rezistentnih na ciprofloksacin (i do 90%). Zbog toga je neophodno ispitivati prevalenciju kampilobakterija na trupovima brojlera kao i njihovu rezistenciju (Abay i sar., 2014; Agunos i sar., 2013).

Preporučeni lekovi (antibiotici) za lečenje kampilobakterioze su makrolidi (eritromicin, azitromicin i klaritromicin), amoksicilin, fluorokvinoloni (ciprofloksacin) i tetraciklini. Međutim kako je broj rezistentnih kampilobakterija na različite antibiotike u svetu sve veća, to je neophodno menjati menadžment u sprečavanju i lečenju kampilobakterioze (Uaboi-Egbenni, 2012).

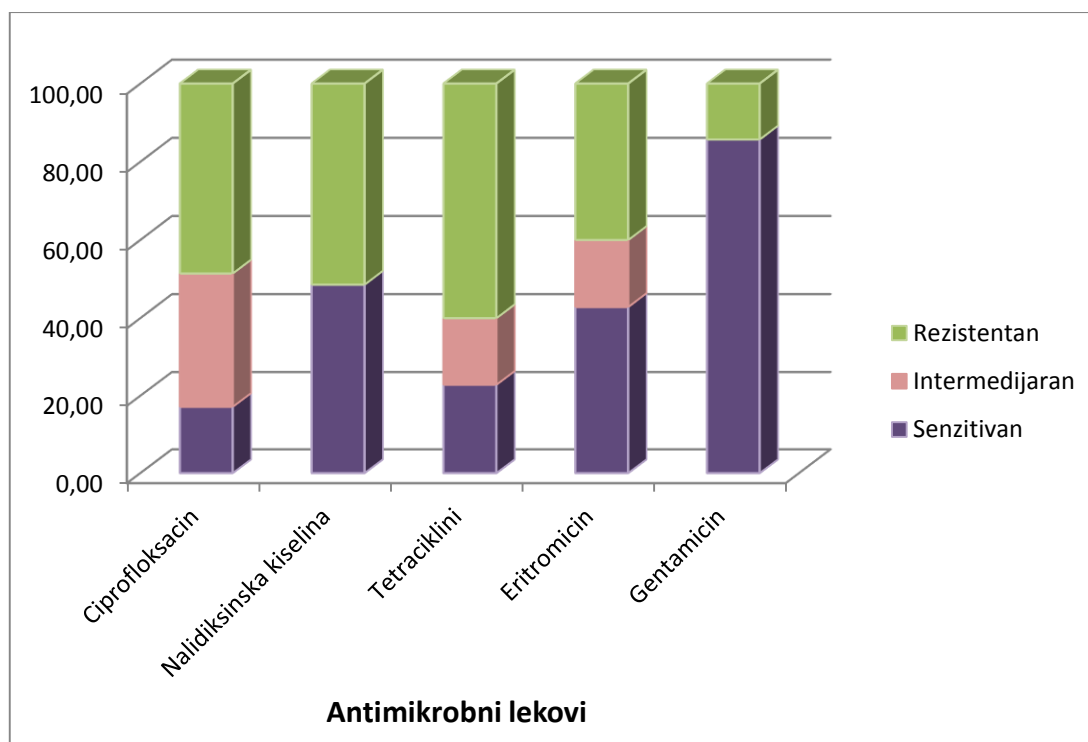
Iz literaturnih podataka uočavaju se različiti nivoi učestalosti rezistencije kampilobakterija prema antibioticima. Tako je u slučajevima humanog gastroenteritisa utvrđeno da je u V. Britaniji, Južnoj Koreji, Izraelu i Peruu učestalost izolata kampilobakterija rezistentnih na fluorokvinolone od 24% do 65% (Pollett i sar., 2012). Znatno je veća učestalost rezistentnosti kampilobakterija prema ciprofloksacinu u Kini (87%) i Japanu (90%) (Shin i sar., 2013; Pham i sar., 2016; Pan i sar., 2016). Prema podacima iz SAD učestalost rezistentnosti izolata *C. jejuni* na ciprofloksacin je 25,3%, a izolata *C. coli* 39,8% (Pollett i sar., 2012).

Takođe vrlo često se za lečenje koriste antibiotici, ali efikasnost ove terapije je zavisna od činjenice da su kapilobakterije rezistentne na antibiotike širom sveta. Najčešće se javlja rezistencija na fluorokvinalone koji se koriste za lečenje farmske živine. Prema podacima iz 2015. godine od 254 izolata kampilobakterija polovina je bila rezistentna na dve grupe antibiotika (tetracikline i kvinalone). Ovo može da ima veoma negativne posledice po javno zdravlje, odnosno lečenje bolesnika naročito onih sa slabijim imunitetom (imunokompromitovanih) (EFSA, 2011).

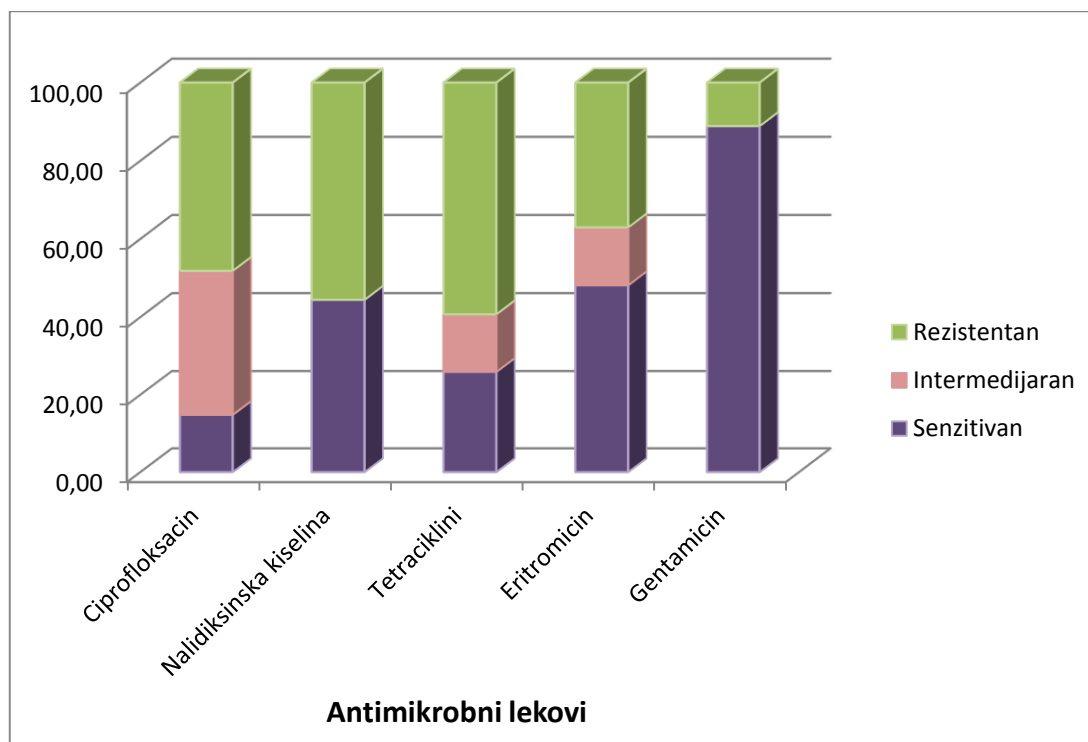
O rezistenciji kampilobakterija na antibiotike postoje brojna saopštenja budući da je to od posebnog značaja za javno zdravlje (Sahin i sar., 2017). To se posebno odnosi na fluorokvinalone i makrolide. U Turskoj 1989. godine nije bilo izolata *C. jejuni* rezistentnih na kvinalone, a 1994. godine rezistentno je bilo 1,01% izolata. Učestalost rezistencije izolata *C. jejuni* rastao je iz godine u godinu, da bi 2013. godine ona bila 74,3% (Kayman i sar., 2019). Da se učestalost rezistencije na ciprofloksacin u V. Britaniji povećala sopsstavaju i Cody i sar. (2010). U Evropi je to učešće od 17,6% do 91,13%, Srednjem Istoku od 85,2% do 85,4%, Africi od 1% do 89%, Aziji od 67% do 86,66% i Severnoj Americi od 2% do 19,5% (Kayman i sar., 2019). Ovo je posledica široke profilaktične upotrebe fluorokvinalona u živinarstvu u svetu (Cody i sar., 2010; Kittl i sar., 2011; Petrović i sar., 2006).

Za razliku od učestalosti rezistencije kampilobakterija na fluorokvinalone učestalost rezistencije na eritromicin je manja. Ona je u Evropi od 0% do 43,42%, Srednjem Istoku od 0% do 11,70%, od 0% do 22,2% u Aziji, i najmanja u Severnoj Americi (od 0% do 3,90%). Na Madagaskaru je 1%, a u Turskoj 5,9% (Kayman i sar., 2019).

Tabelama 5.9 i 5.13, kao i grafikonima 6.8 i 6.9 prikazana je osetljivost *Campylobacter jejuni* na antimikrobne lekove dobijena disk difuzionom metodom i E-testom. I jednom i drugom metodom je utvrđeno da je *Campylobacter jejuni* najmanje osetljiv na ciprofloksacin (17,14% disk difuzionom metodom i 14,81% E-test), a najosetljiviji na gentamicin (85,71% disk difuzionom metodom i 88,89% E-test). Opadajući niz osetljivosti na antimikrobne lekove *Campylobacter jejuni* dobijen disk difuzionom metodom bio je: gentamicin > nalidiksinska kiselina > eritromicin > tetraciklini > ciprofloksacin, a opadajući niz osetljivosti dobijen E-testom bio je: gentamicin > eritromicin > nalidiksinska kiselina > tetraciklini > ciprofloksacin.



Grafikon 6.8. – Antimikrobna osetljivost *Campylobacter jejuni* izolata dobijena disk difuzionom metodom

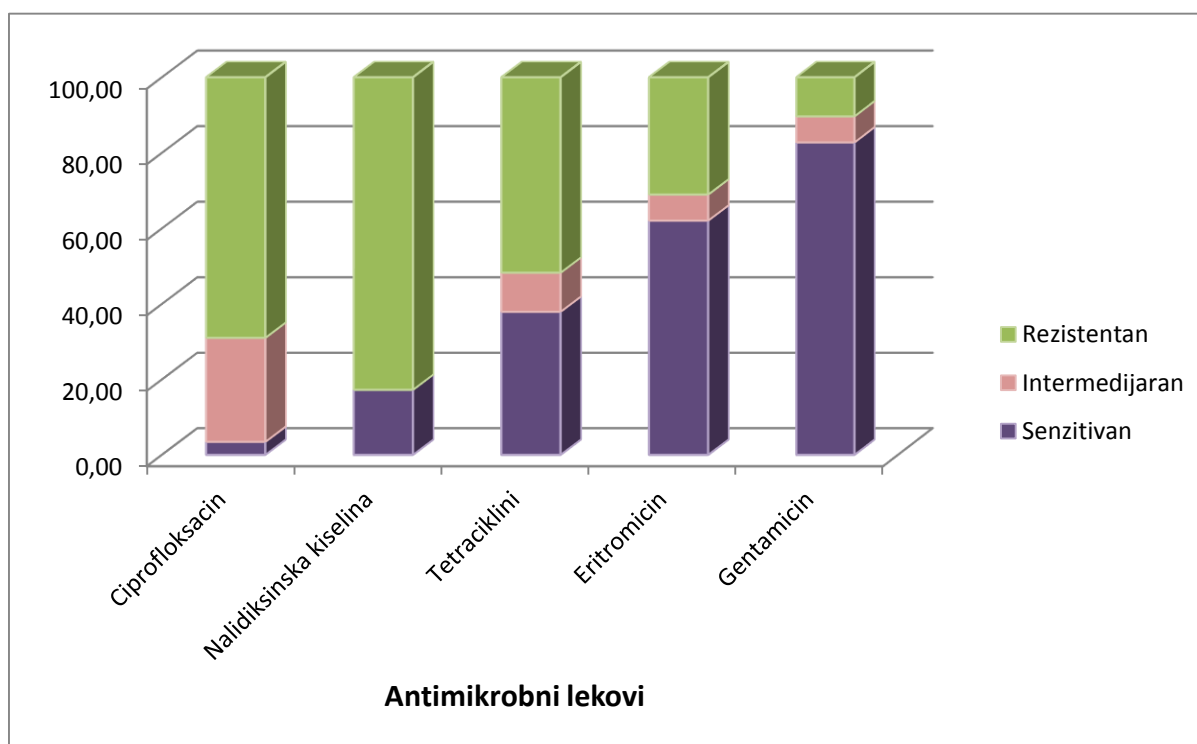


Grafikon 6.9. – Antimikrobna osetljivost *Campylobacter jejuni* izolata dobijena E-testom

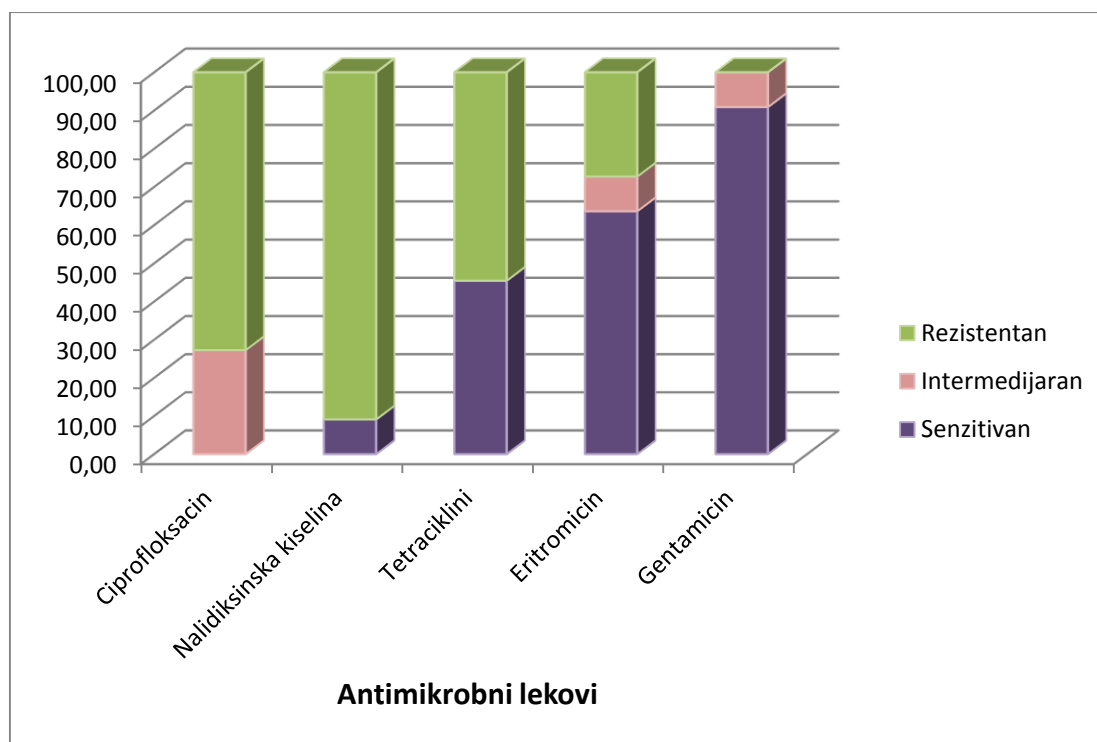
Ispitivanjem 200 uzoraka mesa brojlera utvrđeno je da je 40% kontaminirano sa *C. jejuni*. Od 80 izolata 75% je bilo rezistentno na tetraciklin, 38,75% na ciprofloksacin, 15% na ampicilin, 10% na eritromicin i 2,5% na hloramfenikol. Ulja karanfilića i cimeta imaju antibakterijsko dejstvo prema kampilobakterijama (Samad i sar., 2019).

U osam uzgojnih ciklusa u toku jedne godine u Italiji ispitivano je prisustvo kampilobakteria na tri farme u cilju analize diverziteta izolata *C. jejuni* kod brojlera i utvrđivanja glavnih izvora kontaminacije. Izolovano je 707 *C. jejuni* iz kloakalnih briseva pre klanja i sa kože ohlađenih trupova. Svi izolati su identifikovani PCR i urađeno je njihovo genetsko sekvencioniranje. Urađen je i profil fenotipske genske rezistencije, a ispitane su i MIK (minimalne inhibitorne koncentracije) vrednosti (E- test). U jatima se najveći broj izolata prenosi iz ciklusa u ciklus, ali je utvrđena i kros-kontaminacija između farmi. Većina izolata je rezistentna na fluorokvinolone, što predstavlja ozbiljnu opasnost za javno zdravlje. Specifična populacija kampilobakterija nalazi se na svakoj farmi, a one se prenose iz ciklusa u ciklus, odnosno nalaze se u svakom ciklusu. Biosigurnosne mere pri stalnoj kontaminaciji ne mogu da budu efikasne (Marotta i sar., 2015).

Osetljivost izolata *Campylobacter coli* na odabrane antimikrobne lekove dobijena disk difuzionom metodom i E-testom prikazana je tabelama 5.10 i 5.14, kao i grafikonima 6.10 i 6.11. Najveća osetljivost *Campylobacter coli* utvrđena je u obe metode prema gentamicinu (82,76% disk difuziona metoda i 90,91% E-test), a najmanja prema ciprofloksacinu (3,45% disk difuziona metoda i 0% E-test). Opadajući niz osetljivosti dobijen disk difuzionom metodom i E-testom bio je identičan: gentamicin > eritromicin > tetraciklini > nalidiksinska kiselina > ciprofloksacin.



Grafikon 6.10. – Antimikrobna osetljivost *Campylobacter coli* izolata dobijena disk difuzionom metodom



Grafikon 6.11. – Antimikrobna osetljivost *Campylobacter coli* izolata dobijena E-testom

Marotta i sar. (2015) saopštavaju da su izolati *C. jejuni* i *C. coli* sa farmi i trupova brojlera (707 izolata) bili rezistentni (E-test) na hloramfenikol u 1,71%, odnosno u 0,34% slučajeva, na ciprofloksacin u 90,79% i 93,15% slučajeva, na eritromicin 6,20% i 41,98% slučajeva, na gentamicin 0,42% i 0% slučajeva, na nalidiksinsku kiselinu 91,64% i 92,12% slučajeva, na streptomycin 0,14% i 0,34% slučajeva, a na tetraciklin 58,24% i 75,34% slučajeva, pojedinačno.

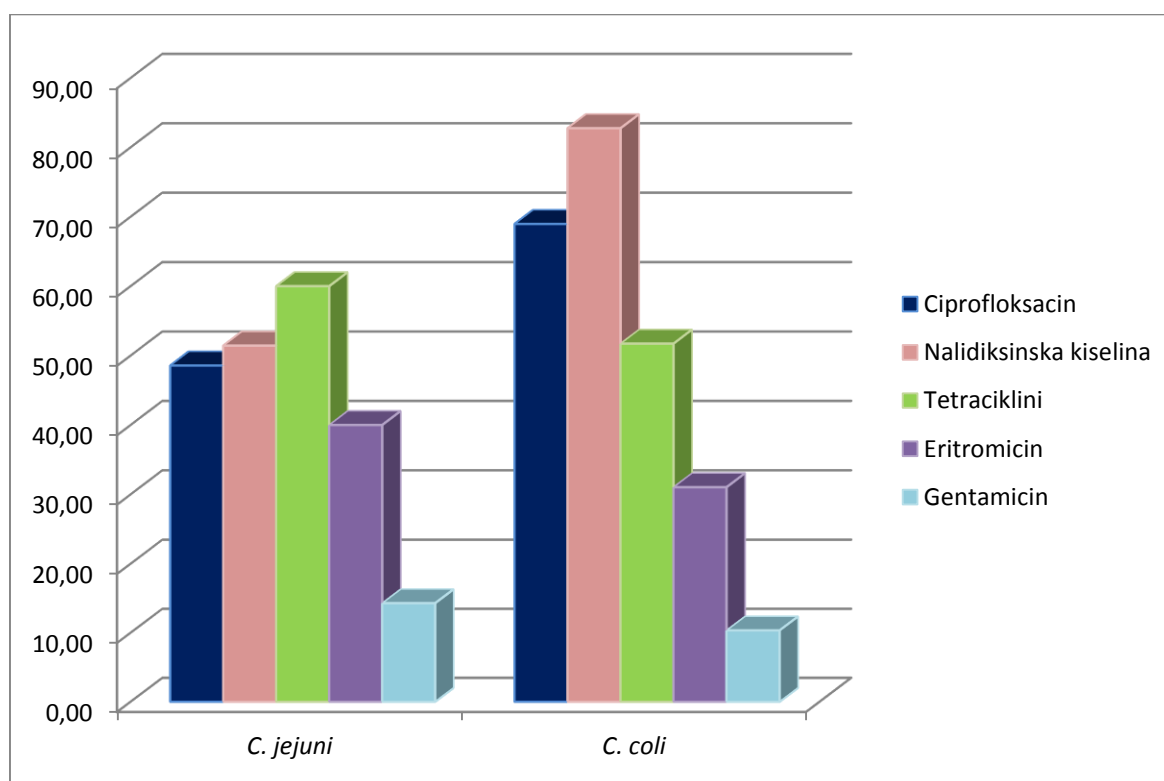
Antibiotska rezistencija kampilobakterija kod životinja je prema podacima različito učestala. U Kini je 73,2% izolata *C. coli* poreklom iz živine rezistentno na eritromicin, a u Španiji 73,0% (Wang i sar., 2016; Torralbo i sar., 2015). Podaci o učestalosti rezistencije na različite antibiotike u Italiji, Francuskoj i Brazili su varijabilni i mogu da se nađu u literaturi (Guyard-Nicodeme i sar., 2015; Nobile i sar., 2013; Panzehagen i sar., 2016).

Učestalost rezistencije *C. jejuni* na tetraciklin u Turskoj bila je od 12% (Oncul i sar., 2003) do 25% (Kayman i sar., 2013), u Evropi od 13,7% do 65,8%, Iranu 35,2%, Aziji od 33,33% do 89% i Severnoj Americi od 50% do 64,44% (Kayman i sar, 2019).

Schiaffino i sar. (2019) su ispitivali rezistentnost izolata kampilobakterija na određene antibiotike (ciprofloksacin, nalidiksinska kiselina, eritromicin, azitromicin, tetraciklin, gentamicin, ampicilin, amoksicilin i klavulansku kiselinu, ceftriakson, hloranfenikol i trimetoprim-sulfametoksazol). Rezistencija je utvrđena difuzionom metodom. Rezistentnost izolata (izražena u procentima) *C. jejuni* prema antibioticima imala je sledeći opadajući niz: trimetoprim-sulfametoksazol: 85,2%; ciprofloksacin: 77,4%; nalidiksinska kiselina: 64,9%; tetraciklin: 55,8%;

ampicilin: 46,8%; ceftriakson: 44,7%; eritromicin: 5,3%; azitromicin: 4,9%; gentamicin: 1,0%; amoksicilin i klavulanska kiselina: 0,7% i hloramfenikol: 0,2%. Za izolate koji nisu bili *C. jejuni* opadajući niz rezistentosti bio je sledeći: trimetoprim-sulfametoksazol: 80,9%; nalidiksinska kiselina: 80,1%; ciprofloksacin: 79,8%; ceftriakson: 55,0%; ampicilin: 50,7%; tetraciklin: 49%; eritromicin: 25,2%; azitromicin: 24,8%; gentamicin: 15,8%; amoksicilin i klavulanska kiselina: 1% i hloramfenikol: 0,3%.

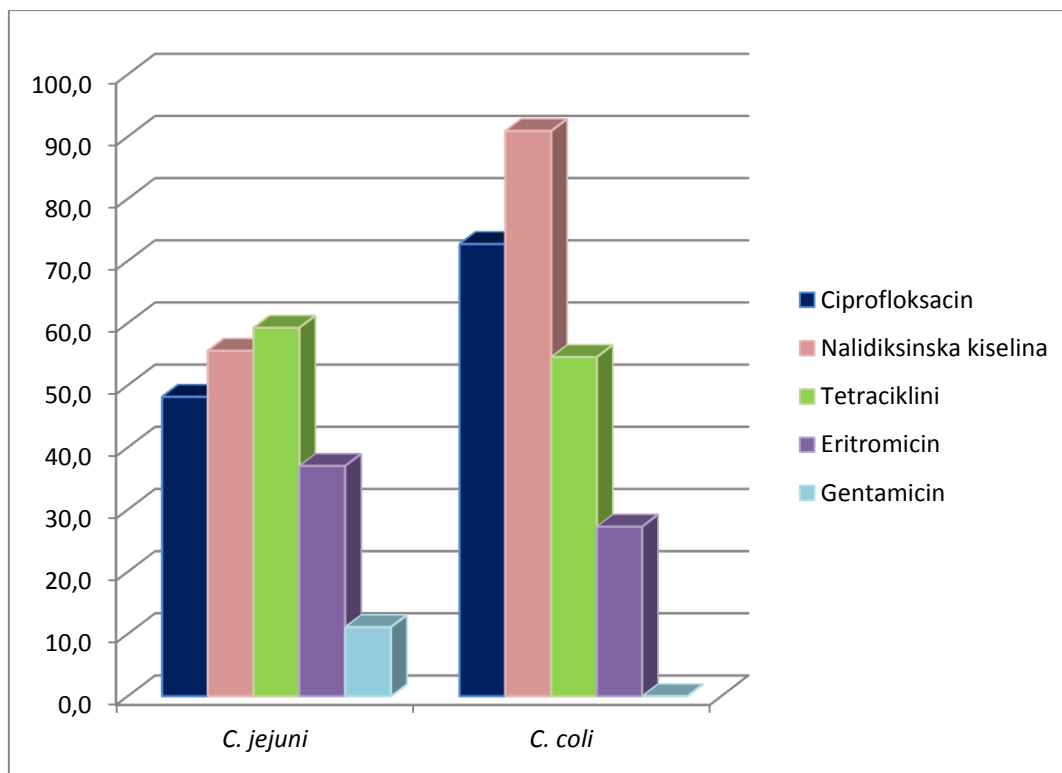
Izolati *C. coli* su pokazivali veću rezistenciju (disk difuziona metoda) prema ciprofloksacinu (68,97%), u odnosu na izolate *C. jejuni* (48,57%). Prema nalidiksinskoj kiselini veću rezistenciju su pokazivali izolati *C. coli* (82,76%), u odnosu na 51,43% izolata *C. jejuni*. Prema tetraciklinima, eritromicinu i gentamicinu veću rezistenciju su pokazivali izolati *C. jejuni* (60,00%, 40,00% i 14,29%), u odnosu na izolate *C. coli* kod kojih je rezistencija iznosila 51,72%, 31,03% i 10,34% (grafikon 6.12).



Grafikon 6.12. – Antimikrobna rezistencija *C. jejuni* i *C. coli* izolata dobijena disk difuzionom metodom

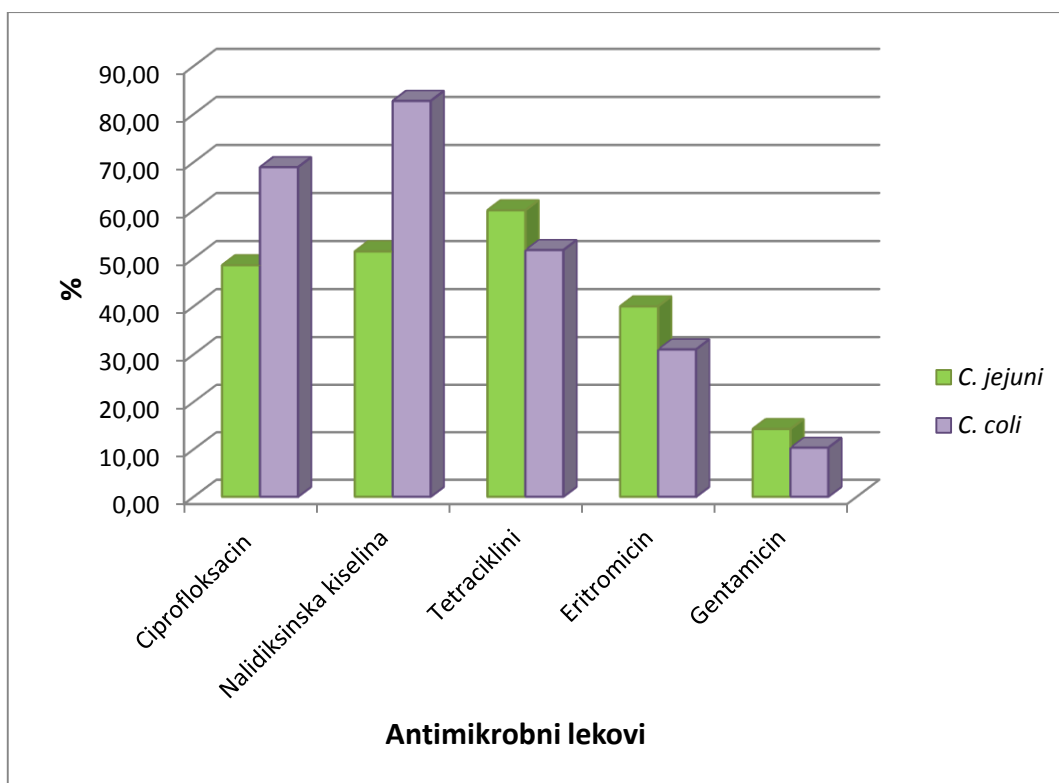
Izolati *C. coli* su pokazivali veću rezistenciju (E-test) prema ciprofloksacinu (72,73%), u odnosu na izolate *C. jejuni* (48,15%). Prema nalidiksinskoj kiselini veću rezistenciju su pokazivali izolati *C. coli* (90,91%), u odnosu na 55,56% izolata *C. jejuni*. Prema tetraciklinima, eritromicinu i gentamicinu veću rezistenciju su pokazivali izolati *C. jejuni* (59,26%, 37,04% i 11,11%), u odnosu

na izolate *C. coli* kod kojih je rezistencija iznosila 54,55% (prema tetraciklinima), i 27,27% (prema eritromicinu), dok prema gentamicinu nije ni zabeležena (grafikon 6.13).

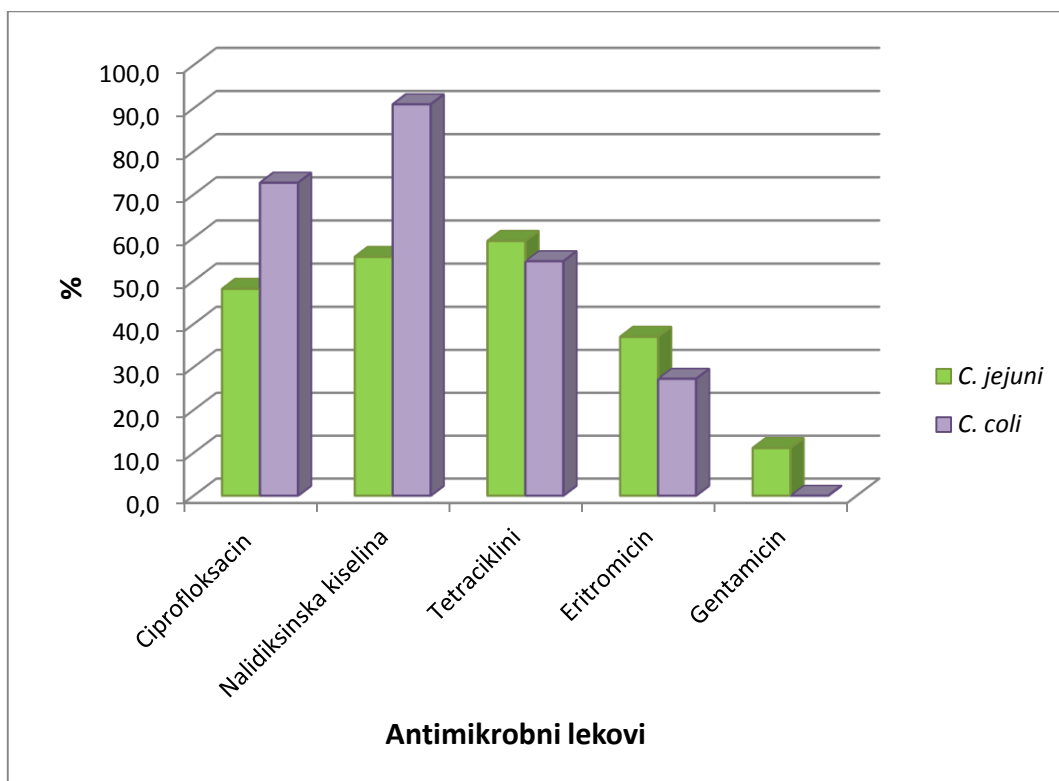


Grafikon 6.13. – Antimikrobna rezistencija *C. jejuni* i *C. coli* izolata dobijena E-testom

Uporedni prikaz rezistencije *C. jejuni* i *C. coli* prema izabranim antimikrobnim lekovima dobijeni disk difuzionom metodom prikazana je grafikonom 6.14, a dobijena E-testom grafikonom 6.15. Iz prikazanih podataka učestalosti rezistencije *Campylobacter coli* kod obe metode veća je na fluorohinolone (ciprofloksacin i nalidiksinska kiselina) nego na makrolide (tetraciklini, eritromicin, gentamicin). Međutim učestalost rezistencije izolata *Campylobacter jejuni* je najčešća prema tetraciklinima, što je utvrđeno i disk difuzionom metodom i E-testom (grafikoni 6.14 i 6.15).



Grafikon 6.14. – Usporedna antimikrobna rezistencija *C. jejuni* i *C. coli* izolata prikazana prema izabranim antimikrobnim lekovima, dobijena disk difuzionom metodom

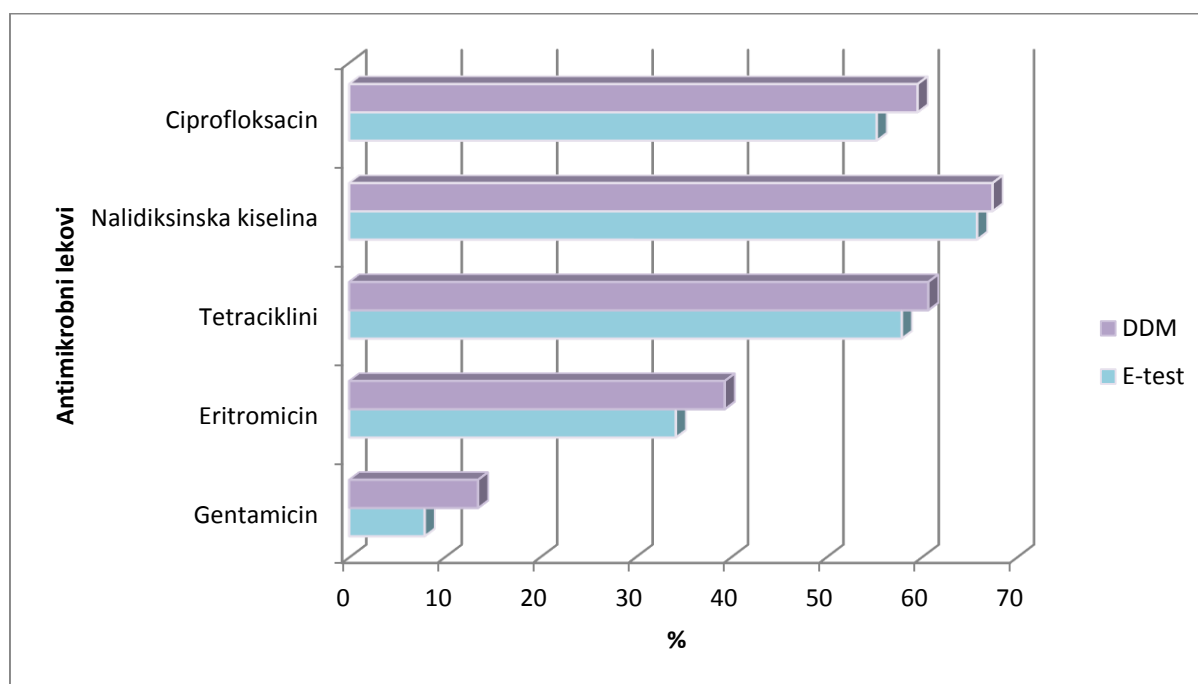


Grafikon 6.15. – Usporedna antimikrobna rezistencija *C. jejuni* i *C. coli* izolata prikazana prema izabranim antimikrobnim lekovima, dobijena E-testom

Ispitivanjem antimikrobne rezistencije (disk difuzionom metodom) izolata (66 izolata) kampilobakterija poreklom sa trupova brojlera i opreme u klanici utvrđeno je da je 34,85% izolata rezistentno na ciproflaksin, 42,42% na eritromicin, 3,03% na gentamicin, 43,94% na nalidiksinsku kiselinu, isto toliko na streptomycin i 27,27% na tetraciklin. Od ispitivanih izolata 56,01% bilo je osetljivo na jedan od šest testiranih antibiotika, a 43,9% bilo je osetljivo na dva i više antibiotika. Dva (3,03%) izolata bilo je rezistentno na svih šest antibiotika (Sakaridis i sar., 2019). Ranije studije o rezistenciji na kampilobakterije u Grčkoj su pokazale manju učestalost rezistencije (20%) na antibiotike (Economou i sar., 2015).

Rezultati ispitivanja rezistencije (E-test) na šest odabranih antibiotika 124 izolata *C. jejuni* i 84 izolata *C. coli* pokazuju da je 88,25% izolata bilo rezistentno na ciproflaksin (87,5% *C. jejuni* i 89,01% *C. coli*), 22,96% na eritromicin (14,06% *C. jejuni* i 31,86% *C. coli*), 3,76% na gentamicin (3,12% *C. jejuni* i 4,4% *C. coli*), 81,45% na nalidiksinsku kiselinu (75% *C. jejuni* i 87,91% *C. coli*) 7,45% na streptomycin (3,9% *C. jejuni* i 10,99% *C. coli*) i na tetraciklin 75,6% izolata (68,75% *C. jejuni* i 82,42% *C. coli*). Prikazani rezultati govore o većoj učestalosti rezistencije izolata *C. coli* na svih šest antibiotika, u odnosu na učestalost rezistencije izolata *C. jejuni* (Di Giannatale i sar., 2019).

Uporedna analiza rezistentnosti *Campylobacter* spp. na odabrane antimikrobne lekove disk difuzionom metodom i E-testom prikazana je grafikonom 6.16 i tabelom 5.15. Iz prikazanih podataka se uočava da je učestalost rezistencije na odabrane antimikrobne lekove veća kada se koristi disk difuziona metoda nego kada se koristi E-test.



Grafikon 6.16. – Uporedna analiza rezistentnosti *Campylobacter* spp. na odabrane antibiotike disk difuzionom metodom i E-testom

Ispitivanja rezistentnosti disk difuzionom metodom (osam antibiotika) *C. jejuni* iz uzoraka mesa brojlera pokazala su da je najmanje izolata ove vrste kampilobakterija bilo rezistentno na gentamicin (18,2%), a najviše na oksacilin (90,9%). Rezistentnost izolata *C. coli* iz mesa brojlera takođe je bila najmanje učestala na gentamicin (40%), a najučestalija na oksacilin (100%). Uporedna analiza učestalosti rezistencije na antibiotike *C. jejuni* i *C. coli* pokazuje da je rezistencija *C. coli* na isti antibiotik učestalija nego na *C. jejuni*. Podudarni rezultati dobijeni su i pri ispitivanju rezistencije izolata *C. jejuni*, odnosno *C. coli* koji su bili izolovani iz mesa ćuraka. Od ukupno 54 izolata *C. jejuni* i *C. coli* (zajedno) čak 27,8% bilo je rezistentno na svih osam antibiotika, 13% na sedam, 5,6% na šest, 7,4% na pet, 14,8% na četiri, 11,1% na tri, isto toliko na dva, a 3,7% na po jedan antibiotik (Kanaan i Abdulwahid, 2019).

Lečenje obolelih od kampilobakterioze uključuje zamenu izgubljene tečnosti i elektrolita, ali i antibiotsku terapiju. Ona je naročito neophodna kod pacijenata sa povišenom temperaturom, krvavim dijarejama, čestim stolicama (preko osam na dan), povraćanjem, simptomima koji traju duže od jedne nedelje, trudnica, imunokompromitovanih osoba, itd. Od antibiotika se najčešće koristi eritromicin (van Samkar i sar., 2016). Pored njega u terapiji kampilobakterioze koriste se i azitromicin, doksicilin, imipenem i cilastatin, gentamicin, meropenem, ampicilin, amoksisilin, ciprofloksacin i levofloksacin (Javid, 2019).

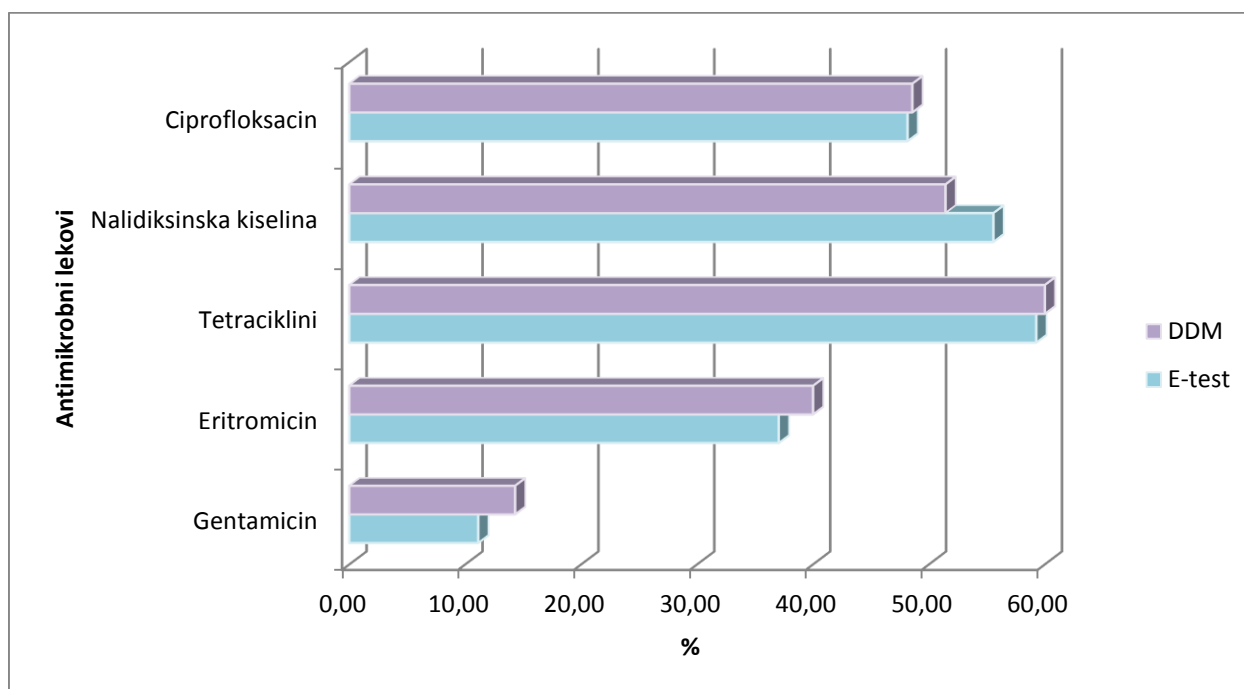
U istraživanjima na 303 deteta starosti do pet godina Schiaffino i sar. (2019) su utvrdili da je 79,9% dece inficirano kampilobakterijama. U toj studiji uvrđeno je da je 33,1% kampilobakterija bilo rezistentno istovremeno na azitromicin i ciproflaksin. Ispitivanja u Peruu pokazuju da su kampilobakterije najosetljivije prema amoksicilinu i klavulanskoj kiselini, dok je rezistencija ciprofloksacina prema izolatima *C. jejuni* bila 77,4%, a prema izolatima koji nisu *C. jejuni* bila 79,8%. Rezistencija izolata *C. jejuni* prema azitromicinu bila je 4,9%, a prema izolatima ostalih vrsta kampilobakterija 24,8%.

Shobo i sar. (2016) su ispitivali profil antibakterijske rezistencije *Campylobacter* spp. Pacijenti (72 obolela) kod kojih su utvrđene kampilobakterije bili su starosti od manje od dve godine do preko 60 godina. Najveća učestalost kampilobakterioze utvrđena je kod dece do dve godine (38,9% slučajeva oboljenja), dok je najmanja učestalost kampilobakterioze utvrđena kod starosne grupe preko 60 godina (5,6% slučajeva oboljenja). Od 72 izolata 54 (75%) su identifikovani (PCR) kao *C. jejuni*, a 18 (25%) kao *C. coli*. Od toga 11 (20,4%) izolata *C. jejuni* i šest (33,3%) izolata *C. coli* bilo je rezistentno na ciprofloksacin, tri (7,41%) izolata *C. jejuni* i tri (16,7%) izolata *C. coli* bili su rezistentni na gatifloksacin. Broj *C. jejuni* rezistentnih na eritromicin i azitromicin bio je 17 (31,5%) i 36 (50%), pojedinačno, dok je broj rezistentnih izolata *C. coli* na eritromicin i azitromicin bio 7 (38,9%) i 14 (77,8%), pojedinačno. Na tetraciklin je bilo rezistentno

10 (55,6%) izolata i 14 (25,9%) izolata *C. jejuni*. Na osnovu ovih podataka autori smatraju da se postupak lečenja kampilobakterioze kod ljudi mora menjati.

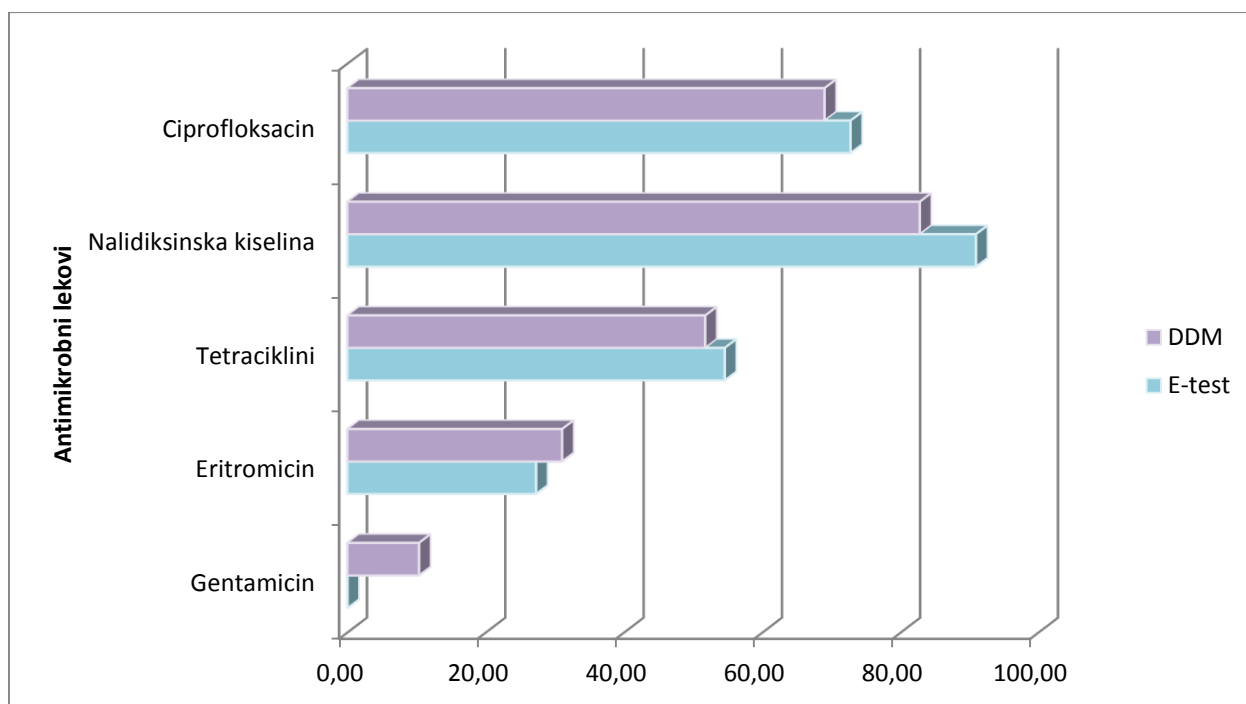
Statistički podaci o učestalosti rezistencije na kampilobakterija nisu brojni ako se uzme u obzir broj ispitivanih izolata. Malo je studija koje se odnose na ispitivanje rezistentnosti hiljadu i više izolata kampilobakterija. Takve obimne studije (preko hiljadu izolata) urađene su u Švedskoj, Finskoj, Poljskoj, Japanu, Tajlandu, Južnoj Koreji, Kini, Peruu i Tanzaniji (Schiaffino i sar., 2019).

Iz uporedne analize rezistentnosti izolata *C. jejuni* na odabrane antimikrobne lekove uočava se da je učestalost rezistencije dobijena utvrđena disk difuzionom metodom, izuzev nalidiksinske kiseline, u svim ostalim slučajevima veća od učestalosti rezistencije utvrđene E-testom (grafikon 6.17 i tabela 5.15).



Grafikon 6.17. – Uporedna analiza rezistentnosti *Campylobacter jejuni* na odabrane antibiotike disk difuzionom metodom i E-testom

Grafikonom 6.18 i tabelom 5.15 dat je uporedno prikaz rezistentnosti *C. coli* na odabrane antimikrobne lekove disk difuzionom metodom i E-testom. E-testom je utvrđena veća učestalost rezistencije *C. coli* na ciprofloksacin, nalidiksinsku kiselinu i tetracikline, osim na eritromicin, a rezistencija na gentamicin ovom metodom nije ni dokazana.



Grafikon 6.18. – Usporedna analiza rezistentnosti *Campylobacter coli* na odabrane antibiotike disk difuzionom metodom i E-testom

Mourkas i sar. (2019) sopštavaju o učestalosti rezistencije izolata (disk difuzionom metodom) kampilobakterija na ciprofloksacin (C), tetraciklin (T), eritromicin (E), streptomycin (S) i gentamicin (G) kod ljudi, životinja i iz otpadnih voda. Od ukupno analiziranih izolata *C. jejuni* (163 izolata od čega 44 izolata kod životinja, 115 humanih i 4 iz otpadnih voda) iz sva tri izvora 90,12% bilo je rezistentno na ciprofloksacin, 91,41% na tetraciklin, 2,54% na eritromicin, 14,52% na streptomycin, a 1,23% na gentamicin. Analiziran je i 91 uzorak *C. coli* iz sva tri izvora (11 izolata kod životinja, 33 humana i 47 iz otpadnih voda), a 94,5% izolata bilo je rezistentno na ciprofloksacin, 94,5% na tetraciklin, 25,3% na eritromicin, 63,75% na streptomycin i 11% na gentamicin. Ni jedan od svih sojeva *C. jejuni* nije bio rezistentan na svih pet vrsta antibiotika. Na četiri antibiotika bilo je rezistentno 1,75% izolata *C. jejuni* kod ljudi. I kod ljudi i kod životinja bilo je izolata koji su bili rezistentni na po tri antibiotika (C,T,S) i (C,T,E). Izolati *C. jejuni* rezistentni na dva i jedan antibiotik svrstavaju se grupu nemultirezistentnih, a takvih je bilo u sve tri grupe izolata. Kod izolata *C. coli* utvrđeno je da je njih 36,4% poreklom od životinja bilo rezistentno na svih pet antibiotika, a 3% kod izolata ljudi. Na četiri ista antibiotika bilo je rezistentnih izolata iz sva tri izvora (životinje, ljudi, otpadne vode), a na po tri različita antibiotika bilo je uzoraka rezistentnih iz sve tri grupe. Ovi rezultati pokazuju da se specifična antibakterijska aktivnost širi između izolata kampilobakterija životinja, ljudi i životne sredine.

Rezistentnost kampilobakterija na makrolide je manja u odnosu na fluorokvinolone, pa je tako učestalost rezistentnosti humanih izolata kampilobakterija na ovu grupu bakterija u Južnoj

Koreji 0,8%, V. Britaniji 2,2%, Tajlandu 12,5%, Kini 21,8% i Indiji 22,2% (Ghosh i sar., 2013; Shin i sar., 2013; Stockdale i sar., 2016; Pham i sar., 2016; Pan i sar., 2016).

Prošlih godina učestalost rezistencije na antibiotike *C. jejuni* i *C. coli* je proširena u svetu (Wieczorek i Osek, 2015; Ghoch i sar., 2013; Mattheus i sar., 2012). Posebno je utvrđen visok nivo rezistentnosti humanih izolata *C. jejuni* i *C. coli* prema fluorokvinolonima i makrolidima (Mattheus i sar., 2012; Zhao i sar., 2015). Fluorokvinoloni, posebno ciprofloksacin, su korišteni u lečenju kampilobakterioze. Međutim sve veća rezistentost kampilobakterija na ovu grupu antibiotika dovela je do toga da je preporučena druga grupa antibiotika – makrolidi, tačnije azitromicin. Vremenom i na ovu grupu antibiotika rezistencija kampilobakterija je rasla što je dovelo do sumnje i u njihovu efikasnost (Schiaffino i sar., 2019).

Poznavanje antimikrobne rezistencije u različitim fazama proizvodnog procesa je neophodno za razvoj efektivnih kontrolnih strategije proizvodnje bezbedne hrane (mesa živine). Ima studija koje se odnose na ispitivanja prevalencije osetljivosti kampilobakterija na antibiotike. One govore o rezistenciji kampilobakterija na različite antibiotike, posebno kvinolone. Upotreba antibiotika na farmama mora da bude poznata (zabeležena) snabdevaču tržišta mesom (klanicama), jer su one osnovna kritična kontrolna tačka između farmi i potrošača (Nicorici i Ghodduci, 2017).

Da je rezistencija kampilobakterija na antibiotike u porastu može da se zaključi iz podataka Lastovica (2006), prema čijim rezultatima učestalost rezistencije na ciprofloksacin u Južnoj Africi bila je 1995. godine 1,45%, a 2005. godine 29%. U isto vreme rezistencija kampilobakterija na eritromicin povećana je sa 3,4% na 7,2%. I drugi autori saopštavaju o sve većoj učestalosti rezistencije kampilobakterija, i ne samo njih, na antibiotike (Samie i sar., 2007; Ge i sar., 2013; Anon, 2012; Ghosh i sar., 2013).

Od ispitanih izolata (53) 24 je bilo različita PFGE tipa, od kojih je 14 izolovano samo jednom, a pet PFGE tipova bilo je zastupljeno sa dva izolata. Putem pet PFGE tipova bilo je predstavljeno 29 izolata, a sastojali su se od tri do 12 izolata. Odnos PFGE tipova i odgovarajućeg profila rezistencije govori o tome da su svi sojevi svakog PFGE tipa delili isti profil rezistencije. Rezultati ovih ispitivanja ukazuju na unakrsnu kontaminaciju trupova i opreme u samoj klanici (Sakaridis i sar., 2019).

Rezistencija kampilobakterija na antibiotike najočiglednija je na primeru fluorokvinolona. Promena samo jednog mesta (mutacija) na *gyrA* genu uslovlila je rezistentnost kod ove grupe antibiotika ranih devedesetih godina prošlog veka i brzo se proširila na kampilobakterije kod ljudi i brojlera (Wieczorek i Osek, 2013).

Molekularni mehanizam rezistencije *C. jejuni* na fluorokvinolone je posledica najčešće mutacije Thr-86-Ile Gyr A gena, ali može da bude i uzrokovana mutacijama drugih gena (Kayman i

sar., 2019; Cha i sar., 2016). Rezistencija na eritromicin nastaje kao posledica mutacije 23S rRNA gena u osam od devet eritromicin rezistentnih izolata *C. jejuni*. Lehtopolku i sar. (2010) saopštavaju da je od 76 izolata kampilobakterija 43,42% bilo rezistentno na makrolidne antibiotike. Utvrđene su mutacije A2075G na 23S rRNA genu. Nosilac rezistencije na tetraciklin kod kampilobakterija je tetO gen (hromosom ili plazmid) (Chang i sar., 2017).

6.5 Zaključna razmatranja

Prvo saopštenje o nalazu kampilobakterija dao je Theodor Escherich (1857-1911), lekar, pedijatar, 1886. godine koji je ovu bakteriju utvrdio u tankom crevu deteta umrlog od kolere. Kasnije je prisustvo ove bakterije dokazano kod ovaca (1913. godine), fetusa goveda (1927. godine), svinja (1944. godine), a bila je označena kao *Vibrio coli*. Skoro 20 godine kasnije (1963. godine) kampilobakterije su izdvojene iz roda *Vibrio* u poseban rod *Campylobacter* (od grčkog kamylos – curved i baktron – rod, curved rod – zakrivljeni štap). U fecesu dece kampilobakterije su utvrđene 1972. godine, a godinu dana kasnije kod dece obolele sa simptomima dijareje. Time je bilo ukazano na njihov značaj za zdravlje ljudi. Sedamdesetih godine bila je konfuzija u nomenklaturi kampilobakterija, da bi tek 2000. godine kampilobakterije bile definisane kao poseban rod. Trenutno su poznate 34 vrste i 14 podvrsta ove bakterije. Poslednja taksonomija roda *Campylobacter* je posle više revizija urađena 2008. godine.

Danas su kampilobakterije, pre svega, *C. jejuni* i *C. coli* (manje *C. lari* i ostale vrste) uzročnici kampilobakterioze, zoonoze, bolesti prenosive hranom i najčešće bakterijske bolesti ljudi. Broj obolelih ljudi u svetu od kampilobakterioze zadnjih godina je oko 40 miliona (godišnje) i u stalnom je porastu. Uzrok oboljenja ljudi najčešće se vezuje za meso živine, prevashodno brojlera (piladi) čije meso u ukupnoj proizvodnji mesa živine učestvuje sa preko 80%. Brojleri (pilad) su asimptomatski nosioci (izvor) kampilobakterija. Činjenica je da je broj obolelih od kampilobakterioze u velikoj meri uslovljen povećanjem potrošnje mesa živine. Naime, već više od 40 godina porast proizvodnje živinskog mesa je iz godine u godinu veći od porasta proizvodnje ostalih vrsta mesa (svinjsko, goveđe), pa je proizvodnja mesa živine 2017. godine bila izjednačena sa proizvodnjom mesa svinja, a danas je i veća. Sa porastom proizvodnje i potrošnje mesa živine rasla je i učestalost oboljenja ljudi od kampilobakterioze. Otuda je i razumljivo da u naučnim krugovima stalno raste interes za izučavanje kampilobakterija. Prema podacima PubMed od 1981. godine objavljeno je 1.068 radova (časopisi sa impakt faktorom koji su dostupni javnosti (open access)). Za prva četiri meseca 2020. godine publikovano je 36 radova. Istraživanja u ovoj oblasti usmerena su u više pravaca (kampilobakterioza kao bolest, izvori infekcije, učestalost nalaza pojedinih vrsta, učestalost nalaza na farmi, trupovima u klanici, mesu u prometu, u domaćinstvima,

geografska rasprostranjenost, putnička bolest, metode izolacije i identifikacije, antimikrobna rezistencija, virulencija, fenotipske osobine, genotipizacija, filogenetska srodnost izolata, biosigurnosne mere na farmi, dobra proizvođačka praksa i dobra higijenska praksa u klanici i prometu, kros-kontaminacija, itd). Možda o ozbiljnosti problema kampilobakterioze najbolje govori podatak da u svetu ima zemalja koje imaju vodiče namenjene krajnjim potrošačima (budući da su domaćinstva i mesto pripreme hrane najslabija karika u lancu hrane) sa ciljem da ih upute kako da se zaštite od infekcije kampilobakterijama.

Sumnje nema, da će kampilobakterije i dalje pobuđivati interes istraživača, naročito s obzirom na činjenicu da će potrošnja mesa živine rasti i da će je pratiti povećanje broja obolelih ljudi od kampilobakterioze, da postoji potreba uvođenja efikasnijih biosigurnosnih mera na farmama u cilju smanjenja broja kampilobakterija u digestivnom traktu živine, kao i činjenicu da kampilobakterije imaju sposobnost da se menjaju i da im se diverzitet stalno povećava o čemu najbolje govore podaci o antibakterijskoj rezistenciji (nije retkost da su pojedini izolati rezistentni na više antibiotika). Razume se da je interes istraživača u velikoj meri usmeren na unapređenje postupaka izolacije i identifikacije vrsta (izolata) i poznavanje njihovih fenotipskih i genotipskih osobina.

7. Zaključci

Na osnovu rezultata istraživanja u okviru ove disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

1. Korišćenjem automatizovanog kvalitativnog testa na principu ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) tehnologije *Campylobacter* spp. su dokazane kod 91,30% trupova (ispirak ohlađenih trupova) živine poreklom iz dve industrijske i jedne zanatske klanice (objekata „A“, „B“ i „C“).
2. Zasejavanjem uzoraka ispiraka ohlađenih trupova živine iz sve tri klanice na selektivni modifikovani ugljeni cefperazon deoksiholat agar (mCCD) i CampyFood agar, prisustvo *Campylobacter* spp. utvrđeno je kod 91,30%, odnosno 77,39% trupova živine.
3. Pomoću RealTime PCR tehnike (16S rRNK) na trupovima živine iz sva tri objekta prisustvo *Campylobacter* spp. utvrđeno je u 77,39% uzoraka.
4. U uzorcima ispiraka ohlađenih trupova živine iz zanatske klanice (objekat „C“) učestalost nalaza *Campylobacter* spp. bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) u odnosu na učestalost nalaza *Campylobacter* spp. na trupovima živine iz dva industrijska objekta (objekti „A“ i „B“). Prosečna učestalost nalaza *Campylobacter* spp. na ohlađenim trupovima živine iz sva tri objekta bila je 77,39%.
5. Učestalost nalaza *Campylobacter jejuni*, odnosno *Campylobacter coli* na trupovima živine iz industrijskog objekta „A“ bila je ujednačena, dok je u industrijskom objektu „B“, učestalost nalaza *Campylobacter coli* bila veća (57,89%), u odnosu na učestalost nalaza *Campylobacter jejuni* (31,58%). U zanatskom objektu (objekat „C“) učestalost nalaza *Campylobacter jejuni* bila je 54,54%, a *Campylobacter coli* 29,54%. Najmanja učestalost nalaza mešanih kultura bila je kod trupova živine iz objekta „B“ (10,52%), a najveća iz objekta „A“ (38,33%). Prosečna učestalost nalaza *Campylobacter jejuni* iz sva tri objekta bila je 44,87%, *Campylobacter coli* 37,18% i mešanih kultura 17,95%.
6. U uzorcima ispiraka ohlađenih trupova živine ni u jednom objektu nije utvrđeno prisustvo *Campylobacter lari*.
7. Filogenetska srodnost dokazana je između jednog izolata *Campylobacter jejuni* iz objekata „A“ i jednog iz objekta „C“, između jednog izolata *Campylobacter jejuni* iz objekata „A“ i jednog iz

objekta „B“, i između jednog izolata iz objekta „B“ i dva izolata iz objekta „C“. Utvrđena je i filogenetska srodnost između jednog humanog izolata i tri izolata *Campylobacter jejuni* sa trupova živine iz objekta „C“.

8. Nije utvrđena filogenetska srodnost između izolata *Campylobacter coli* sa trupova živine iz različitih objekata. Filogenetska srodnost dokazana je između osam izolata *Campylobacter coli* sa trupova živine iz objekta „B“ i dva humana izolata (deset izolata u grani). Takođe je dokazana filogenetska srodnost između dva izolata *Campylobacter coli* sa trupova živine iz objekta „B“ i jednog humanog izolata *Campylobacter coli*.
9. Opadajući niz osetljivosti na antimikrobne lekove *Campylobacter jejuni* dobijen disk difuzionom metodom bio je: gentamicin (85,71%) > nalidiksinska kiselina > eritromicin > tetraciklini > ciprofloksacin (17,14%), a opadajući niz dobijen E-testom bio je: gentamicin (88,89%) > eritromicin > nalidiksinska kiselina > tetraciklini > ciprofloksacin (14,81%).
10. Opadajući niz osetljivosti na antimikrobne lekove *Campylobacter coli* dobijen disk difuzionom metodom i E-testom bio je identičan: gentamicin (82,76% DDM i 90,91% E-test) > eritromicin > tetraciklini > nalidiksinska kiselina > ciprofloksacin (3,45% DDM i 0% E-test).
11. Disk difuzionom metodom dokazano je da su pojedini izolati *Campylobacter jejuni*, odnosno *Campylobacter coli* bili rezistentni na dva ili više antibiotika.

8. Spisak literature

1. Abay, S., Kayman, T., Otlu, B., Hizlisoy, H., Aydin, F., & Ertas, N. (2014). Genetic diversity and antibiotic resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry and humans in Turkey. *International journal of food microbiology*, 178, 29-38.
2. Abd, M. T., & Al-Nasrawi, H. A. (2015). Identification of *Campylobacter jejuni* in poultry products by Real-Time PCR in Al-Muthanna province. *Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 14(2), 1-6.
3. Adak, G. K., Long, S. M., & O'brien, S. J. (2002). Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut*, 51(6), 832-841.
4. Agunos, A., Léger, D., Avery, B. P., Parmley, E. J., Deckert, A., Carson, C. A., & Dutil, L. (2013). Ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. in retail chicken, western Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 19(7), 1121.
5. Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128(6), 1037-1050.
6. Allen, V. M., Bull, S. A., Corry, J. E. L., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J. A., ... & Humphrey, T. J. (2007). *Campylobacter* spp. contamination of chicken carcasses during processing in relation to flock colonisation. *International journal of food microbiology*, 113(1), 54-61.
7. Amour, C., Gratz, J., Mduma, E., Svensen, E., Rogawski, E. T., McGrath, M., ... & Mahfuz, M. (2016). Epidemiology and impact of *Campylobacter* infection in children in 8 low-resource settings: results from the MAL-ED study. *Clinical Infectious Diseases*, 63(9), 1171-1179.
8. Anon, 2003. Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off J Eur Union*, 50.
9. Anon, 2011. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2011). Vital signs: incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food--foodborne diseases active surveillance network, 10 US sites, 1996-2010. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 60(22), 749.

10. Anon, 2012. DANMAP 2012: Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Foods and Humans in Denmark. Copenhagen, Denmark: The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Program (2012).
11. Anon, 2015a. <https://old.food.gov.uk/news-updates/news/2015/14003/campylobacter-survey-results-12months>
12. Anon, 2015b. www.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/campyloconf.pdf.
13. Anon, 2015c. www.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/campytarget.pdf.
14. Anon, 2015d. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2014. godinu, Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, Centar za prevenciju i kontrolu bolesti.
15. Anon, 2016. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2015. godinu, Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, Centar za prevenciju i kontrolu bolesti.
16. Anon, 2017. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2016. godinu, Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, Centar za prevenciju i kontrolu bolesti.
17. Anon, 2018. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2017. godinu, Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, Centar za prevenciju i kontrolu bolesti
18. Anon, 2019. Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2018. godinu, Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, Centar za prevenciju i kontrolu bolesti.
19. Asakura, H., Sakata, J., Nakamura, H., Yamamoto, S., & Murakami, S. (2019). Phylogenetic Diversity and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter coli* from Humans and Animals in Japan. *Microbes and environments*, ME18115.
20. Baffone, W., Casaroli, A., Citterio, B., Pierfelici, L., Campana, R., Vittoria, E., ... & Donelli, G. (2006). *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. *International journal of food microbiology*, 107(1), 83-91.
21. Baig, A., McNally, A., Dunn, S., Paszkiewicz, K. H., Corander, J., & Manning, G. (2015). Genetic import and phenotype specific alleles associated with hyper-invasion in *Campylobacter jejuni*. *BMC genomics*, 16(1), 852.

22. Baker, M., Wilson, N., Ikram, R., Chambers, S., Shoemack, P., & Cook, G. (2006). Regulation of chicken contamination urgently needed to control New Zealand's serious campylobacteriosis epidemic. *The New Zealand Medical Journal*, 119(1243):U2264
23. Barrett, T. J., Patton, C. M., & Morris, G. K. (1988). Differentiation of *Campylobacter* species using phenotypic characterization. *Laboratory Medicine*, 19(2), 96-102.
24. Berndtson, E., Tivemo, M., & Engvall, A. (1992). Distribution and numbers of *Campylobacter* in newly slaughtered broiler chickens and hens. *International journal of food microbiology*, 15(1-2), 45-50.
25. Berrang, M. E., & Dickens, J. A. (2000). Presence and level of *Campylobacter* spp. on broiler carcasses throughout the processing plant. *Journal of Applied Poultry Research*, 9(1), 43-47.
26. Bester, L. A., & Essack, S. Y. (2012). Observational study of the prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. from different poultry production systems in KwaZulu-Natal, South Africa. *Journal of food protection*, 75(1), 154-159.
27. Bolinger H, Kathariou S. (2017). The current state of macrolide resistance in *Campylobacter* spp.: trends and impacts of resistance mechanisms. *Appl Environ Microbio*, 83(12), e00416-17.
28. Bolton, D. J. (2015). *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food microbiology*, 48, 99-108.
29. Bolton, F. J., Sails, A. D., Fox, A. J., Wareing, D. R. A., & Greenway, D. L. A. (2002). Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in foods by enrichment culture and polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of food protection*, 65(5), 760-767.
30. Butzler, J. P., Dekeyser, P., Detrain, M., & Dehaen, F. (1973). Related vibrio in stools. *The Journal of pediatrics*, 82(3), 493-495.
31. Byarugaba, D. K. (2010). Mechanisms of antimicrobial resistance. In *Antimicrobial Resistance in Developing Countries* (pp. 15-26). Springer, New York, NY.
32. Carron, M., Alarcon, P., Karani, M., Muinde, P., Akoko, J., Onono, J., ... & Rushton, J. (2017). The broiler meat system in Nairobi, Kenya: Using a value chain framework to understand animal and product flows, governance and sanitary risks. *Preventive veterinary medicine*, 147, 90-99.

33. CDC NARMS, 2013, National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria: Human Isolates Final Report in 2011. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2013.
34. Cha, W., Mosci, R., Wengert, S. L., Singh, P., Newton, D. W., Salimnia, H., ... & Manning, S. D. (2016). Antimicrobial susceptibility profiles of human *Campylobacter jejuni* isolates and association with phylogenetic lineages. *Frontiers in microbiology*, 7, 589.
35. Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Rainer, J. E., Nguyen, P. N., & Thomas, C. (1988). Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic acids research*, 16(23), 11141-11156.
36. Chang, Y. C., Tien, N., Yang, J. S., Lu, C. C., Tsai, F. J., Huang, T. J., & Wang, I. K. (2017). Class 1 integrons and plasmid-mediated multiple resistance genes of the *Campylobacter* species from pediatric patient of a university hospital in Taiwan. *Gut pathogens*, 9(1), 50.
37. Chukwu, M. O., Abia, A. L. K., Ubomba-Jaswa, E., Obi, L., & Dewar, J. B. (2019). Characterization and Phylogenetic Analysis of *Campylobacter* Species Isolated from Paediatric Stool and Water Samples in the Northwest Province, South Africa. *International journal of environmental research and public health*, 16(12), 2205.
38. Cody, A. J., Clarke, L., Bowler, I. C., & Dingle, K. E. (2010). Ciprofloxacin-resistant campylobacteriosis in the UK. *The Lancet*, 376(9757), 1987.
39. Colles, F. M., McCarthy, N. D., Sheppard, S. K., Layton, R., & Maiden, M. C. (2010). Comparison of *Campylobacter* populations isolated from a free-range broiler flock before and after slaughter. *International journal of food microbiology*, 137(2-3), 259-264.
40. Collett, S. R. (2012). Nutrition and wet litter problems in poultry. *Animal feed science and technology*, 173(1-2), 65-75.
41. Corry, J. E., Post, D. E., Colin, P., & Laisney, M. J. (1995). Culture media for the isolation of campylobacters. In *Progress in industrial microbiology* (Vol. 34, pp. 129-162). Elsevier.
42. Datta, S., Niwa, H., & Itoh, K. (2003). Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *Journal of medical microbiology*, 52(4), 345-348.

-
43. De Boer, P., Rahaoui, H., Leer, R. J., Montijn, R. C., & Van der Vossen, J. M. B. M. (2015). Real-time PCR detection of *Campylobacter* spp.: a comparison to classic culturing and enrichment. *Food microbiology*, *51*, 96-100.
44. Dearlove, B. L., Cody, A. J., Pascoe, B., Méric, G., Wilson, D. J., & Sheppard, S. K. (2016). Rapid host switching in generalist *Campylobacter* strains erodes the signal for tracing human infections. *The ISME journal*, *10*(3), 721-729.
45. Debruyne, L., Gevers, D., & Vandamme, P. (2008). Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In *Campylobacter, Third Edition* (pp. 3-25). American Society of Microbiology.
46. Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G., & Colin, P. (1999). Development of am-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in applied microbiology*, *29*(6), 406-410.
47. Di Giannatale, E., Calistri, P., Di Donato, G., Decastelli, L., Goffredo, E., Adriano, D., ... & Marfoglia, C. (2019). Thermotolerant *Campylobacter* spp. in chicken and bovine meat in Italy: Prevalence, level of contamination and molecular characterization of isolates. *PloS one*, *14*(12).
48. Dingle, K. E., Clarke, L., & Bowler, I. C. J. W. (2005). Ciprofloxacin resistance among human *Campylobacter* isolates 1991–2004: an update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *56*(2), 435-437.
49. Dingle, K. E., Colles, F. M., Wareing, D. R. A., Ure, R., Fox, A. J., Bolton, F. E., ... & Maiden, M. C. J. (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of clinical microbiology*, *39*(1), 14-23.
50. Dryden, M. S., Gabb, R. J., & Wright, S. K. (1996). Empirical Treatment of Severe Acute Community-Acquired Gastroenteritis with Ciprofloxacin. *Clinical infectious diseases*, *22*(6), 1019-1025.
51. Eberle, K. N., & Kiess, A. S. (2012). Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. *Poultry science*, *91*(1), 255-264.
52. Economou, V., Zisides, N., Gousia, P., Petsios, S., Sakkas, H., Soutos, N., & Papadopoulou, C. (2015). Prevalence and antimicrobial profile of *Campylobacter* isolates from free-range and conventional farming chicken meat during a 6-year survey. *Food Control*, *56*, 161-168.

-
53. EFSA, 2005. European Food Safety Authority. (2005). Scientific Report of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to *Campylobacter* in animals and foodstuffs. Annex to *The EFSA Journal 2005*; 173, 1 – 105.
 54. EFSA, 2008. European Food Safety Authority. (2008). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *EFSA Journal 2008*; 765, 1-87.
 55. EFSA, 2010. European Food Safety Authority. (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, Part A: *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA Journal*, 8(3), 1-100.
 56. EFSA, 2011. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (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.
 57. EFSA, 2012a. European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2012). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food- borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3), 2597.
 58. EFSA, 2012b. European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2012). The European Union Summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. *EFSA Journal*, 10(3), 2598.
 59. EFSA, 2013a. European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11(4), 3129.
 60. EFSA, 2013b. European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2013). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2011. *EFSA Journal*, 11(5), 3196.
 61. EFSA, 2015. European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food- borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13(12), 4329.

-
62. EFSA, 2016. European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2016). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), 4634.
63. EFSA, 2017. European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food- borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12), e05077.
64. EFSA, 2018a. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food- borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), e05500.
65. EFSA, 2018b. European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA Journal*, 16(2), e05182.
66. EFSA, 2019. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 17(12), e05926.
67. EFSA, 2020. European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA Journal*, 18(3), e06007.
68. Engberg, J., Aarestrup, F. M., Taylor, D. E., Gerner-Smidt, P., & Nachamkin, I. (2001). Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerging infectious diseases*, 7(1), 24.
69. Enright, M. C., & Spratt, B. G. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends in microbiology*, 7(12), 482-487.
70. Esson, D., Mather, A. E., Scanlan, E., Gupta, S., De Vries, S. P., Bailey, D., ... & Mastroeni, P. (2016). Genomic variations leading to alterations in cell morphology of *Campylobacter* spp. *Scientific reports*, 6, 38303.

71. Facciola, A., Riso, R., Avventuroso, E., Visalli, G., Delia, S. A., & Laganà, P. (2017). Campylobacter: from microbiology to prevention. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 58(2), E79.
72. FDA NARMS, 2013.. National Antimicrobial Resistance Monitoring System Retail Meat Annual Report, 2011.
73. Fernández, H., Vera, F., Villanueva, M. P., & García, A. (2008). Occurrence of Campylobacter species in healthy well-nourished and malnourished children. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 56-58.
74. Fitzgerald, C., Whichard, J., & Fields, P. I. (2008). The Genus Campylobacter. In *Practical Handbook of Microbiology* (pp. 583-598). CRC Press.
75. François, R., Yori, P. P., Rouhani, S., Salas, M. S., Olortegui, M. P., Trigo, D. R., ... & Gregory, M. J. (2018). The other Campylobacters: Not innocent bystanders in endemic diarrhea and dysentery in children in low income settings. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(2), e0006200.
76. Fung, D. Y. (2002). Predictions for rapid methods and automation in food microbiology. *Journal of AOAC International*, 85(4), 1000-1002.
77. Ge, B., Wang, F., Sjölund-Karlsson, M., & McDermott, P. F. (2013). Antimicrobial resistance in Campylobacter: susceptibility testing methods and resistance trends. *Journal of microbiological methods*, 95(1), 57-67.
78. Geissler, A. L., Bustos Carrillo, F., Swanson, K., Patrick, M. E., Fullerton, K. E., Bennett, C., ... & Mahon, B. E. (2017). Increasing Campylobacter infections, outbreaks, and antimicrobial resistance in the United States, 2004–2012. *Clinical Infectious Diseases*, 65(10), 1624-1631.
79. Ghosh, R., Uppal, B., Aggarwal, P., Chakravarti, A., & Jha, A. K. (2013). Increasing antimicrobial resistance of Campylobacter jejuni isolated from paediatric diarrhea cases in a tertiary care hospital of New Delhi, India. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 7(2), 247.
80. Gilbert, M., Godschalk, P. C., Karwaski, M. F., Ang, C. W., van Belkum, A., Li, J., ... & Endtz, H. P. (2004). Evidence for acquisition of the lipooligosaccharide biosynthesis locus in Campylobacter jejuni GB11, a strain isolated from a patient with Guillain-Barré syndrome, by horizontal exchange. *Infection and immunity*, 72(2), 1162-1165.

81. Guyard-Nicodème, M., Rivoal, K., Houard, E., Rose, V., Quesne, S., Mourand, G., ... & Chemaly, M. (2015). Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in French retail outlets. *International journal of food microbiology*, *203*, 8-14.
82. Habib, I., Sampers, I., Uyttendaele, M., Berkvens, D., & De Zutter, L. (2008). Performance characteristics and estimation of measurement uncertainty of three plating procedures for *Campylobacter* enumeration in chicken meat. *Food microbiology*, *25*(1), 65-74.
83. Han, Z., Pielsticker, C., Gerzova, L., Rychlik, I., & Rautenschlein, S. (2016). The influence of age on *Campylobacter jejuni* infection in chicken. *Developmental & Comparative Immunology*, *62*, 58-71.
84. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, *6*(10), 986-994.
85. Hofshagen, M., Tarpai, A., & Opheim, M. (2011). The surveillance and control programme for *Campylobacter* spp. in broiler flocks in Norway 2011. Surveillance and control programmes for terrestrial and aquatic animals in Norway. Annual report 2011. Oslo: Norwegian Veterinary Institute 2012.
86. Humphrey, T., O'Brien, S., & Madsen, M. (2007). *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. *International journal of food microbiology*, *117*(3), 237-257.
87. Ioannidou, V., Ioannidis, A., Magiorkinis, E., Bagos, P., Nicolaou, C., Legakis, N., & Chatzipanagiotou, S. (2013). Multilocus sequence typing (and phylogenetic analysis) of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from clinical cases in Greece. *BMC research notes*, *6*(1), 359.
88. Javid, M. H. (2019). *Campylobacter* infections. *Medscape Reference Drugs & Diseases, Infectious Disease*.
89. Jeffs, E., Williman, J., Martin, N., Brunton, C., & Walls, T. (2019). Epidemiology of *Campylobacter* gastroenteritis in New Zealand children and the effect of the *Campylobacter* strategy: a 20-year observational study. *The Pediatric infectious disease journal*, *38*(6), 569-576.
90. Jensen, A. N., Andersen, M. T., Dalsgaard, A., Baggesen, D. L., & Nielsen, E. M. (2005). Development of real-time PCR and hybridization methods for detection and identification of

- thermophilic *Campylobacter* spp. in pig faecal samples. *Journal of applied microbiology*, 99(2), 292-300.
91. Jezdimirovic, M. B. (2000). Veterinarska farmakologija.
92. Kanaan, M. H. G., & Abdulwahid, M. T. (2019). Prevalence Rate, Antibiotic Resistance and Biotyping of Thermotolerant *Campylobacter* Isolated from Poultry Products Vended in Wasit Markets. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 7(3), 905-917.
93. Kanaan, M. H., & Khashan, H. T. (2018). Prevalence of multidrug resistant thermotolerant species of *Campylobacter* in Retail Frozen Chicken meat in Baghdad Province. *Curr Res Microbiol Biotechnol*, 6(1), 1431-1440.
94. Kayman, T., Abay, S., & Hızlısoy, H. (2013). Identification of *Campylobacter* spp. isolates with phenotypic methods and multiplex polymerase chain reaction and their antibiotic susceptibilities. *Mikrobiyoloji bulteni*, 47(2), 230-239.
95. Kayman, T., Abay, S., Aydın, F., & Şahin, O. (2019). Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from humans with diarrhoea in Turkey. *Journal of Medical Microbiology*, 68(2), 136-142.
96. Kiess, A. S., Parker, H. M., & McDaniel, C. D. (2010). Evaluation of different selective media and culturing techniques for the quantification of *Campylobacter* ssp. from broiler litter. *Poultry science*, 89(8), 1755-1762.
97. Kittl, S., Kuhnert, P., Hächler, H., & Korczak, B. M. (2011). Comparison of genotypes and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and slaughtered chickens in Switzerland. *Journal of applied microbiology*, 110(2), 513-520.
98. Konkel, M. E., Monteville, M. R., Rivera-Amill, V., & Joens, L. A. (2001). The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. *Current issues in intestinal microbiology*, 2(2), 55-71.
99. Kotloff, K. L., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Nataro, J. P., Farag, T. H., Van Eijk, A., ... & Saha, D. (2012). The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) of diarrheal disease in infants and young children in developing countries: epidemiologic and clinical methods of the case/control study. *Clinical infectious diseases*, 55(suppl_4), S232-S245.
100. Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., & Larson, E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public health reports*, 127(1), 4-22.

101. Lastovica, A. J. (2006, May). Antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni*, *C. concisus* and *C. upsaliensis* isolates from paediatric patients in Cape Town, South Africa, 1998–2005. In *106th General Meeting of the American Society for Microbiology, Orlando FL*.
102. Lehtopolku, M., Nakari, U. M., Kotilainen, P., Huovinen, P., Siitonen, A., & Hakanen, A. J. (2010). Antimicrobial susceptibilities of multidrug-resistant *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains: in vitro activities of 20 antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*(3), 1232-1236.
103. Levin, R. E. (2007). *Campylobacter jejuni*: a review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. *Food Biotechnology*, *21*(4), 271-347.
104. Lindqvist, R., & Lindblad, M. (2008). Quantitative risk assessment of thermophilic *Campylobacter* spp. and cross-contamination during handling of raw broiler chickens evaluating strategies at the producer level to reduce human campylobacteriosis in Sweden. *International journal of food microbiology*, *121*(1), 41-52.
105. Linton, D., Lawson, A. J., Owen, R. J., & Stanley, J. P. C. R. (1997). PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *Journal of clinical microbiology*, *35*(10), 2568-2572.
106. Linton, D., Owen, R. J., & Stanley, J. (1996). Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals. *Research in microbiology*, *147*(9), 707-718.
107. Maćkiw, E., Korsak, D., Rzewuska, K., Tomczuk, K., & Rozynek, E. (2012). Antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from food in Poland. *Food Control*, *23*(2), 297-301.
108. Maiden, M. C. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, *60*, 561-588.
109. Marotta, F., Garofolo, G., Di Donato, G., Aprea, G., Platone, I., Cianciavichia, S., ... & Di Giannatale, E. (2015). Population diversity of *Campylobacter jejuni* in poultry and its dynamic of contamination in chicken meat. *BioMed research international*, 2015.

-
110. Mason, J., Iturriza-Gomara, M., O'Brien, S. J., Ngwira, B. M., Dove, W., Maiden, M. C., & Cunliffe, N. A. (2013). Campylobacter infection in children in Malawi is common and is frequently associated with enteric virus co-infections. *PloS one*, 8(3).
111. Mattheus, W., Botteldoorn, N., Heylen, K., Pochet, B., & Dierick, K. (2012). Trend analysis of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from Belgian pork and poultry meat products using surveillance data of 2004–2009. *Foodborne pathogens and disease*, 9(5), 465-472.
112. Mbewe, M., Mabote, K.I., Ateba, C.N. (2014). Prevalence of *Campylobacter* Contamination in Fresh Chicken Meat and Milk Obtained from Markets in the North-West Province, South Africa. *J Hum Ecol.* 2014;(May).
113. McCarthy, N. D., Gillespie, I. A., Lawson, A. J., Richardson, J., Neal, K. R., Hawtin, P. R., ... & O'BRIEN, S. J. (2012). Molecular epidemiology of human *Campylobacter jejuni* shows association between seasonal and international patterns of disease. *Epidemiology & Infection*, 140(12), 2247-2255.
114. Mezher, Z., Saccares, S., Marcianò, R., De Santis, P., Rodas, E. M. F., De Angelis, V., & Condoleo, R. (2016). Occurrence of *Campylobacter* spp. in poultry meat at retail and processing plants' levels in Central Italy. *Italian journal of food safety*, 5(1).
115. Miller, W. G., On, S. L., Wang, G., Fontanoz, S., Lastovica, A. J., & Mandrell, R. E. (2005). Extended multilocus sequence typing system for *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. helveticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2315-2329.
116. Moore, J. E., Corcoran, D., Dooley, J. S., Fanning, S., Lucey, B., Matsuda, M., ... & O'Riordan, L. (2005). *Campylobacter*. *Veterinary research*, 36(3), 351-382.
117. Moran, L., Scates, P. A. M., & Madden, R. H. (2009). Prevalence of *Campylobacter* spp. in raw retail poultry on sale in Northern Ireland. *Journal of Food Protection*, 72(9), 1830-1835.
118. Mossong, J., Mughini-Gras, L., Penny, C., Devaux, A., Olinger, C., Losch, S., ... & Ragimbeau, C. (2016). Human campylobacteriosis in Luxembourg, 2010–2013: a case-control study combined with multilocus sequence typing for source attribution and risk factor analysis. *Scientific reports*, 6, 20939.
119. Mourkas, E., Florez- Cuadrado, D., Pascoe, B., Calland, J. K., Bayliss, S. C., Mageiros, L., ... & Ugarte- Ruiz, M. (2019). Gene pool transmission of multidrug resistance among

- Campylobacter from livestock, sewage and human disease. *Environmental microbiology*, 21(12), 4597-4613.
120. Nachamkin, I., Allos, B. M., & Ho, T. W. (2000). Campylobacter jejuni infection and the association with Guillain-Barré syndrome. *Campylobacter, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC*, 155-175.
121. Natsos, G., Mouttotou, N. K., Ahmad, S., Kamran, Z., Ioannidis, A., & Koutoulis, K. C. (2019). The genus Campylobacter: detection and isolation methods, species identification & typing techniques. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 70(1), 1327-1338.
122. Nicorici, G., & Ghodduci, H. B. (2017). Prevalence of Campylobacter contamination in raw chicken and chicken liver at retail. *Food Saf. Mag*, 23(2), 44-49.
123. Nobile, C. G., Costantino, R., Bianco, A., Pileggi, C., & Pavia, M. (2013). Prevalence and pattern of antibiotic resistance of Campylobacter spp. in poultry meat in Southern Italy. *Food Control*, 32(2), 715-718.
124. On, S. L. (1996). Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(3), 405-422.
125. On, S. L. (2001). Taxonomy of Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Journal of Applied Microbiology*, 90(S6), 1S-15S.
126. On, S. L. (2013). Isolation, identification and subtyping of Campylobacter: where to from here?. *Journal of microbiological methods*, 95(1), 3-7.
127. On, S. L., & Jordan, P. J. (2003). Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 330-336.
128. Oncul, O., Zarakolu, P., Oncul, O., & Gur, D. (2003). Antimicrobial susceptibility testing of Campylobacter jejuni: a comparison between Etest and agar dilution method. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 45(1), 69-71.
129. Pan, H., Ge, Y., Xu, H., Zhang, J., Kuang, D., Yang, X., ... & Meng, J. (2016). Molecular characterization, antimicrobial resistance and Caco-2 cell invasion potential of Campylobacter

- jejuni/coli from young children with diarrhea. *The Pediatric infectious disease journal*, 35(3), 330-334.
130. Panzenhagen, P. H. N., Aguiar, W. S., da Silva Frasão, B., de Almeida Pereira, V. L., da Costa Abreu, D. L., dos Prazeres Rodrigues, D., ... & de Aquino, M. H. C. (2016). Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Control*, 61, 243-247.
131. Park, S. F. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International journal of food microbiology*, 74(3), 177-188.
132. Pascoe, B., Méric, G., Murray, S., Yahara, K., Mageiros, L., Bowen, R., ... & Sheppard, S. K. (2015). Enhanced biofilm formation and multi-host transmission evolve from divergent genetic backgrounds in *Campylobacter jejuni*. *Environmental microbiology*, 17(11), 4779-4789.
133. Pearson, A. D., & Healing, T. D. (1992). The surveillance and control of campylobacter infection. *Communicable disease report. CDR review*, 2(12), R133-9.
134. Petrović, J., Baltić, M., Čupić, V., Stefanović, S., & Stojanović, D. (2006). Residues of enrofloxacin and its main metabolite ciprofloxacin in broiler chickens. *Acta veterinaria-Beograd*, 56(5-6), 497-506.
135. Pham, N. T. K., Thongprachum, A., Tran, D. N., Nishimura, S., Shimizu-Onda, Y., Trinh, Q. D., ... & Okitsu, S. (2016). Antibiotic Resistance of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* Isolated from Children with Diarrhea in Thailand and Japan. *Japanese journal of infectious diseases*, 69(1), 77-79.
136. Platts-Mills, J. A., Babji, S., Bodhidatta, L., Gratz, J., Haque, R., Havt, A., ... & Shakoor, S. (2015). Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). *The Lancet Global Health*, 3(9), e564-e575.
137. Platts-Mills, J. A., Liu, J., Gratz, J., Mduma, E., Amour, C., Swai, N., ... & Lee, G. (2014). Detection of *Campylobacter* in stool and determination of significance by culture, enzyme immunoassay, and PCR in developing countries. *Journal of clinical microbiology*, 52(4), 1074-1080.

138. Pollett, S., Rocha, C., Zerpa, R., Patiño, L., Valencia, A., Camiña, M., ... & Calampa, C. (2012). Campylobacter antimicrobial resistance in Peru: a ten-year observational study. *BMC infectious diseases*, 12(1), 193.
139. Potturi-Venkata, L. P., Backert, S., Lastovica, A. J., Vieira, S. L., Norton, R. A., Miller, R. S., ... & Oyarzabal, O. A. (2007). Evaluation of different plate media for direct cultivation of Campylobacter species from live broilers. *Poultry science*, 86(7), 1304-1311.
140. Powledge, T. M. (2004). The polymerase chain reaction. *Advances in physiology education*, 28(2), 44-50.
141. Rautelin, H., Jusufovic, J., & Hänninen, M. L. (1999). Identification of hippurate-negative thermophilic campylobacters. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 35(1), 9-12.
142. Rodríguez-Lázaro, D., & Hernández, M. (2006). Molecular methodology in Food Microbiology diagnostics: trends and current challenges. In *13th World Congress of Food Science & Technology 2006* (pp. 643-643).
143. Sahin, O., Shen, Z., & Zhang, Q. (2017). Methods to study antimicrobial resistance in Campylobacter jejuni. In *Campylobacter jejuni* (pp. 29-42). Humana Press, New York, NY.
144. Sails, A. D., Fox, A. J., Bolton, F. J., Wareing, D. R., & Greenway, D. L. (2003). A real-time PCR assay for the detection of Campylobacter jejuni in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(3), 1383-1390.
145. Sakaridis, I., Papadopoulos, T., Boukouvala, E., Ekateriniadou, L., Samouris, G., & Zdragas, A. (2019). Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Molecular Typing of Thermophilic Campylobacter Spp. in a Greek Poultry Slaughterhouse. *Acta Veterinaria-Beograd*, 69(3), 325-339.
146. Samad, A., Abbas, F., Ahmed, Z., Akbar, A., Naeem, M., Sadiq, M. B., ... & Achakzai, S. K. (2019). Prevalence, antimicrobial susceptibility, and virulence of Campylobacter jejuni isolated from chicken meat. *Journal of food safety*, 39(2), e12600.
147. Samie, A., Ramalivhana, J., Igumbor, E. O., & Obi, C. L. (2007). Prevalence, haemolytic and haemagglutination activities and antibiotic susceptibility profiles of Campylobacter spp. isolated from human diarrhoeal stools in Vhembe District, South Africa. *Journal of health, population, and nutrition*, 25(4), 406.

148. Scallan, E., Crim, S. M., Runkle, A., Henao, O. L., Mahon, B. E., Hoekstra, R. M., & Griffin, P. M. (2015). Bacterial enteric infections among older adults in the united states: Foodborne diseases active surveillance network, 1996–2012. *Foodborne pathogens and disease*, *12*(6), 492-499.
149. Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., ... & Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging infectious diseases*, *17*(1), 7.
150. Schiaffino, F., Colston, J. M., Paredes-Olortegui, M., François, R., Pisanic, N., Burga, R., ... & Kosek, M. N. (2019). Antibiotic resistance of Campylobacter species in a pediatric cohort study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *63*(2), e01911-18.
151. Seliwiorstow, T., Baré, J., Van Damme, I., Uyttendaele, M., & De Zutter, L. (2015). Campylobacter carcass contamination throughout the slaughter process of Campylobacter-positive broiler batches. *International journal of food microbiology*, *194*, 25-31.
152. Sheppard, S. K., & Maiden, M. C. (2015). The evolution of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a018119.
153. Sheppard, S. K., Dallas, J. F., Wilson, D. J., Strachan, N. J., McCarthy, N. D., Jolley, K. A., ... & Maiden, M. C. (2010). Evolution of an agriculture-associated disease causing Campylobacter coli clade: evidence from national surveillance data in Scotland. *PLoS one*, *5*(12).
154. Shin, E., Oh, Y., Kim, M., Jung, J., & Lee, Y. (2013). Antimicrobial resistance patterns and corresponding multilocus sequence types of the Campylobacter jejuni isolates from human diarrheal samples. *Microbial Drug Resistance*, *19*(2), 110-116.
155. Shobo, C. O., Bester, L. A., Baijnath, S., Somboro, A. M., Peer, A. K., & Essack, S. Y. (2016). Antibiotic resistance profiles of Campylobacter species in the South Africa private health care sector. *The Journal of Infection in Developing Countries*, *10*(11), 1214-1221.
156. 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*, 200.
157. Sinulingga, T. S., Aziz, S. A., Bitrus, A. A., Zunita, Z., & Abu, J. (2020). Occurrence of Campylobacter species from broiler chickens and chicken meat in Malaysia. *Tropical animal health and production*, *52*(1), 151-157.

158. Skarp, C. P. A., Hänninen, M. L., & Rautelin, H. I. K. (2016). Campylobacteriosis: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 103-109.
159. Skirrow, M. B. (1977). Campylobacter enteritis: a "new" disease. *Br Med J*, 2(6078), 9-11.
160. Spencer, S. E. F., Marshall, J., Pirie, R., Campbell, D., Baker, M. G., & French, N. P. (2012). The spatial and temporal determinants of campylobacteriosis notifications in New Zealand, 2001–2007. *Epidemiology & Infection*, 140(9), 1663-1677.
161. Spickler, A. R. (2013). Zoonotic campylobacteriosis. *The Center for Food Security & Public Health*.
162. SRPS ISO 2017a. SRPS EN ISO 10272-1:2017. Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Campylobacter* spp. – deo 1: Metoda otkrivanja.
163. SRPS ISO 2017b. SRPS EN ISO 10272-2:2017. Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Campylobacter* spp. – deo 2: Tehnika brojanja kolonija.
164. Stjepanović, A., Marković, B., & Vesković Moračanin, S. (2007). Molekularno-biološke metode u mikrobiološkoj kontroli mesa i proizvoda od mesa. *Tehnologija mesa*, 48(1-2), 123-130.
165. Stockdale, A. J., Beeching, N. J., Anson, J., & Beadsworth, M. B. (2016). Emergence of extensive fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* gastroenteritis in Liverpool, UK. *Journal of Infection*, 72(3), 398-400.
166. Strachan, N. J. C., Rotariu, O., Smith-Palmer, A., Cowden, J., Sheppard, S. K., O'Brien, S. J., ... & Reid, S. W. J. (2013). Identifying the seasonal origins of human campylobacteriosis. *Epidemiology & Infection*, 141(6), 1267-1275.
167. Suzuki, H., & Yamamoto, S. (2009). Campylobacter contamination in retail poultry meats and by-products in the world: a literature survey. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(3), 255-261.
168. Torok, V. A., Hughes, R. J., Ophel-Keller, K., Ali, M., & MacAlpine, R. (2009). Influence of different litter materials on cecal microbiota colonization in broiler chickens. *Poultry Science*, 88(12), 2474-2481.
169. Torralbo, A., Borge, C., García-Bocanegra, I., Méric, G., Perea, A., & Carbonero, A. (2015). Higher resistance of *Campylobacter coli* compared to *Campylobacter jejuni* at chicken slaughterhouse. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 39, 47-52.

170. Uaboi-Egbenni, P. O., Bessong, P. O., Samie, A., & Obi, C. L. (2012). Potentially pathogenic *Campylobacter* species among farm animals in rural areas of Limpopo province, South Africa: A case study of chickens and cattles. *Afr. J. Microbiol. Res*, 6, 2835-2843.
171. US FDA (Food and Drug Administration). (2001). Risk Assessment on the Human Health Impact of Fluoroquinolone Resistant *Campylobacter* Associated with Consumption of Chicken. October 2000, revised January 2001. www.fda.gov/cvm/.
172. van Samkar, A., Brouwer, M. C., van der Ende, A., & van de Beek, D. (2016). *Campylobacter fetus* meningitis in adults: report of 2 cases and review of the literature. *Medicine*, 95(8).
173. Vandamme, P., & De Ley, J. (1991). Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 41(3), 451-455.
174. Vandenberg, O., Houf, K., Douat, N., Vlaes, L., Retore, P., Butzler, J. P., & Dediste, A. (2006). Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-jejuni/coli *Campylobacter* and *Arcobacter* from Belgium. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(5), 908-913.
175. Vandenberg, O., Skirrow, M. B., & Butzler, J. P. (2005). *Campylobacter* and *Acrobacter* In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Bacteriology, Vol. 2.
176. Vencia, W., Nogarol, C., Bianchi, D. M., Gallina, S., Zuccon, F., Adriano, D., ... & Decastelli, L. (2014). Validation according to ISO 16140: 2003 of a commercial real-time PCR-based method for detecting *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* in foods. *International journal of food microbiology*, 177, 78-80.
177. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., & Lee, T. V. D. (1995). van de, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23(21), 4407-4414.
178. Wagenaar, J. A., Jacobs-Reitsma, W., Hofshagen, M., & Newell, D. (2008). Poultry colonization with *Campylobacter* and its control at the primary production level. In *Campylobacter, Third Edition* (pp. 667-678). American Society of Microbiology.
179. Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, 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.

180. Wang, Y., Dong, Y., Deng, F., Liu, D., Yao, H., Zhang, Q., ... & Shen, Z. (2016). Species shift and multidrug resistance of *Campylobacter* from chicken and swine, China, 2008–14. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71*(3), 666-669.
181. Wassenaar, T. M., & Blaser, M. J. (1999). Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes and Infection*, *1*(12), 1023-1033.
182. WHO, 2013. World Health Organization. (2013). The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9-11 July 2012.
183. WHO, 2018. World Health Organization. (2018). *Campylobacter* - fact sheet -, January 2018.
184. Wieczorek, K., & Osek, J. (2013). Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed research international*, *2013*:340605.
185. Wieczorek, K., & Osek, J. (2015). A five-year study on prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* from poultry carcasses in Poland. *Food microbiology*, *49*, 161-165.
186. Wieczorek, K., Denis, E., & Osek, J. (2015). Comparative analysis of antimicrobial resistance and genetic diversity of *Campylobacter* from broilers slaughtered in Poland. *International journal of food microbiology*, *210*, 24-32.
187. Wiedmann, M. (2002). Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International*, *85*(2), 524-531.
188. Yao, R., Burr, D. H., Doig, P., Trust, T. J., Niu, H., & Guerry, P. (1994). Isolation of motile and non- motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Molecular microbiology*, *14*(5), 883-893.
189. Young, K. T., Davis, L. M., & DiRita, V. J. (2007). *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(9), 665-679.
190. Zhang, Q., & Sahin, O. (2020). *Campylobacteriosis*. *Diseases of poultry*, 754-769.
191. Zhao, S., Mukherjee, S., Chen, Y., Li, C., Young, S., Warren, M., ... & McDermott, P. F. (2015). Novel gentamicin resistance genes in *Campylobacter* isolated from humans and retail meats in the USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(5), 1314-1321.
192. Zweifel, C., Althaus, D., & Stephan, R. (2015). Effects of slaughter operations on the microbiological contamination of broiler carcasses in three abattoirs. *Food Control*, *51*, 37-42.

Biografija

Jelena B. Jovanović je rođena 09.06.1976. godine u Beogradu. Osnovnu i srednju školu (gimnaziju) završila je u Beogradu. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 1995/1996. godine, a diplomirala je 2004. godine sa prosečnom ocenom 8,94. Doktorske akademske studije upisala je 2006. godine na Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, na Katedri za higijenu i tehnologiju mesa. Na doktorskim akademskim studijama položila je sve predviđene ispite, sa prosečnom ocenom 9,00. Kandidatkinja je reupisana na doktorske akademske studije školske 2017/2018. Od 2005. godine zaposlena je na Institutu za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu.

U periodu od 2008. do 2010. godine bila je učesnik na dva nacionalna projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: BTN 20122 „Monitoring vodenih ekosistema u cilju dobijanja higijenski ispravnih i kvalitetnih akvakulturnih proizvoda, konkurentnih tržištu EU“ i BTN 20132 „Ispitivanje činilaca od značaja za održivost ribe i odabranih proizvoda od ribe u prometu“. U periodu od 2010. do 2020. godine učesnik je na dva nacionalna projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: br. III 46009 „Unapređenje i razvoj higijenskih i tehnoloških postupaka u proizvodnji namirnica životinjskog porekla u cilju dobijanja kvalitetnih i bezbednih proizvoda konkurentnih na svetskom tržištu“ i br. TR 31083 „Smanjivanje sadržaja natrijuma u proizvodima od mesa – tehnološke mogućnosti, karakteristike kvaliteta i zdravstveni aspekti“.

Član je Komisije za standarde i srodne dokumente Instituta za standardizaciju Srbije, KS E034-17 Sistemi menadžmenta bezbednošću hrane, gde je učestvovala u prevođenju i donošenju srpskih verzija standarda za bezbednost hrane.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Јовановић

Број индекса 2017/5018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Учесталост налаза *Campylobacter* spp. на труповима живине и њихова осетљивост
на антимикробне лекове

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Јелена Јовановић

Број индекса 2017/5018

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: Учесталост налаза *Campylobacter* spp. на труповима живине и њихова осетљивост на антимицробне лекове

Ментори: проф. др Владо Теодоровић

др Весна Ђорђевић, научни саветник

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Учесталост налаза *Campylobacter* spp. на труповима живине и њихова осетљивост
на антимицробне лекове

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.