

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**

Jelena M. Petković

**ANALIZA RIZIKA PRISUSTVA
CAMPYLOBACTER JEJUNI U LANCU
PROIZVODNJE ŽIVINSKOG MESA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**

Jelena M. Petković

**ANALIZA RIZIKA PRISUSTVA
CAMPYLOBACTER JEJUNI U LANCU
PROIZVODNJE ŽIVINSKOG MESA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Jelena M. Petković

**RISK ANALYSIS OF
CAMPYLOBACTER JEJUNI
IN BROILER MEAT FOOD CHAIN**

PhD thesis

Belgrade, 2013.

MENTOR

**prof. dr Olivera Bunčić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine,
Beograd, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica**

ČLANOVI KOMISIJE

- 1. prof. dr Olivera Bunčić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine,
Beograd, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica**
- 2. prof. dr Vera Katić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine,
Beograd, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica**
- 3. dr Dragana Jošić, viši naučni saradnik, Institut za zemljište, Beograd,
Odeljenje genetike**
- 4. dr Zorica Lepšanović, viši naučni saradnik, Vojno-medicinska akademija,
Beograd, Institut za epidemiologiju**
- 5. dr Jelena Petrović, viši naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo
„Novi Sad“, Odeljenje za ispitivanje namirnica**

Želela bih da izrazim duboku zahvalnost prof dr Oliveri Bunčić, svom mentoru, za njeno vođstvo i potporu tokom čitavog rada. Naročito joj zahvaljujem za korisne diskusije koje su mi pomogle u usmeravanju istraživanja i pisanja rada.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Dragani Jošić bez čije pomoći bi sprovođenje oglednog dela i obrada rezultata iz oblasti molekularne genetike bili nemogući. Zahvaljujući njenom trudu i objašnjenjima fascinantni svet molekularne biologije mi je odškrinuo svoja vrata.

Članovi komisije za ocenu i odbranu doktorske disertacije mnogo su mi pomogli u brušenju i poliranju teksta, kao i u komentarisanju pojedinih dobijenih rezultata. Zahvaljujem im na korektnom i profesionalnom odnosu, kao i na pohvalama i kritikama koje su značajno uticale na oblikovanje ovog rada.

Tokom čitavog procesa izrade disertacije imala sam podršku kolektiva Veterinarskog specijalističkog instituta „Jagodina“ u Jagodini u kome sam zaposlena, a naročito podršku direktora instituta, dr Zorana Rašića. Bez razumevanja i pomoći kolega bilo bi teško prevladati sve prepreke na koje sam nailazila.

Svojoj porodici i prijateljima dugujem bezgraničnu zahvalnost za njihovu podršku i ohrabrenje tokom čitavog školovanja. Njihovo znanje i iskustvo, pomoć, pažnja i strpljenje su značajno doprineli mom ukupnom razvoju. Bez njihovog prisustva, te godine bile bi nepotpune.

Jagodina, septembar 2013.

ANALIZA RIZIKA PRISUSTVA *CAMPYLOBACTER JEJUNI* U LANCU PROIZVODNJE ŽIVINSKOG MESA

SAŽETAK: Kampilobakterioza je infektivno oboljenje ljudi koje uzrokuju termotolerantne vrste roda *Campylobacter*, prevashodno *C. jejuni* i *C. coli*. U savremenom svetu kampilobakterioza je vodeći uzročnik gastroenteritisa sa preko 200 000 obolelih na godišnjem nivou samo u Evropskoj uniji. Epidemiologija uzročnika nije u potpunosti razjašnjena, ali mnogobrojna istraživanja ukazuju na pileće meso kao jedan od glavnih izvora infekcije. U ovom istraživanju ispitano je prisustvo *Campylobacter* vrsta na teritoriji Republike Srbije, na farmama i klanicama živine, i izvršena tipizacija dobijenih izolata. Pregledano je 233 uzoraka poreklom od živine, od čega 190 sa klanica i 43 sa farmi. Ukupno je prikupljeno 48 *Campylobacter* spp. izolata, i to 43 sa klanica i 5 sa farmi. Takođe je ispitano 7 izolata poreklom od ljudi od kojih je 5 potvrđeno kao *Campylobacter* spp., a tipizirana su i 2 referentna soja *C. jejuni* ATCC 29428 i ATCC 33291. Izolati su potvrđeni do nivoa vrste multiplex-PCR metodom, a tipizacija je izvršena upotrebom Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) i Repetitive Sequence-Based PCR (rep-PCR) metoda uz upotrebu više prajmera. Kao visoko diskriminatorni pokazali su se RAPD prajmeri AP10, AK16 i DJP17, dok su RAPD prajmeri SPH1 i AG15) i rep-PCR prajmer (GTG)₅ bili umereno diskriminatorni. Ovi rezultati sugerišu da primena molekularnih metoda RAPD i rep-PCR može biti korisna za tipizaciju izolata *Campylobacter* vrsta, a dobijeni rezultati se mogu koristiti u epidemiološkim istraživanjima.

KLJUČNE REČI: kampilobakterioza, živinsko meso, *Campylobacter jejuni*, tipizacija, multiplex-PCR, RAPD, rep-PCR

NAUČNA OBLAST: veterinarske nauke

UŽA NAUČNA OBLAST: mikrobiologija

UDK BROJ:

**RISK ANALYSIS OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI*
IN BROILER MEAT FOOD CHAIN**

SUMMARY: Campylobacteriosis is infectious disease of humans caused by thermophilic *Campylobacter* species, mainly *C. jejuni* and *C. coli*. It is a leading cause of human gastroenteritis today with more than 200 000 cases per year in the European Union. The epidemiology of the agent is not completely cleared, but number of investigation indicates that broiler meat plays an important role in human infection. This investigation was performed in order to determine presence of *Campylobacter* spp. on the broiler farms and slaughterhouses and to establish the genetic profiles and connections between the isolates. 233 samples taken at broiler farms (43 samples) and slaughterhouses (190 samples) were investigated, as well as 7 human isolates and 2 reference strains *C. jejuni* ATCC 29428 and ATCC 33291. 43 isolates were collected on slaughterhouses and 5 on farms. 5 human isolates were tested. Strain identification was performed by multiplex-PCR analysis. Genotyping was performed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Repetitive Sequence-Based PCR (rep-PCR) with multiple primers. Best results were obtained with RAPD primers AP10, AK16 and DJP17. RAPD primers SPH1 and AG15, as well as rep-PCR primer (GTG)₅ were partly informative and could be used in combination with the previous. These results suggest that molecular techniques RAPD and rep-PCR could be used for genotyping of *Campylobacter* species and epidemiology of the agent.

KEY WORDS: campylobacteriosis, broiler meat, *Campylobacter jejuni*, typing, multiplex-PCR, RAPD, rep-PCR

SCIENCE: Veterinary science

SPECIFIC SCIENCE: Microbiology

No UDK:

SADRŽAJ

SKRAĆENICE I STRANI TERMINI	i
1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1 Taksonomske karakteristike roda	3
2.2 Putevi prenošenja	6
2.2.1 Način prenošenja infekcije na živinu	6
2.2.2 Način prenošenja infekcije na ljude	7
2.3 Meso živine kao izvor infekcija ljudi kampilobakterijama	8
2.4 Patogeneza infekcije kampilobakterijama	10
2.4.1 Pokterljivost i adhezija bakterija – prisustvo flagela	10
2.4.2 Invazivnost	11
2.4.3 Proizvodnja toksina	11
2.5 Kliničke manifestacije infekcije sa <i>Campylobacter jejuni</i> kod ljudi	12
2.6 Savremen pristup dijagnostifikovanju i identifikaciji sojeva <i>Campylobacter</i> spp	13
3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA	28
4. MATERIJAL I METODE	29
4.1 Plan istraživanja	29
4.2 Materijal	29
4.2.1 Uzorci za ispitivanje	29
4.2.2 Izolati <i>Campylobacter</i> spp.	31
4.2.3 Hranljive podloge i dodaci	32
4.2.4 Reagensi za molekularna ispitivanja	32
4.2.5 Oprema	33
4.3 Metode	33
4.3.1 Izolacija <i>Campylobacter</i> spp.	33
4.3.2 Biohemijska identifikacija izolata <i>Campylobacter</i> spp.	33

4.3.3	Priprema bakterijskih izolata za PCR	34
4.3.4	Protokoli za PCR	34
4.3.4.1	m-PCR	34
4.3.4.2	RAPD	35
4.3.4.3	rep-PCR	36
4.3.5	Vizuelizacija dobijenih PCR fragmenata	37
4.4	Kompjuterski programi korišćeni pri obradi dobijenih rezultata	38
4.4.1	Filogenetske analize	38
5.	REZULTATI	39
5.1	Prisustvo <i>Campylobacter</i> vrsta na klanici	39
5.2	Prisustvo <i>Campylobacter</i> vrsta na farmama živine	39
5.3	Rezultati molekularnih ispitivanja	44
5.3.1	Rezultati multiplex PCR analize	44
5.3.2	Rezultati RAPD analize	45
5.3.3	Rezultati rep-PCR analize	55
6.	DISKUSIJA	58
7.	ZAKLJUČAK I BUDUĆI RAD	78
LITERATURA	80
BIOGRAFIJA AUTORA		

SKRAĆENICE I STRANI TERMINI

EP – ekstracelularni polisaharid

LOS – lipooligopolisaharid

PCR – polymerasa chain reaction, reakcija lančane polimerizacije

Mbp – mega baznih parova

CG sadržaj – sadržaj citozin-guanin parova u genomu neke vrste

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism – polimorfizam dužine amplifikovanih fragmenata

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism – polimorfizam dužine restriktivnih fragmenata

PFGE – Pulse-field Gel Elektrophoresis – gel-elektroforeza u pulsnom polju

MLST – Multi Locus Sequence Typing – tipizacija sekvencioniranjem više lokusa

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA – proizvoljno umnožena polimorfna DNA

rep-PCR – Repetitive Sequence-Based PCR – PCR na bazi repetitivnih elemenata

m-PCR – multiplex PCR – simultano umnožavanje dve ili više DNA sekvenci u istoj PCR reakciji

1. UVOD

Kampilobakterioza je oboljenje ljudi, domaćih i divljih životinja uzrokovano bakterijama iz familije *Campylobacteriaceae*, rod *Campylobacter*. Narastajuća pojava kampilobakterioze tokom proteklih par decenija je postala ozbiljan problem širom sveta. Broj epidemija i još više sporadičnih slučajeva bolesti, se povećava. Pogođene su kako zemlje u razvoju, tako i razvijene zemlje.

Dijagnoza ovog patogena je vrlo teška zbog specijalnih uslova rasta koje zahteva i niske infektivne doze (Nogva *et al.*, 2000.). Tradicionalne tehnike za detekciju i tipizaciju obuhvataju uzgoj bakterija u hranljivim podlogama za obogaćenje ili selektivnim podlogama, biohemijske testove i različite tehnike tipizacije, kao što su Penner-ova tipizacija (Woodward & Rodgers, 2002.), Lior tipizacija (Woodward & Rodgers, 2002.), itd. Često se koriste i molekularne tehnike poput analize polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (Restriction fragment length polymorphism – RFLP) (Nachamkin *et al.*, 1993.), ili gel-elektroforeza u pulsnom polju (Pulsed field gel electrophoresis – PFGE) (Wassenaar & Newell, 2000.). Ove metode zahtevaju mnogo vremena za izvođenje, a rezultati nisu uvek pouzdani.

U današnje vreme sve više se koriste molekularne tehnike. To su lančane reakcije polimeraze: konvencionalni PCR (Polymerase chain reaction) (Denis *et al.*, 1999.) i „real-time“ PCR, sekvencioniranje gena, MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) masena spektrofotometrija (Kirpekar *et al.*, 1998.), DNK-DNK hibridizacija (Bustamante *et al.*, 1995.) itd. Neke od ovih tehnika su pogodnije za detekciju nego za tipizaciju ili epidemiološke studije.

Metode koje bi mogle obezbediti podatke o frekvenciji pojedinih alela genskih lokusa u populaciji još uvek nisu dostupne. Ukoliko se za tipizaciju koristi npr. MLST ciljaju se delovi genoma koji su visoko konzervisani (tzv. „house-keeping“ geni), pa se mogu registrovati promene koje nastaju na nivou nukleotida. Čak i male promene na nivou nukleotida (varijacija u samo nekoliko nukleotida) dovodi do stvaranja novih alelskih profila. Zato se ovom metodom ne mogu vršiti dugotrajna epidemiološka ispitivanja jer se promene relativno brzo nakupljaju i menjaju profil izolata.

PFGE metoda koristi se za razdvajanje velikih fragmenata DNA u pulsnom polju. Zahteva dugo vreme za izvođenje, hemija koja se koristi je skupa i

potrebno je da je izvode obučeni tehničari. Ipak, ona je često metoda izbora za tipizaciju bakterija, jer daje ponovljive profile u okviru iste laboratorije i može razlikovati genetički srodne sojeve. Za sad je nezamenljiva alatka u epidemiološkim studijama.

Dobre rezultate u tipizaciji *Campylobacter* vrsta dale su metode kod kojih se koriste proizvoljno dizajnirani prajmeri kao AFLP i RAPD. Kod AFLP metode prajmeri se dizajniraju na osnovu sekvenci enzima koji se koriste sa sečenjem DNA uz dodatak adapterskih sekvenci. Ova metoda je dosta zahtevna što se tiče rada i korišćene hemije, zahteva potpuno prečišćenu dvolančanu DNK i ne obezbeđuje podatke o stepenu ekspresije gena. RAPD metoda se zasniva na amplifikaciji fragmenata DNA upotrebom proizvoljno dizajniranih fragmenata. Prednosti ove metode su kratko vreme izvođenja, mala količina DNA potrebna za analizu, a s obzirom da su prajmeri generički, nije neophodno prethodno znanje o genomu ispitivane bakterije. Ova metoda daje veoma dobre rezultate, naročito na nivou laboratorije. Zbog osetljivosti na uslove okoline, može se javiti problem u reproducibilnosti između laboratorija.

rep-PCR metoda sastoji se iz: REP-PCR, ERIC-PCR i BOX-PCR. Za svaku od ovih metoda postoje posebni prajmeri koji se mogu primeniti na veliki broj bakterijskih vrsta. Većina prajmera je razvijena na rodovima *Salmonella* i *E. coli*, ali su kasnije primenjivani i na druge rodove. Što se tiče *Campylobacter* vrsta, dobijeni su informativni rezultati primenom nekih od ovih prajmera.

U ovoj studiji korišćene su RAPD i rep-PCR (ERIC-PCR i BOX-PCR) metode. Izbor ovih metoda zavisio je od nekoliko faktora: za izvođenje ovih metoda koriste se proizvoljno odabrani prajmeri (RAPD), pa se može očekivati do sada nepoznat rezultat, metode su već dale dobre rezultate u drugim istraživanjima *Campylobacter* vrsta, metode se relativno brzo izvode, cena koštanja nije prevelika, nema podataka da su ovakva ispitivanja vršena do sada u Srbiji.

S obzirom da su ove metode već korišćene u cilju tipizacije uzročnika, ovo ispitivanje bilo je fokusirano na otkrivanje metode koja daje najbolje rezultate u diskriminaciji izolata i omogućava procenu stepena različitosti izolata. Klasteri formirani na osnovu rezultata ovog i sličnih istraživanja umnogome bi olakšali epidemiološke studije uzročnika i doprineli boljem razumevanju opstanka patogena u prirodi i puteva prenošenja infekcije na ljude.

2. PREGLED LITERATURE

Gram-negativni mikroorganizmi predstavljaju vodeće uzročnike alimentarnih infekcija u modernom svetu. Najznačajniji rodovi ovih bakterija su *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* i *Yersinia*. Vrste roda *Campylobacter* predstavljaju značajne patogene za ljude i domaće životinje (Blaser, 1997.). Pojam **kampilobakterioza** koristi se za opis svih oboljenja koje predstavnici ovog roda izazivaju kod ljudi i domaćih životinja. Termotolerantne vrste kao što su *C. jejuni* i *C. coli* izazivaju gastroenteritis kod ljudi i kolonizuju digestivni trakt živine, svinja i goveda. Tokom proteklih nekoliko decenija bakterije iz ovog roda postale su najznačajniji uzročnici alimentarnih enteritisa u većini zemalja u svetu. Incidenca kampilobakterioze raste čak i u zemljama sa razvijenim programom nadzora. Prema podacima objavljenim u EFSA žurnalu (2011.) tokom 2009. godine kampilobakterioza je bila najčešće prijavljivana zoonoza u Evropskoj uniji sa 198 252 slučaja oboljevanja ljudi, dok je tokom 2011. registrovano preko 202 000 slučajeva (EFSA, 2013.). Bolest se uobičajeno javlja sa simptomima enteritisa, ali su moguće komplikacije u vidu Guillain-Barre sindroma, artritisa ili septikemije kod imunokompromitovanih (HIV+) osoba.

2.1 TAKSONOMSKE KARAKTERISTIKE RODA

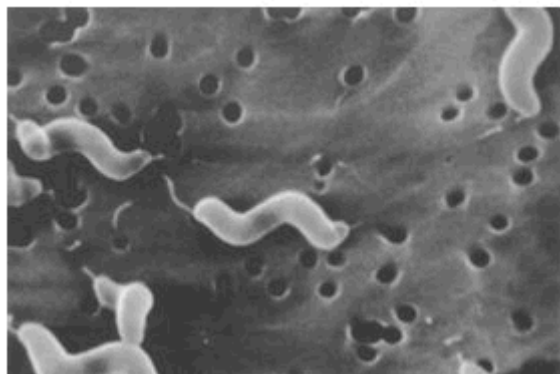
Taksonomija roda *Campylobacter* bila je predmet mnogih izmena još od dana svog ustanovljenja i još nije konačno utvrđena. Sebald i Veron su 1963. prvi predložili formiranje ovog roda i on je tada sadržao samo dve vrste: *C. fetus* i *C. bubulus* (danas *C. sputorum*). U početku rod *Campylobacter* je bio pridodat rodu *Vibrio*, ali je posle dopunskih istraživanja Veron-a i Chatelain-a (1973.) svrstan u poseban rod. Ovaj rod pripada familiji *Campylobacteriaceae* zajedno sa blisko srodnim rodom *Arcobacter*. Rod sadrži 20 vrsta i podvrsta (Doyle *et al.*, 1997.). Pregled vrsta dat je u tablici 1. Danas se u njemu nalaze i bakterije koje su ranije bile klasifikovane u rod *Wolinella* (*W. curva*, *W. recta*). *C. hyoilei* je nedavno pridodat rodu *Campylobacter* i povezan je sa proliferativnim enteritisom svinja. *C. pylori* i *C. mustelae* su reklasifikovani u rod *Helicobacter* (Goodwin *et al.*, 1989.). Istraživanja roda *Campylobacter* koja su sprovedi Vandamme i saradnici (1991., 1996.) primenom

DNK-rRNK hibridizacije, utvrdila su relativan filogenetski položaj vrsta u okviru ovog roda, što je dosta pomoglo u sistematizaciji roda.

Tablica 1: Rezervoari *Campylobacter* spp. i bolesti koje izazivaju pojedine vrste (Doyle *et al.*, 1997.)

Vrsta	Rezervoar	Bolest ili komentar	
		Ljudi	Životinje
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	ljudi, ostali sisari, ptice	dijareja, oboljenje, GBS	sistemske dijareje kod primata
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	nepoznati	dijareja	
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	goveda, ovce	dijareja, oboljenje	sistemske abortus
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	goveda		neplodnost
<i>C. coli</i>	svinje, ptice	dijareja	
<i>C. lari</i>	ptice, psi	dijareja	
<i>C. upsaliensis</i>	kućni ljubimci	dijareja	dijareja
<i>C. hyointestinalis</i>	goveda, svinje	retko: proktitis, dijareja	proliferativni enterit
<i>C. mucosalis</i>	svinje	retko: dijareja	proliferativni enterit
<i>C. hyoilei</i>	svinje		proliferativni enterit
<i>C. sputorum</i> biovar <i>sputorum</i>	ljudi	izolovan iz usne duplje i apscesa	
<i>C. sputorum</i> biovar <i>bubulus</i>	goveda	izolovan iz usne duplje i apscesa	izolovan iz digestivnog trakta
<i>C. sputorum</i> biovar <i>faecalis</i>	goveda, ovce		enterit
<i>C. concisus</i>	ljudi	bolest periodonta	
<i>C. curvus</i>	ljudi	bolest periodonta	
<i>C. rectus</i>	ljudi	bolest periodonta, plućne infekcije	
<i>C. showae</i>	ljudi	bolest periodonta	
<i>C. helveticus</i>	kućni ljubimci		dijareja
<i>C. hyoilei</i>	svinje		proliferativni enteritis
<i>C. gracilis</i>	ljudi	infekcije glave, vrata i ostalih delova tela	
<i>A. butzleri</i>	goveda, svinje	dijareja, druge bolesti	dijareja, abortus
<i>A. cryaerophilus</i>	goveda, ovce, svinje	dijareja, bakterijemija	abortus
<i>A. skirrowi</i>	goveda, ovce, svinje		dijareja, abortus; izolovan iz genitalnog trakta bikova
<i>A. nitrofigilis</i>	izolovan iz biljaka		

Rod *Campylobacter* obuhvata spiralne, Gram-negativne, štapićaste bakterije među kojima se nalaze patogeni i komensali digestivnog trakta ljudi. Bakterije su širine 0,2–0,9 μ m i dužine 0,5–5 μ m. Karakteriše ih svrdlasto kretanje usled prisustva pojedinačne, polarne flagele ili flagela na oba kraja ćelije. Oblik bakterija može biti u vidu galebovih krila, zapete ili heliksa (slika 1). U starijim kulturama ili kulturama koje su duže vreme bile izložene vazduhu, bakterije mogu poprimiti sferičan ili kokoidan oblik.



Slika 1: slika dobijena elektronskom mikroskopijom *Campylobacter jejuni*. Može se uočiti svrdlasto kretanje i prisustvo polarne flagele. Izvor: Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Blackburg, Virginia (Altekruse *et al.*, 1999.)

Campylobacter je mikroaerofilni mikroorganizam sa aerobnim metabolizmom. Većina vrsta za rast zahteva atmosferu sa 3-15% kiseonika i 3-5% ugljen-dioksida (Varnam & Evans, 1996.). Međutim, neke vrste mogu da rastu pod aerobnim uslovima. *C. cryaerophilia* može da raste aerobno, iako u primarnoj izolaciji može biti mikroaerofilan. *C. nitrofigilis* može rasti aerobno na kompleksnim medijumima kao što je Brucella agar (Holt *et al.*, 1994.). Aerobni rast može se javiti u prisustvu specifičnih supstrata kao što su nitrat ili fumarat. *C. laridis* raste aerobno u prisustvu ovih supstanci (Varnam & Evans, 1996.). Većina vrsta dobro raste na 42°C (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. sputorum*), a neke vrste rastu na 25°C (*C. fetus*).

Campylobacter ne fermentuje niti oksiduje ugljene hidrate. Ne proizvodi kisele ili neutralne produkte. Voges-Proskauer i metil-crveno reakcije su negativne. Bakterije iz ovog roda su oksidaza pozitivne i ureaza negativne i ne produkuju pigment (Holt *et al.*, 1994.). Biohemijsko razlikovanje glavnih predstavnika roda, *C. jejuni* i *C. coli*, prikazano je u tablici 2.

Genom *Campylobacter jejuni* je dug oko 1,6-1,7 Mbp. Prosečna dužina gena je oko 950 bp, a 94,3% genoma kodira sintezu različitih proteina, što čini ovaj genom najgušćim do sada sekvencioniranim bakterijskim genomom (Parkhill *et al.*,

2000.). Sadržaj GC je oko 30% (Varnam & Evans, 1996., Dorrell *et al.*, 2001.), što čini ovaj genom izuzetno teškim za sekvencioniranje.

Tablica 2: Razlikovanje glavnih vrsta roda *Campylobacter* koje mogu izazvati alimentarne infekcije (Varnam i Evans, 1996.)

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Rast na			
• 30,5° C	- ¹	+	+
• 45,5° C	+/-	+	+
Hidroliza hipurata	+	-	-
Proizvodnja H ₂ S u podlozi sa gvožđem ²	+/-	-	+
Rezistencija na nalidiksičnu kiselinu ³	-	-	+ ⁴

¹ neki sojevi mogu rasti na ovoj i nižim temperaturama

² metod Skirrow-a i Benjamin-a, 1982.

³ 30 µg

⁴ takođe postoje nalidiksična kiselina-osetljivi i ureaza-pozitivni sojevi

Campylobacter spp. su osjetljive na različite faktore spoljašnje sredine. Osjetljive su na isušivanje, visok sadržaj kiseonika i nizak pH. Ubija ih toplota, tako da ne mogu da prežive u proizvodima koji su tretirani na temperaturama višim od temperature pasterizacije (USDA). U fecesu duže preživljavaju na 4°C nego na 25°C (Doyle *et al.*, 1997.).

2.2 PUTEVI PRENOŠENJA

2.2.1 Način prenošenja infekcije na živinu

Campylobacter jejuni može biti patogen za mlade piliće, ali, generalno, ne i za odrasle ptice. Tokom 50-ih i 60-ih godina prošlog veka među pilićima u Severnoj Americi pojavila se zarazna bolest zvana "vibriozni hepatitis". Smatra se da je uzročnik ove bolesti bio *C. jejuni* (Corry i Atabay, 2001.). Bolest se najčešće pojavljivala u jatima nosilja i uzrokovala je 10-15% mortaliteta. Pad incidence ove bolesti nije sasvim jasan, ali poklapa se sa uvođenjem kaveznog sistema držanja u proizvodnju jaja.

Do infekcije u jatu obično dolazi oko treće nedelje života. Najveći broj *Campylobacter*-a nađen je u debelom crevu, cekumu i kloaki. Achen i saradnici (1998.) ustanovili su da je broj bakterija najveći u cekumu. Infekcija se veoma brzo širila u jatu. Procenat inficiranih jedinki jedan i dva dana posle oralne inokulacije bio je 50 i 70% (Achen *et al.*, 1998.). Maksimalano izlučivanje uzročnika bilo je 13 – 19 dana posle inokulacije. Posle tri nedelje od infekcije zapaža se smanjenje izlučivanja bakterija.

U svojoj studiji Stern *et al.* (2001.) su u jato slobodno od *Campylobacter*-a uneli inficiranu jedinku. Posle nedelju dana sve jednike u ispitivanom jatu bile su inficirane. Ova studija pruža objašnjenje za čestu dramatičnu pojavu kolonizacije komercijalnih brojlerskih jata u talasima. Studija koju su izveli Shanker *et al.* (1990.) pokazala je da do 75% jedinki u jatu može biti inficirano bakterijama *Campylobacter* vrsta u dobu od 5 do 7 nedelja.

U izvore infekcije i moguće načine prenošenja među brojlerima spadaju kontaminirani rezervoari vode kao i horizontalno prenošenje u okviru iste ili između brojlerskih farmi. Voda je često kontaminirana *Campylobacter* vrstama direktno, putem fecesa ili indirektno, usled nađubravanja ili pri prečišćavanju otpadnih voda. Ovakva voda može da bude izvor kolonizacije digestivnog trakta živine kampilobakterijama. Detaljan opis uloge vode u epidemiologiji *Campylobacter* infekcije dat je u delu **Način prenošenja infekcije na ljude**. U slučajevima kad voda nije izvor infekcije veoma je teško utvrditi pravi izvor infekcije. Ulogu u prenošenju mogu imati tehničko rešenje objekata, higijena u objektima između dva jata, rezerve vode i njena distribucija (Kapperud *et al.*, 1993.), kao i prisustvo glodara, insekata i divljih ptica ili kontaminacija putem obuće radnika i posetilaca (Humphrey *et al.*, 1993.). Infekcija se može izbeći ukoliko se higijena pravilno održava. Postoje podaci da je procenat inficiranih jedinki veći u uslovima organskog uzgoja brojlera, pri čemu se smatra da faktor rizika predstavlja kontaminacija iz okoline (Pasquali *et al.*, 2011.). Do danas, veruje se da je vertikalna infekcija malo verovatna. Međutim, postoje neka istraživanja koja ukazuju na mogućnost ovog vida infekcije (Pearson *et al.*, 1996.).

2.2.2 Način prenošenja infekcije na ljude

Campylobacter vrste mogu se naći u normalnoj crevnoj mikroflori velikog broja domaćih i divljih životinja tako da se mogu lako proširiti u spoljašnju sredinu. Između ostalih, u rezervoare spadaju zec, divlji glodari, goveda, živina i kućni

ljubimci. Takođe, bakterije se često mogu naći u zemljištu i površinskim vodama. Ljudi se mogu inficirati posle konzumiranja zagađene hrane, vode ili sirovog mleka ili u direktnom kontaktu sa kolonizovanim životinjama (Blaser, 1997.). Izbijanje infekcije obično nastaje usled kontaminacije sirovog mleka ili vode, ali potencijalni izvori mogu biti živinsko meso, morska hrana ili povrće kada se bolest javlja sporadično. Epidemije obično nastaju posle posete farmama muznih krava (školske ekskurzije) tokom prelaznih godišnjih doba, dok se sporadični slučajevi oboljenja najčešće javljaju tokom leta (Altekruse *et al.*, 1999.). Voda je često identifikovana kao izvor infekcije. Pretpostavlja se da *Campylobacter* može ostati “uspavan” u vodi (u vodi postoje bakterije, ali ih nije moguće kultivisati na hranljivim podlogama – VNC stadijum (viable non-cultivable state) kada se teško može detektovati korišćenjem klasičnih metoda kultivacije. Pod povoljnim uslovima ovi mikroorganizmi počinju da se umnožavaju (Doyle *et al.*, 1997.). Ipak, još uvek postoji mnogo kontroverze oko VNC stadijuma tako da ove nalaze treba prihvatiti sa dozom sumnje.

Izvor infekcije za ljude može biti i kontaminirano meso. Površina mesa može biti kontaminirana tokom obrade. Pri unakrsnoj kontaminaciji finalni nivoi uzročnika na površini trupova su od 10^2 – 10^6 CFU/g kod 30 – 40% ptica na tržištu (Pearson *et al.*, 1996.). Prenosenje infekcije na ljude nastaje unakrsnom kontaminacijom sirove hrane ili rukovanjem sa kontaminiranim trupovima. Povremeno, infekcija može nastati u direktnom kontaktu sa inficiranom osobom, ali to nije često (Altekruse *et al.*, 1999).

2.3 MESO ŽIVINE KAO IZVOR INFEKCIJE LJUDI KAMPILOBAKTERIJAMA

Izveštaji o pojavi alimentarnih infekcija kod ljudi ukazuju na živinsko meso kao značajan izvor infekcije. U periodu od 1968. do 1977. godine živinsko meso bilo je odgovorno za 54% svih prijavljenih epidemija kampilobakterioze. Kampilobakterioza je predstavljala 10% svih alimentarnih infekcija u periodu od 1977. do 1984. godine (Bryan & Doyle, 1995.). Tokom 2008. godine, kampilobakterioza je bila najčešće prijavljivana alimentarna infekcija ljudi (EFSA, 2010.), pri čemu se broj prijavljenih slučajeva smanjio za 5% u odnosu na 2007. godinu i iznosio je 40,7 slučajeva na 100 000 stanovnika.

Rezultati analitičkih studija koje su preduzimate sa ciljem da rasvetle ulogu živinskog mesa u pojavi kampilobakterioze dale su kontradiktorne rezultate.

Podaci iz Džordžije, SAD pokazuju da se konzumiranje živinskog mesa može povezati sa 70% slučajeva kampilobakterioze (Seattle - King County Department of Public Health, 1987.). Procent kontaminiranih pilećih trupova na klanicama i u prodaji obično je veoma visok (Corry & Atabay, 2001.). Može dostići čak 80%. Izveštaj EFSA (2010.) za 2008. godinu donosi podatke o procentualnoj zastupljenosti inficiranih trupova brojlera *Campylobacter* vrstama na klanici. Procenat pozitivnih trupova veoma varira među zemljama Evropske unije i iznosi između 14,7% (Danska) i 86,2% (Španija). Nalaz kampilobakterija u maloprodaji razlikuje se među članicama unije, a može biti različit u odnosu na vrednosti dobijene uzorkovanjem na klanici.

Što se tiče distribucije vrsta iz roda *Campylobacter* u mesu piladi, situacija je slična – u nekim zemljama EU predominantna vrsta je *C. jejuni*, a u nekim *C. coli*. Međutim, do danas nije uspostavljena jasna veza između izolata dobijenih iz mesa piladi i bolesti ljudi.

Posredni dokazi o ulozi mesa piladi u pojavi sporadičnog oboljenja kod ljudi mogu se izvući iz prisustva istih genetskih profila *Campylobacter*-a kod živine i ljudi, sličnih profila rezistencije na antibiotike i istovremenog razvoja rezistencije na kvinolone kod izolata poreklom od ljudi i živine (Pearson *et al.*, 1999., Nadeau *et al.*, 2002.b, Engberg *et al.*, 2001.). Rezistencija na kvinolone postaje sve veći problem s obzirom da su oni lek izbora kod mnogih oboljenja ljudi. U proizvodnji hrane životinjskog porekla, naročito u proizvodnji živine oni se koriste kao promoteri rasta usled čega se njihovi ostaci nalaze u mesu i na taj način mogu dovesti do pojave rezistencije kod ljudi posle konzumacije takvog mesa. U velikom broju zemalja stopa rezistencije na fluorokvinolone je slična kod ljudi i živine što implicira da živinsko meso može biti odgovorno za pojavu kampilobakterioze kod ljudi (Bager, 1999., Saenz *et al.*, 2000., Endtz *et al.*, 1990.).

Veliki broj istraživanja sproveden je u cilju određivanja serotipova/genotipova *Campylobacter*-a koji izazivaju oboljenje kod ljudi i njihovog poređenja sa izolatima poreklom od pilića i ostalih domaćih životinja koje se koriste za proizvodnju hrane. Rezultati većine studija pokazuju veliku raznovrsnost među izolatima i visok procenat analogije između izolata poreklom od ljudi, živine i goveda (Nielsen *et al.*, 1997, Pearson *et al.*, 1996, Nadeau *et al.*, 2002). Nasuprot tome, izolati poreklom od svinja ne pokazuju nikakvu srodnost sa humanim izolatima (Nielsen *et al.*, 1997). Ispitivanja sprovedena u Škotskoj (Sheppard, 2009.) potvrđuju povezanost

određenih genotipova sa potencijalnim izvorima infekcije ljudi, kao i tvrdnju da je pileće meso glavni izvor infekcije.

2.4 PATOGENEZA INFEKCIJE KAMPILOBAKTERIJAMA

O mehanizmima nastanka kampilobakterioze još uvek se malo zna. Poslednjih godina su otkrivene specifičnosti roda *Campylobacter* koje govore u prilog tome da je patogeneza ovog patogena različita u odnosu na druge patogene (Dastia *et al.*, 2010.). *Campylobacter* vrste vrše glikozilaciju više od 30 proteina povezanih sa kolonizacijom, adherencijom i invazijom. Takođe, flagele ovih bakterija nisu značajne samo u mogućavanju pokretljivost, već i za sekreciju antigena povezanih sa sposobnošću invazije. Jedini toksin koji je opisan kod *Campylobacter* spp. je takozvani citoletalni toksin (CDT), a koji izaziva promene u kontroli ćelijskog ciklusa i može indukovati apoptozu ćelije domaćina. Nasuprot drugim bakterijama koje izazivaju dijareju, *Campylobacter* ne proizvodi klasične faktore virulencije.

Mnogobrojna istraživanja su dokazala da je infektivna doza veoma niska. Doza od 5 do 500 mikroorganizama može izazvati dijareju kod ljudi (Hu & Kopecko, 1999., Tauxe, 2002.). *C. jejuni* može izazvati oboljenje slično enterotoksikozi sa vodenom dijarejom ili inflamatorni kolitis sa groznicom i pojavom krvi u stolici. Ispitivanja Black-a i saradnika (1988.) pokazalo je da bolest može nastati posle oralnog unošenja 800 do 1 000 000 cfu/g uzročnika, pri čemu nije otkrivena jasna veza između unete doze i ozbiljnosti simptoma.

Do sada je poznato da u mehanizmu nastanka bolesti ulogu imaju pokretljivost bakterija, adherencija bakterija na crevnu mukozu, invazivnost i proizvodnja toksina (Silva *et al.*, 2011., Konkel *et al.*, 2001.).

2.4.1 Pokretljivost i adherencija bakterija – prisutvo flagela

Pokretljivost *Campylobacter* vrsta se povećava u viskozim sredinama i neophodna je karakteristika za kolonizaciju tankog creva i preživljavanje u različitim ekološkim nišama gastrointestinalnog trakta. Ova sposobnost uzročniku olakšava kretanje kroz mukozni sloj na površini epitela creva. Što je viskozitet veći, pokretljivost bakterija je veća (Szymanski *et al.*, 1995.).

Flagela *C. jejuni* i *C. coli* se sastoji od dva proteina *flaA* i *flaB* čiju sintezu kodiraju dva flagelinska gena koji se nalaze u paru. Aktivnost svakog od ovih

gena reguliše poseban promotor. Za invaziju epitelnih ćelija neophodan je *flaA* gen. Mutanti *flaA* gena imaju skraćenu flagelu i nemaju sposobnost invazije. Nasuprot tome, mutacija u *flaB* genu ne dovodi do promena sposobnosti invazije.

2.4.2 Invazivnost

Iako je opšte prihvaćena pretpostavka da *Campylobacter* vrste prvo kolonizuju jejunum i ileum (Allos and Blaser, 1995., Skirow and Blaser 2000.), pa zatim kolon, prve patomorfološke promene se uočavaju u kolonu. Pojavi lezija u kolonu pogoduje prisustvo određenih molekula koji se nalaze u sluzokoži i služe kao mesta vezivanja *Campylobacter*-a, kao i sporija peristaltika ovog dela creva.

Sposobnost *Campylobacter*-a da invadira ćelije sluzokože zavisi od izolata (Ketley, 1997.). Izolati koji izazivaju kolitis imaju veću sposobnost invazivnosti od onih koji izazivaju neinflamatornu dijareju (Everest *et al.*, 1992.). Izolati poreklom iz okruženja imaju manju sposobnost invazije u HeLa ćelije od kliničkih izolata (Newell *et al.* 1985.).

Ulogu u invazivnosti *Campylobacter* spp. imaju i neki proteini koji se sintetisu samo u prisustvu epitelnih ćelija (Konkel & Cieplak, 1992., Panigrahi *et al.*, 1992.). Neki od ovih proteina se mogu detektovati korišćenjem seruma dobijenih od osoba obolelih od kampilobakterioze. Ovo i slična istraživanja sugerisu da dolazi do ekspresije nekih gena *C. jejuni* posle susreta sa epitelnim ćelijama, odnosno kad se *Campylobacter* vrste nađu u digestivnom traktu.

Russel i saradnici (1993.) su primenom challenge testa na makakijima dobili eksperimentalne dokaze da je primarni mehanizam oštećenja kolona i razvoja dijareja povezan sa sposobnošću *Campylobacter* vrsta da prodiru u epitelne ćelije. Pregledom uzoraka dobijenih biopsijom kolona makakija uočena je gusta koncentracija mikrofilamenata povezana sa ćelijama uzročnika koji prodiru u epitelne ćelije. Inflamatorni proces se razvija nakon prodora uzročnika u epitelne ćelije.

2.4.3 Proizvodnja toksina

Campylobacter vrste proizvode nekoliko toksina, ali jedini toksin koji je detaljno proučen je citoletalni toksin (CDT). Osim *Campylobacter* vrsta, ovaj toksin proizvode mnoge Gram negativne crevne bakterije (Ceelen *et al.*, 2006., Ge *et al.*, 2008.).

CDT se sastoji iz tri subjedinice koje kodraju geni *cdtA*, *cdtB* i *cdtC*. Ovaj toksin deluje samo kad su prisutne sve tri subjedinice. Deluje tako što

zaustavlja ćelijsku deobu i posledično dovodi do smrti ćelije. Napadnuta ćelija se uvećava nekoliko puta i izgleda kao da je otečena, te se zato ovaj toksin naziva citoletelni toksin koji izaziva nadun ćelije (Konkel *et al.*, 2001.). I pored ovih saznanja, uloga CDT-a u patogenezi kampilobakterioze nije jasna.

2.5 KLINIČKE MANIFESTACIJE INFEKCIJE SA *CAMPYLOBACTER JEJUNI* KOD LJUDI

Simptomi oboljenja javljaju se 24 – 72 sata posle ingestije uzročnika, ali se inkubacioni period može produžiti do 7 dana. Početni simptomi su nespecifični: bol u glavi, groznica, mijalgija i traju 24 časa ili kraće. Glavna manifestacija oboljenja je dijareja, često praćena abdominalnim grčevima i groznicom. Mogu se javiti dva tipa dijareje (Varnam & Evans, 1996.). Prvi tip je sekretorna dijareja, sa profuznom stolicom, primesama žuči i neprijatnog mirisa. Drugi tip liči na dizenteriju, u stolici se nalaze inflamatorne ćelije i krv. Karakterističan simptom kampilobakterioze je abdominalni bol koji može biti jači od bola koji se javlja kod salmoneloze. U početku, bol je količan, a kasnije postaje konstantan i pomera se u desnu ilijačnu jamu. Posle defekacije, pacijent oseća privremeno olakšanje, ali se bol veoma brzo vraća. Zahvaljujući ovom bolu, kampilobakterioza se može pomešati sa apendicitisom. Povraćanje se može javiti u svim fazama bolesti, ali nije obavezno. Retko se javlja više nego jednom ili dva puta tokom bolesti.

Kampilobakterioza je obično samo-ograničena. Simptomi traju nedelju dana ili kraće, a oporavak je bez komplikacija. Pacijent oseća stalnu slabost, a bolovi u stomaku mogu trajati nekoliko dana. Komplikacije se retko razvijaju, ali su moguće. Može se razviti hemolitički uremični sindrom, hepatitis, pankreatitis i apendicitis, a u poslednjih nekoliko decada kampilobakterioza se povezuje i sa bolestima kao što su reaktivni artritis, erythema nodosum i Guillain-Barre sindrom (GBS). Najteža komplikacija je GBS koji je trenutno najčešći uzrok nervno-mišićnih poremećaja koji zahtevaju bolničko lečenje (Varnam & Evans, 1996.). GBS je autoimuni poremećaj perifernog nervnog sistema koji se karakteriše akutnom flacidnom paralizom. Dokazano je da je *C. jejuni* infekcija najčešća infekcija koja prethodi razvoju ovog sindroma. Patogeneza poremećaja nije u potpunosti razjašnjena, ali se čini da je povezana sa produkcijom antitela na mijelin perifernih nerava (Hadden & Gregson, 2001.). Dolazi do stvaranja antitela na glikozidnu komponentu površinskog antigena *C. jejuni* koja

reaguju sa gangliozidom GM1 iz perifernih nerava. Ova hipoteza, međutim, ne može da objasni sve aspekte patogeneze GBS-a.

2.6 SAVREMEN PRISTUP DIJAGNOSTICI I IDENTIFIKACIJI IZOLATA *CAMPYLOBACTER JEJUNI*

U cilju poboljšanja javnog zdravlja neophodno je vršiti epidemiološke studije da bi se odredio primarni izvor bakterijske kontaminacije. U tu svrhu mogu se koristiti metode tipizacije koje mogu povezati obolele osobe sa izvorom bakterijske kontaminacije putem unete hrane. Sa ovim ciljem vršena su mnogobrojna ispitivanja. Foley *et al.* (2009.) su u svojoj studiji poredili različite molekularne metode tipizacije u cilju provere njihove podobnosti za epidemiološka ispitivanja. Opšti zaključak je da se za tipizaciju *Campylobacter* spp. mogu koristiti sledeće metode: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified fragment length polymorphism), rep-PCR (Repetitive sequence-based PCR), MLST (Multilocus sequence typing) i SNP (Single nucleotid polymorphism).

Osnovna postavka **Repetitive Sequence-Based PCR (rep-PCR)** tehnike je upotreba repetitivnih elemenata koji su prisutni u genomima mnogobrojnih bakterija i eukariota za dobijanje jedinstvenih DNA profila („otisaka“) pojedinačnih sojeva mikroorganizama (Ishii & Sadowsky, 2009.). Oko 5% genoma ovih mikroorganizama čine repetitivni segmenti pri čemu je funkcija mnogih nepoznata, a lokalizovani su i u intergenskim i u ekstragenskim delovima DNA. rep-PCR tehnika pokazala se korisnom pri identifikaciji, praćenju i ispitivanju različitosti među izolatima medicinski značajnih mikroorganizama, kao i mikroorganizama iz okoline. Može se koristiti pri ispitivanjima ekologije mikroorganizama, epidemiološkim analizama, u medicinskoj mikrobiologiji i molekularnoj dijagnostici. Primenjuje se i za određivanje izvora mikroorganizma i njihovog prenošenja tokom epidemija.

Umetnute repetitivne sekvence u prokariotskim genomima iskorišćene su za dizajniranje oligonukleotidnih prajmera za PCR pri čemu se dobija karakterističan genetski profil izolata (Versalović *et al.*, 1991; 1994). rep-PCR se bazira na mogućnosti vezivanja određenih oligonukleotidnih prajmera za krajeve repetitivnih fragmenata, orjentisanih tako da umnožavaju delove DNA koji se nalaze između ovih segmenata.

Tako nastali amplikoni različite veličine odvajaju se putem elektroforeze što omogućava formiranje DNA profila specifičnog za pojedinačni bakterijski soj. Nekoliko ovih umetnutih repetitivnih regiona su konzervativni za veći broj bakterijskih vrsta, što omogućava korišćenje istog seta prajmera za amplifikaciju i profilisanje tih mikroorganizama.

Repetitivni DNA elementi su uglavnom otkriveni kod eukariota čiji genom je mnogo veći od genoma prokariota (10^9 prema 10^6 parova baza). Kod prokariota je količina nekodirajuće DNA mala zbog potrebe brzog rasta, ali su ipak otkriveni kratki međugenski repetitivni delovi, prvo kod enterobakterija, a zatim i kod drugih rodova. Versalović *et al.* (1991.) su iskoristili otkrivene palindromske repetitivne elemente dokazane kod više rodova eubakterija. Oni su konstruisali oligonukleotidne prajmere za repetitivne ekstrageneske palindromske elemente (Repetitive Extragenic Palindromeic – REP) i enterobakterijske repetitivne intergeneske konsenzus (Enterobacterial Repetitive Intergenic Concensus – ERIC) sekvence, a zatim ih testirali pri amplifikaciji genomske DNA nekih eubakterija. REP konsenzus sekvence su konstruisane na osnovu genoma *E. coli* i *Salmonella typhimurium* u dužini od 38 parova baza. Ova sekvenca sadrži 6 potpuno degenerisanih pozicija, uključujući i varijabilnu petlju od 5 parova baza između obe strane konzervativnog dela palindroma. ERIC sekvence su konstruisane na osnovu genoma *E. coli* i *Salmonella typhimurium*, obuhvataju veće regione (126 parova baza) i nisu povezane sa REP regionima. REP i ERIC oligonukleotidi su proizveli jasno ograničene i razdvojene trake na gelu posle PCR amplifikacije koje su činile nedvosmislene profile različitih eubakterijskih vrsta i sojeva. Rezultati Versalovića i saradnika su pokazali prisustvo REP sekvenci kod rodova *E. coli*, *Salmonella*, *Citrobacter* i *Shigella*. REP i ERIC elementi su visoko konzervativni u okviru *E. coli* i *Salmonella* vrsta, a ova studija sugeriše i da su konzervativni u okviru eubakterija tokom najmanje stotinu miliona godina, odnosno da su postojali i pre odvajanja linije Gram negativnih enterobakterija. Takvi nalazi su implicirali da bi se njihovo ispitivanje moglo vršiti i u drugim bakterijskim rodovima.

De Bruijn (1992.) je poredio diskriminatornu moć REP i ERIC PCR tehnike u poređenju sa multilokus enzim elektroforezom na primeru bakterije iz zemljišta *Rhizobium meliloti*. Njegovi rezultati sugerišu da se upotrebom REP i ERIC PCR-a dobijaju slični rezultati kao upotrebom multilokus enzim elektroforeze, te da je njihova moć u identifikaciji i klasifikaciji bakterijskih sojeva zadovoljavajuća. Prednosti REP i ERIC PCR-a ogledaju se u tome što se za analizu blisko srodnih, kao i udaljenih

rodova koristi isti set prajmera (prajmeri nisu specifični za soj, vrstu ili rod). Kompleksnost REP i ERIC PCR profila može se podešavati upotrebom različitih prajmera u raznim kombinacijama, pa se može postići nivo diskriminacije potreban za razlikovanje sojeva, u okviru vrste, različitih vrsta ili različitih rodova mikroorganizama.

Hiett *et al.* (2006) su sproveli uporedno ispitivanje rep-PCR metode i analize segmenata kratkog varijabilnog regiona *flaA* gena *Campylobacter jejuni* u cilju upoređivanja njihove diskriminatorne moći. Da bi se olakšalo pronalaženje izvora infekcije, potrebno je u svakodnevnu laboratorijsku praksu detekcije određenog mikroorganizma uvesti pouzdane, reproducibilne metode, odgovarajuće diskriminatorne moći. Neophodno je da metoda grupiše izolate u logični epidemiološki koncept, odnosno prema vremenskoj i epidemiološkoj povezanosti. Zato se pri uvođenju nove metode za tipizaciju prvo radi studija sa izolatima poznatog epidemiološkog porekla. U studiji Hietta *et al.* ispitivano je 50 izolata *C. jejuni* različitog porekla. Korišćeni su Uprime Dt, Uprime B1 i Uprime R1 prajmeri za rep-PCR. Najbolji rezultati su dobijeni primenom Uprime Dt prajmera koji je davao reproducibilne profile (100% izolata je bilo tipizirano upotrebom ovog prajmera uz 99% reproducibilnosti) i omogućavao grupisanje uzoraka u epidemiološki povezane grupe. Dendogram konstruisan upotrebom Uprime Dt prajmera bio je veoma sličan dendogramu konstruisanom nakon analize *flaA* SVR DNA regiona. Izolati poreklom iz fecesa živine bili su u preko 90% slučajeva slični izolatima dobijenim sa trupova živine iz istog jata. Takođe, izolati dobijeni sa trupova živine bili su blisko srodni izolatima humanog porekla. Ova studija pokazuje da se rep-PCR analiza može primeniti kao korisna alatka za tačnu diferencijaciju sojeva *C. jejuni* i epidemiološke analize.

Multi Locus Sequence Typing (MLST) je metoda koje se bazira na priključivanju određenih alela svakom genskom lokusu direktno na osnovu nukleotidne sekvence alela (Enright & Spratt, 1999, Spratt, 1999). Broj alela koji se na ovaj način vezuje za svaki lokus je veliki jer se sekvencioniranjem detektuju sve promene u sekvenci lokusa. Ukoliko se za tipizaciju koristi MLST ciljaju se delovi genoma koji su visoko konzervirani (tzv. „house-keeping“ geni), pa se mogu registrovati promene koje nastaju na nivou nukleotida. Čak i male promene na nivou nukleotida (varijacija u samo nekoliko nukleotida) dovodi do stvaranja novih alelskih profila. Zbog toga je broj lokusa potrebnih za postizanje zadovoljavajućeg diskriminatornog potencijala nizak.

Optimalna dužina sekvenci treba da bude 450-500 bp. Ova dužina je odabrana zato što omogućava precizno sekvencioniranje uz upotrebu samo jednog para prajmera, a istovremeno omogućava detekciju dovoljne količine informacija za identifikaciju mnogo različitih alela u populaciji. MLST smanjuje potrebu za transportom živih bakterijskih kultura pošto je nukleotidnu sekvencu moguće odrediti iz suspenzije mrtvih ćelija, prečišćene DNK ili kliničkog materijala.

Postoji potreba da se razvija odgovarajuća shema za tipizaciju *Campylobacter jejuni* jer postoje mnogobrojni rezervoari ovog uzročnika u spoljašnjoj sredini i među životinjama, a odnos među ovim populacijama i sojevima koji izazivaju oboljenje nije u potpunosti rasvetljen. Iz tih razloga razvijen je MLST sistem za *Campylobacter jejuni* (Dingle *et al.*, 2001, 2002). Prednosti koje pruža MLST pristup uključuju visok diskriminatorni potencijal, ponovljivost, jednostavnost interpretacije i mogućnost poređenja podataka među laboratorijama. Ova shema omogućava identifikaciju globalnih i lokalnih epidemija i dozvoljava potvrdu eventualnih puteva prenošenja iz okoline i životinjskih rezervoara na ljude.

Sistem je baziran na nukleotidnim sekvencama 7 “housekeeping” gena: *aspA* – aspartaza, *glnA* – glutamin sintaza, *gltA* – citrat sintaza, *glyA* – serin-hidroksimetil transferaza, *pgm* – fosfoglukomutaza, *tkt* – transketolaza, *uncA* – α subjedinična ATP sintaze. Ovih 7 lokusa je izabrano zato što je bilo moguće amplifikovati ih i sekvencionirati iz velikog dijapazona uzoraka i pokazuju dovoljnu raznovrsnost za obezbeđenje razlikovanja različitih sojeva. Podaci dobijeni MLST pristupom se slažu sa podacima dobijenim upotrebom drugih tehnika za tipizaciju i sugerišu da su populacije ovog organizma veoma raznolike. Neke od različitosti su verovatno “uvežene” od drugih vrsta, verovatno *C. coli* (Dingle *et al.*, 2001). Primena nekih testova kao “homoplasy test and the split decomposition analysis” daje jake dokaze za unutar-specijske rekombinacije kod *C. jejuni* (Suerbaum *et al.*, 2001). Ovi rezultati ukazuju na to da horizontalne genetske promene imaju odlučujući efekat na strukturu i evoluciju populacija *Campylobacter*-a. Ovi rezultati su konzistentni sa ranijim nalazima Harrington-a *et al.* (1997) za *C. jejuni*. Iz ovoga možemo zaključiti da je populacija *Campylobacter jejuni* slabo klonalna. **Slabo klonalne populacije** se sastoje od određenog broja klonalnih kompleksa, tj. grupa organizama za koje se pretpostavlja da potiču od istog pretka. Razlike među klonovima se formiraju usled intraspecijskih rekombinacija, a ne usled akumulacije tačkastih mutacija što je slučaj kod klonalnih

populacija. Filogenetski odnos grupa kod ovakvih populacija je teško odrediti jer je ometen kasnijim transferima gena (Holmes *et al.*, 1999).

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) je tehnika kod koje se koriste proizvoljno dizajnirani prajmeri koji umnožavaju proizvoljno distribuirane fragmente DNA (Wassenaar, 2000., Foley *et al.* 2009., Kumar & Gurusubramanian, 2011.). Prajmeri koji se biraju za ovu amplifikaciju su obično dužine do 10, a maksimalno 20 baznih parova. Uslovi amplifikacije se biraju tako da ne budu previše strogi, pa do umnožavanja dolazi čak i ako prajmeri ne odgovaraju u potpunosti DNA matrici. Zbog ovako izabranih uslova amplifikacije metoda je veoma osetljiva na eksperimentalne uslove (čistoća i koncentracija DNA, inhibitorne materije, PCR aparatura), pa je osnovni problem smanjena reproduktivnost metode između laboratorija. Ipak, u okviru iste laboratorije metoda daje dobru reproduktivnost i može se primenjivati. Prednosti ove metode su kratko vreme izvođenja, mala količina DNA potrebna za analizu, a s obzirom da su prajmeri generički, nije neophodno prethodno znanje o genomu ispitivane bakterije. S obzirom da je templat za RAPD analizu celokupni genom, degradacija izolovane DNA smanjuje kvalitet dobijenih rezultata. Poslednjih godina RAPD se koristi za karakterizaciju i ispitivanje filogenije različitih biljnih i životinjskih vrsta. RAPD omogućava brzo, preliminarno ispitivanje genoma (skrining metoda). Međutim, proizvoljno odabrani prajmeri koji se koriste u ovoj metodi nisu dovoljno robustni, te nisu pogodni za upotrebu u populacionoj genetici ili humanoj dijagnostici.

Gel-elektroforeza u pulsnom polju (Pulse Field Gel Elektrophoresis – PFGE) predstavlja modifikaciju gel-elektroforeze koja omogućava razdvajanje izuzetno velikih fragmenata DNK. Ova tehnika je nezamenjiva za određivanje veličine celog genoma pre započinjanja reakcije sekvencioniranja, kao i u pripremi velikih fragmenata DNK za reakciju kloniranja. Može se, takođe, koristiti za genotipizaciju i epidemiološke studije patogenih mikroorganizama.

PFGE obuhvata više koraka: umetanje mikroorganizama u agarozu, liziranje ćelija *in situ*, sečenje DNK restriktivnim enzimima koji pripadaju grupi enzima koji seku molekule DNK u malom broju mesta (“rare cutter” enzimi). Komadići agaroze u kojima se nalaze fragmenti DNK se zatim isecaju, polažu u otvore u agarozu gelu i podvrgavaju elektroforezi (Tenover *et al.*, 1995). Usled delovanja promenljivog

električnog polja (za elektroforezu se koristi aparat koji omogućava izmenu pravca električnog polja u skladu sa ranije utvrđenim obrascem) dolazi do razdvajanja fragmenata DNK u trake u gelu. Fragmenti DNK normalno putuju kroz gel u vidu sferičnih namotaja, ali ukoliko su veći od 20 kbp, kreću se u vidu produženih kalemova. Fragmenti putuju kroz gel u smeru proticanja struje. Kad se smer proticanja struje menja, većim fragmentima je potrebno više vremena da izmene pravac svog kretanja, tako da dolazi do razdvajanja fragmenata. Na ovaj način mogu se razdvojiti fragmenti veličine 100 – 1000 kbp. Najvažniji faktor koji utiče na sposobnost razdvajanja PFGE je dužina proticanja struje u jednom smeru. Ukoliko je to vreme duže, moguće je razdvajati veće fragmente. Frekvencija promene smera struje određuje se u zavisnosti od očekivane dužine fragmenata.

Restrikcioni profili koji se dobijaju PFGE se međusobno upoređuju u cilju određivanja srodnosti sojeva od kojih su dobijeni. Za sada ne postoje opšte prihvaćeni kriterijumi za izvođenje ovih analiza, tako da različiti istraživači mogu iz istog seta podataka da izvode sasvim suprotne zaključke. Neki istraživači su pokušali da razrade sistem za interpretaciju rezultata. Tenover *et al.* (1995) predlažu sistem koji se sastoji od 4 kategorije:

- nerazdvojni od šablona epidemije – izolati koji imaju isti broj traka i kod kojih su trake približno iste veličine
- blisko srodni – PFGE šablon ispitivanog izolata se razlikuje od šablona epidemije u malom procentu (usled jednog genetičkog događaja, npr. tačkaste mutacije)
- moguće srodni – razlike između izolata i šablona epidemije nastaju usled dva nezavisna genetička događaja
- nesrodni – razlike nastaju usled prisustva tri ili više posebnih genetičkih događaja

PFGE ima veoma dobru sposobnost diskriminacije – sposobnost da razlikuje genetički srodne sojeve i dobru reproducibilnost, tako da za sada ostaje referentna tehnika za tipizaciju sojeva i omogućava izvođenje epidemioloških studija. Visoka sposobnost diskriminacije je posledica sposobnosti ove tehnike da detektuje polimorfizam u čitavom bakterijskom genomu.

Ova metoda ima i neka ograničenja: zahteva specifičnu aparaturu i dosta vremena (5 dana), nije prikladna za proučavanje velikog broja izolata (npr. izolata koji su sakupljeni u toku jedne godine). Prilikom korišćenja ove metode za određivanje stepena srodnosti među izolatima treba biti oprezan jer trake koje u gelu imaju različit

položaj (što može biti uzrokovano pojedinačnom tačkastom mutacijom koja dovodi do promene u mestu delovanja korišćene endonukleaze tako da ne dolazi do prekida DNK na tom mestu) mogu imati istu nukleotidnu sekvencu.

Pri proučavanju roda *Campylobacter*, PFGE je prvo korišćena za *C. jejuni*, ali je kasnije ova metoda usvojena i za *C. coli*, *C. fetus*, *C. upsaliensis* i *C. hyointestinalis* (Wassenaar i Newell, 2000). Uslovi elektroforeze, kao i restrikcioni enzimi koji se koriste variraju zavisno od laboratorije, tako da poređenje PFGE šablona može biti teško. Postoje i neki *Campylobacter* sojevi koji ne mogu da se identifikuju PFGE-om. Problem može biti u produkciji DNAze i može se rešiti tretmanom formaldehidom. U svakom slučaju, PFGE se smatra dobrom tehnikom za detekciju *Campylobacter* vrsta do nivoa vrste i podvrste (On & Harington, 2001).

Iako je uopšteno diskriminatorna moć RAPD analize za većinu bakterija niža nego kod PFGE i AFLP metoda, za *Campylobacter jejuni* ovo ne važi – naprotiv, diskriminatorna moć je veća nego kod PFGE (Nielsen *et al.*, 2000). Obe metode imaju veliku diskriminatornu moć koja je posledica sposobnosti metoda da detektuju polimorfizam na nivou celog genoma, ali PFGE često daje profile koji se ne slažu sa drugim primenjenim metodama. Dobro je dokumentovano da PFGE profili srodnih izolata mogu biti značajno izmenjeni različitim genetičkim događajima, npr. tačkastim mutacijama u mestima vezivanja restrikcionih enzima ili genetskim rearanžmanima (On, 1998, Wassenaar *et al.*, 1998). Grupe formirane primenom RAPD analize obično obuhvataju izolate koji pripadaju istoj serograpi prema Penner-ovoj serotipizaciji.

***flaA*-RFLP** je molekularna metoda za tipizaciju *Campylobacter jejuni* preko analize restrikcionih fragmenata (RFLP) flagelinskog gena *flaA* (Nachamkin *et al.*, 1993.). *flaA* gen se sastoji iz tri segmenta: C1 i C2 regiona koji su na C- i N-terminalnom kraju gena i koji su konzervirani i V1 regiona koji se nalazi između njih i varijabilan je. S obzirom da su regioni na C- i N-terminalnom kraju konzervativni, bilo je moguće konstruisati prajmere koji dovode do amplifikacije *flaA* gena. Upotrebom odgovarajućeg restrikcionog enzima mogu se dobiti RFLP profili ovog gena. Zaključci autora upućuju na to da je *flaA* gen *C. jejuni* izrazito heterogen, pa bi ovaj metod mogao biti od koristi u epidemiološkim studijama, s tim što je neophodno izvršiti dodatna ispitivanja na većem broju uzoraka.

Međutim, kasnija ispitivanja kao npr. ona koja su sproveli Harrington i saradnici (1997.) preispituju vrednost ove metode jer je utvrđeno da *fla* geni imaju veliku sposobnost rekombinacije što može dovesti do značajnih promena u njihovom RFLP profilu. Nasuprot tome, ispitivanja koja su sproveli Nielsen i saradnici (2000) pokazala su da *flaA*-RFLP metoda daje profile koji grupišu ispitivane uzorke na sličan način kao i druge metode primenjene u ovom ispitivanju, pa se može koristiti kao validna alatka u epidemiološkim ispitivanjima.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) jedna je od najnovijih molekularnih metoda. Ovu metodu je razvio Keygene BV, Wageningen, Holandija (Vos et al., 1995.). Pripada grupi tehnika koje se karakterišu amplifikacijom fragmenata koji su dobijeni restrikcijom DNA (Savelkoul *et al.*, 1999.). Odlikuje se visokim stepenom diskriminacije i dobrom ponovljivošću, a može se primeniti u širokom spektru istraživanja. Koristi se za utvrđivanje polimorfizma u genomu nižih i viših organizama (Vos *et al.*, 1995.). Profili se dobijaju korišćenjem ograničenog seta prajmera bez prethodnog znanja o genomu koji se istražuje. AFLP je baziran na selektivnoj amplifikaciji DNA fragmenata dobijenih digestijom genomske DNA. Tehnika uključuje restikciju DNA i vezivanje specifičnih dvolančanih adaptera, selektivnu amplifikaciju podseta fragmenata i analizu amplifikovanih fragmenata u gelu.

Janssen *et al.* (1996.) su izvršili ispitivanja u cilju testiranja korisnosti ove tehnike. Analizirali su 147 bakterijskih sojeva AFLP metodom. Sojevi su pripadali sledećim rodovima: *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* i *Vibrio*. Podaci dobijeni u ovoj studiji bili su pogodni za upoređivanje sa podacima dobijenim drugim tehnikama za genotipizaciju i taksonomiju. Studija je pokazala da AFLP ima veliku sposobnost diskriminacije visoko srodnih bakterijskih sojeva koji pripadaju istoj vrsti ili biovaru.

Glavne prednosti korišćenja AFLP tehnike su da može generisati profile bilo koje DNA bez obzira na njeno poreklo ili kompleksnost, bez prethodnog znanja o genima ili sekvenci DNA koja se amplifikuje; ima sposobnost da razlikuje individualne varijacije i identifikuje nove i/ili genetski udaljene klonove; može istovremeno amplifikovati veliki broj različitih fragmenata. Pored činjenice da je AFLP metoda skupa i zahteva dosta vremena, ona ima i dodatna ograničenja: zahteva potpuno prečišćenu dvolančanu DNA (prisustvo strane DNA remeti rekaciju), ne obezbeđuje

podatke o stepenu ekspresije gena, a podaci o različitim prisutnim genima ograničeni su samo na sojeve koji su sekvencionirani.

AFLP metoda je jedna od metoda koje se koriste za genotipizaciju *Campylobacter jejuni*. Dobijeni rezultati su veoma zadovoljavajući, diskriminatorni potencijal metode u odnosu na ovaj rod je veoma visok. Sve vrste iz roda *Campylobacter*, sem *C. lari*, razdvojene su u posebne klastere (Duum *et al.*, 2001.). *C. lari* je grupisan u dva posebna klastera koji odgovaraju osetljivosti sojeva na nalidiksičnu kiselinu. Takođe, AFLP može detektovati podvrste kod *C. jejuni*, *C. fetus* i *C. hyointestinalis*. Sojevi poreklom od živine su pomoću AFLP-a razdvojeni u dve grupe: *C. jejuni* i *C. coli*, a u okviru *C. jejuni* klastera detektovani su različiti genetski profili. Takođe, otkriveno je nekoliko grupa humanih i živinskih izolata čiji AFLP profili su identični (Savelkoul *et al.*, 1999., Duim *et al.*, 1999., 2000.). Nisu otkriveni profili koji bi bili ekskluzivni za humane ili živinske izolate. Sposobnost AFLP metode da razlikuje *C. jejuni* i *C. coli* čiji genomi su izuzetno slični, veoma je važna osobina ove metode.

AFLP se može koristiti i za epidemiološka ispitivanja (Kokotovic & On, 1999.). S obzirom na to da se većina slučajeva kampilobakterioze javlja sporadično, veoma je važno da se tačno utvrdi koji klon je izazvao oboljenje. Podaci dobijeni AFLP analizom mogu se koristiti za pronalaženje izvora infekcije upoređivanjem profila humanog izolata sa profilima izolata iz različitih izvora. Neka istraživanja su pokazala da se sojevi izolovani iz jedne epidemije grupišu u okviru istog klastera (Lindstedt *et al.*, 2000.). Događa se i da sojevi iz dve različite epidemije pripadaju istom klasteru.

Multiplex PCR (m-PCR) je varijanta PCR metode u kojoj se simultano umnožavaju dve ili više DNA sekvenci u istoj PCR reakciji (Henegariu *et al.*, 1997., Kalvatchev *et al.*, 2004.). Ove njegove karakteristike čine da se m-PCR koristi kao brza i pogodna alatka kako u istraživačkim, tako i u kliničkim laboratorijama. Primjenjuje se u dijagnostici delecija, mutacija i DNA polimorfizma, kao i u kvantitativnim esejima, ali se može koristiti i za identifikaciju uzročnika do nivoa vrste. Mogućnost simultane amplifikacije više ciljnih sekvenci zavisi od kompatibilnosti PCR prajmera koji se koriste u reakciji. Prilikom izvođenja m-PCR metode često se nailazi na određene probleme (izostanak amplifikacije nekih ciljnih sekvenci, nejednaka amplifikacija, nemogućnost reprodukovanja rezultata). Čest problem je i pojava nespecifičnih traka ili smira. Uspostavljanje m-PCR protokola za određenu svrhu zahteva dugotrajnu i

napornu optimizaciju svih komponenti PCR reakcije, pri čemu se najveća pažnja posvećuje prajmerima, kao i optimizaciju uslova amplifikacije.

m-PCR metoda našla je primenu i u identifikaciji uzročnika do nivoa vrste. Razvijeni su protokoli za identifikaciju *Campylobacter* vrsta, odnosno potvrdu *C. jejuni* i razlikovanje *C. jejuni* od *C. coli* (Denis et al., 1999., Persson i Olsen, 2005.). Denis i saradnici su razvili m-PCR za detekciju i razlikovanje *C. jejuni* od *C. coli* iz fecesa živine upotrebom tri seta prajmera: za gen 16S rRNA (MD16S1 upper primer i MD16S2 lower primer) koji je karakterističan za rod *Campylobacter*, *mapA* (MDmapA1 upper primer i MDmapA2 lower primer) karakterističan za *C. jejuni* i *ceuE* (COL3 upper primer i MDcol2 lower primer) karakterističan za *C. coli*. Za izvođenje metode može se koristiti kultura dobijena direktnim zasejavanjem uzoraka na čvrste podloge ili posle obogaćenja u tečnoj podlozi, pri čemu se pri obogaćenju povećava broj uzročnika, pa i količina DNA koja se može koristiti za analizu. Ovaj protokol omogućava skraćivanje uobičajene mikrobiološke procedure izolacije i identifikacije *Campylobacter* vrsta, omogućavajući brže postavljanje konačne dijagnoze.

Persson i Olsen (2005.) su izvršili ispitivanja primene m-PCR metode za identifikaciju *C. coli* i *C. jejuni* direktno iz uzoraka fecesa ljudi i iz čistih kultura uzročnika uzgajanih na selektivnim podlogama. Tokom istraživanja su korišćeni prajmeri za gen za hipurikazu *hipO* karakterističan za *C. jejuni* (*hipO-S* i *hipO-R* prajmer), prajmeri koji amplifikuju deo gena za aspartokinazu koja je karakteristična za *C. coli* (prajmeri CC18F i CC519R) i za gen 16S rRNA (prajmeri 16S-F i 16S-R) koji je karakterističan za rod *Campylobacter*, pa je korišćen kao interna kontrola PCR reakcije. Metoda je testirana na 88 izolata *C. jejuni* i 47 izolata *C. coli* i dala je gotovo 100% saglasnost sa rezultatima biohemijskih ispitivanja (sem jednog soja *C. coli*). Ukoliko je korišćena čista kultura, metoda je mogla da identifikuje izolat pri količini od 10 – 100 ćelija, dok je granica osetljivosti metode za uzorke stolice bila 10⁵ ćelija po gramu. Ovaj m-PCR protokol je razvijen za primenu u laboratorijama koje se bave rutinskom dijagnostikom u cilju bržeg postavljanja dijagnoze.

Još jedan m-PCR za identifikaciju *C. jejuni* i *C. coli* razvili su Al Amri i saradnici (2007.). Oni su primenjivali tri seta prajmera: *cadF* (gen specifičan za *Campylobacter* vrstu), *hipO* (za *C. jejuni*) i *asp* (za *C. coli*). Ovaj m-PCR je primenjen na uzorcima fecesa živine i stolice pacijenata obolelih od gastroenteritisa. Od 114 ispitivanih uzoraka 70 je identifikovano kao *C. jejuni*, 35 kao *C. coli*, a kod 9 uzoraka je utvrđena mešana infekcija. Dva uzorka koja su mikrobiološki bila negativna, u PCR

reakciji dala su pozitivan rezultat. Upoređivanjem sa rezultatima hidrolize hipurata, utvrđeno je da 9 uzoraka daju lažno negativnu reakciju hidrolize hipurata, odnosno da su iako hipurat negativni ipak posedovali gen za enzim koji razlaže hipurat i pripadali vrsti *C. jejuni*. Čak 17 uzoraka dalo je lažno pozitivnu reakciju razlaganja hipurata, odnosno nisu imali *hipO* gen pri m-PCR analizi. Ovi uzorci su identifikovani kao *C. coli* pri m-PCR, odnosno posedovali su gen za aspartokinazu. S obzirom da je gen *hipO* visoko konzervisan i specifičan za *C. jejuni* (Linton *et al.*, 1997., Sinha *et al.*, 2004.), nameće se zaključak da kod nekih drugih vrsta roda *Campylobacter*, verovatno *C. coli*, postoji gen koji za supstrat ima supstancu sličnu hipuratu, što može dovesti do lažno pozitivne reakcije hidrolize hipurata.

Linton i saradnici (1997.) su radili na razvoju PCR metode za brzu identifikaciju *C. jejuni* i *C. coli* iz uzoraka fecesa. Kao gen izbora za *C. jejuni* koristili su gen za enzim koji razlaže hipurat. Rezultati njihovog ispitivanja sugerišu da je ovaj gen visoko specifičan za *C. jejuni* jer nije bio izolovan ni iz jednog uzorka drugih vrsta iz roda *Campylobacter* (*C. coli*, *C. fetus*, *C. concisus*, *C. lari*, *C. helveticus*, *C. mucosalis*, *C. upsaliensis*, *Helicobacter pylori*), kao ni iz izolata iz mnogobrojnih drugih rodova enterobakterija (*Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *E. coli* serotype O157, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella virchow*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, itd.). Nasuprot, gen je prisutan i kod izolata *C. jejuni* koji ne pokazuju aktivnost razlaganja hipurata.

S obzirom na kompleksnost procedura za izolovanje i tipizaciju *Campylobacter jejuni* i tešku manipulaciju genomom ovog uzročnika, više grupa autora primenjivalo je u svojim istraživanjima različite molekularne metode i poredilo rezultate tipizacije dobijene u ovim studijama. Osnovni cilj u svim ovim ispitivanjima bio je odrediti jednu ili više metoda koje su dovoljno robustne da daju ponovljive rezultate, a istovremeno omogućavaju poređenje rezultata iz različitih laboratorija, pri čemu su izolati poreklom iz različitog materijala i sa različitih geografskih područja.

McCarthy *et al.* (2012.) pokušali su da objasne sezonalnost pojave i druge aspekte kampilobakterioza integriranim pristupom, koristeći metode populacione genetike (primena standardnog upitnika *Campylobacter* Sentinel Surveillance Scheme – CSSS) i epidemiološke studije tokom ispitivanja koje je trajalo 3 godine na velikom broju slučajeva u različitim geografskim područjima (Velika Britanija, Finska,

Australija, Novi Zeland). Tokom istraživanja zaključeno je da se populacije *Campylobacter jejuni* izolovane iz različitih geografskih područja međusobno razlikuju, pri čemu su dve populacije izolovane u različitim delovima Velike Britanije međusobno gotovo identične i dosta slične populacijama iz Australije i sa Novog Zelenda, dok se finska populacija najviše razlikuje. Tokom perioda od 3 godine uočeno je da je populacija izolata iz Velike Britanije relativno stabilna, kao i populacija iz Finske. Razlike koje postoje između seta izolata iz Velike Britanije i Finske mogu biti posledica razlika u tipu hrane koja se koristi u ovim zemljama – namirnice koje se masovno koriste u Finskoj razlikuju se od onih koje se koriste u ostale tri zemlje što govori o potencijalnoj povezanosti izolata sa vrstom životinjskog domaćina. Takođe, uočene su razlike u distribuciji klonalnih kompleksa među državama – npr. oko 45% izolata iz Finske pripadalo je kompleksu ST45, dok je procentualna zastupljenost ovog kompleksa u Velikoj Britaniji bila 5 puta niža, a u Australiji i Novom Zelandu čak 10 puta niža. Što se tiče sezonalnosti infekcije, uočene su razlike u distribuciji klonalnih kompleksa tokom i van sezone. Jaki sezonalni efekti uočeni su kod kompleksa ST45 i ST283 koji su pokazivali vrhunac tokom letnje sezone, kao i za ST257 koji je češće izolovan tokom ostatka godine. Subtipovi izolata varirali su i sa godinama pacijenata. Kod starijih pacijenata (preko 60 godina) kompleks ST257 bio je češće izolovan, a ST574 ređe u odnosu na pacijente mlađe od 30 godina. Nije uočena povezanost pola sa subtipom uzročnika. Dužina bolesti i jačina simptoma nisu dovedeni u vezu sa izolovanim klonalnim kompleksom.

Behringer *et al.* (2011.) sproveli su studiju tipizacije na 100 izolata *C. jejuni* i *C. coli* izolovanih iz brojlera ili mesa brojlera upotrebom četiri molekulske tehnike: *flaA*-RFLP, MLST, PFGE i REP-PCR. REP-PCR je rađen na automatizovanom sistemu Diversilab (Biomerieux). Ova tehnika korišćena je za tipizaciju različitih mikroorganizama poput *Neisseria meningitidis*, *Candida* izolata, dermatofita i nekih mikroorganizama iz zemljišta, ali nije bila ispitana na *Campylobacter*-u. Korišćeni metodi tipizacije ispitivani su u pogledu svoje diskriminatorne moći, reproducibilnosti i epidemiološkog slaganja. Sposobnost metoda da formira klastere ispitivanih sojeva procenjena je na osnovu modifikovanog Rand i Wallace koeficijenta. *flaA*-RFLP metoda imala je sposobnost tipizacije u 96% slučajeva, što je od četiri ispitivane metode najniži procenat. Formirani profili su se preklapali za *C. jejuni* i *C. coli* u 7 slučajeva. Mogućnost rekombinacije unutar flagelarnih gena, kao i između oba lokusa ovog gena onemogućava upotrebu ove

metode za dugoročne epidemiološke studije. MLST metoda omogućila je tipizaciju svih ispitivanih uzoraka (100 %). Prednost ove metode je što omogućava nedvosmisleno razlikovanje *C. jejuni* od *C. coli*, kao i što omogućava ponovljivost između laboratorija, pa samim tim i upoređivanje rezultata. PFGE metoda omogućila je tipizaciju 96% ispitivanih izolata, pri čemu nema preklapanja profila između *C. jejuni* i *C. coli*, što znači da metoda ima veliku diskriminatornu moć. REP-PCR metoda omogućila je tipizaciju 100% ispitivanih sojeva, ali je dolazilo do preklapanja profila *C. jejuni* i *C. coli*. Takođe, klasteri formirani primenom ove metode nisu bili uporedivi sa klasterima formiranim primenom drugih metoda, a sojevi unutar klastera nisu grupisani na osnovu izvora infekcije ili lokacije izolovanih sojeva. Međusobna upoređivanja ovih metoda dala su nisku stopu slaganja, mada je slaganje bilo bolje između MLST i PFGE, nego kod bilo koje druge kombinacije metoda. REP-PCR metoda daje bolje rezultate kod tipizacije *C. jejuni* nego *C. coli*, ali ne omogućava nedvosmisleno razlikovanje ove dve vrste. Formiranje klastera je delovalo nasumično, bez obzira na lokaciju izolata, izvor ili vrstu.

Biswas *et al.* (2011.) su ispitivali rasprostranjenost gena povezanih sa virulencijom *C. jejuni* u izolatima poreklom od ljudi i iz fecesa tovne junadi, kao i njihovu sposobnost kolonizovanja jednodnevnih brojlera. Ispitivano je prisustvo 14 gena od kojih je 7 odgovorno za adherenciju i kolonizaciju uzročnika u crevima (*flaC*, *cadF*, *docC*, *racR*, *jlpA*, *peb1* i *dnaJ*), 4 za sposobnost prodiranja (*virB11*, *ciaB*, *pldA* i *iamA*) i 3 za zaštitu od delovanja nepovoljnih uslova iz okruženja (*htrA*, *cbrA* i *sodB*). Svi sem gena *virB11* bili su široko rasprostranjeni kod izolata oba porekla. Od broja ispitivanih izolata 67% je posedovalo svih ostalih 13 gena. Geni odgovorni za adherenciju, invazivnost i preživljavanje u nepovoljnim uslovima okoline bili su češće zastupljeni kod izolata poreklom od ljudi nego od onih iz fecesa goveda. Ipak, uočena je sličnost u obrascima gena koji su bili prisutni kod izolata poreklom od ljudi i goveda na istom geografskom području koji su prikupljeni u isto vreme. Gen *cadF* odgovoran za proizvodnju proteina koji se vezuje za fibronektin spoljašnje membrane ćelije bio je prisutan kod svih ispitivanih izolata, te se veruje da je neophodan za kolonizaciju crevnog epitela. Međutim, izolati sa različitim obrascima prisustva ispitivanih gena i različitog porekla su pokazivali dobru sposobnost kolonizacije jednodnevne piladi sa nivoima kolonizacije koji su odgovarali nivou nastalom posle unošenja referentnog soja NCTC 11168. Rezultati ovog ispitivanja sugerišu mogućnost infekcije ljudi sojevima

uzročnika poreklom od tovne junadi, pogotovu u svetlu nalaza kolonizacije piladi istim sojevima.

Wilson *et al* (2009.) su analizirali 63 izolata *Campylobacter jejuni* prikupljenih kod piladi iz različitog okruženja (konvencionalno gajenih, organski gajenih, gajenih na otvorenom prostoru u tri američke države) u cilju otkrivanja genetičkog diverziteta među izolatima, kao i eventualne povezanosti načina uzgoja i genotipa izolata. U prikazanoj studiji prevalenca *C. jejuni* bila je najniža kod jata u slobodnom uzgoju (8%), dok je najveća prevalenca bila kod organski gajenih jata (40%). Primenjene su metode PFGE, MLST i rep-PCR. rep-PCR profili izrađeni su kombinovanjem REP-PCR, ERIC-PCR i BOX-PCR analize. MLST analiza zasniva se na analizi tzv. „house-keeping“ gena (visoko konzervativni region DNA), rep-PCR nasuprot analizira visoko varijabilne regione, dok PFGE u obzir uzima i konzervativne i varijabilne. Profili nastali kombinovanjem REP-PCR, ERIC-PCR i BOX-PCR analize (rep-PCR profili) bili su veoma heterogeni uz prisustvo dva amplikona (ERIC i BOX) koji su bili prisutni kod 95% *C. jejuni* izolata. rep-PCR je identifikovao 3 para izolata sa sličnošću većom od 90%, PFGE 12 setova ovakvih izolata, a kod MLST analize svi izolati, sem jednog, pokazivali su više od 90% homologije. rep-PCR je pokazao najveći stepen rezolucije. Prilikom analize rezultata na osnovu lokacije (geografsko poreklo uzoraka) uočeno je da grafikon nastao na osnovu rep-PCR analize pokazuje veće razlike među izolatima, ali je i dalje jasno grupisanje izolata prema državi u kojoj su uzorkovani. Ovakav položaj izolata na grafikonu kod rep-PCR metoda je posledica njegove visoke rezolucije. Opšti zaključak je da sva tri metoda imaju diskriminatorski potencijal, ali dok MLST može detektovati lateralne transfere gena i polimorfizam pojedinačnih nukleotida, PFGE i rep-PCR detektuju promene na nivou čitavog genoma, pri čemu bez potpunog sekvencioniranja nije moguće utvrditi njihovo poreklo.

Møller Nielsen i saradnici (2000.) ispitivali su 90 izolata *C. jejuni* poreklom od živine, goveda i ljudi primenom 6 metoda tipizacije (Penner-ova šema serotipizacije, ribotipizacija, PFGE, RAPD, *flaA*-RFLP i *flaA*-DGGE (denaturišuća gradijent gel elektorforeza – denaturing gradient gel electrophoresis)). Metodi su ocenjeni i poređeni prema sposobnosti da identifikuju izolate poreklom iz jedne epidemije i da naprave razliku između nepovezanih izolata. Najveću diskriminatorsku moć pokazali su RAPD i PFGE. Svi izolati mogli su da se tipiziraju na sve ispitivane načine. Formirano je 13 potencijalnih grupa prema kriterijumu da se izolati moraju grupisati u istu grupu upotrebom minimalno 4 od 6 ispitivanih metoda. Nije bilo

moguće povezati izolate sa samo jednim izvorom infekcije, u svakoj grupi bilo je izolata različitog porekla.

Predstavnici roda *Campylobacter* široko su rasprostranjeni u prirodi, podložni štetnim uticajima okoline, komplikovani za izolaciju zbog zatevnih uslova rasta i pojave nekulturable formi i veoma raznovrsni. Ove njihove osobine koje uslovljavaju tešku izolaciju i ispitivanje pojedinačnih izolata s jedne strane, s druge strane omogućavaju sprovođenje populacionih studija (Maiden & Dingle, 2008.). Biološke karakteristike uzročnika, a naročito njegova specijalizacija za pojedine domaćine i raznovrsnost u okviru vrste i roda, značajni su za nastanak kampilobakterioza ljudi. Glavni uzročnici kampilobakterioza su *C. jejuni* i *C. coli* koji uzrokuju 90%, odnosno 10% oboljenja ljudi. Oboljenje ljudi nastaje oralnim unošenjem kontaminirane hrane i vode. Određene grupe autora, među njima i ovde pomenuti Maiden i Dingle, se prvenstveno bave promenama genoma na nivou nukleotida stavljajući u prvi plan metode kao što su MLST i SNP, formiranje klonalnih kompleksa i izradu genealoških stabala na osnovu detektovanih promena. Iako su ove metode veoma informativne, zahtevaju mnogo vremena i velika novčana sredstva, pa nisu pogodne za standardne laboratorije.

Uzimajući u obzir specifičnosti autohtonih populacija bakterija, pa i *Campylobacter jejuni*, ova istraživanja su usmerena ka pronalazenju najadekvatnijih tehnika i razvijanju sistema za reproducibilni, rezolutivni i ekonomičan (u pogledu vremena i sredstava) način za tipizaciju bakterija unutar roda *Campylobacter*, sa posebnim osvrtom na vrstu *C. jejuni*.

3. CILJEVI I ZADACI ISTRAŽIVANJA

U savremenom svetu *Campylobacter jejuni* predstavlja jednog od najčešćih uzročnika humanog gastroenteritisa. Bolest se obično pojavljuje sporadično, eventualno u vidu porodičnih epidemija i veoma je teško pronaći izvor infekcije. Epidemiologija i načini prenošenja uzročnika su, takođe, nejasni. Svi ovi problemi ukazuju na potrebu razvoja novih metoda za izolaciju, identifikaciju i tipizaciju uzročnika koje bi mogle pomoći u praćenju i iskorenjivanju bolesti.

Cilj ovih istraživanja je detekcija *Campylobacter* vrsta i tipizacija izolata, posebno *C. jejuni*, u živinskom mesu u Republici Srbiji. S obzirom da sama izolacija uzročnika i njegova identifikacija do nivoa vrste ne daje podatke koji mogu dovesti do povezivanja konkretnog izvora infekcije sa nastalom epidemijom, potrebno je izvršiti tipizaciju uzročnika odgovarajućim metodama u zavisnosti od potreba istraživanja.

Postavljeni zadaci:

1. Utvrditi nivo kontaminacije brojlera na farmi *Campylobacter* vrstama, kao i nivo prisustva uzročnika u okruženju farmi;
2. Utvrditi nivo kontaminacije brojlera na klanici;
3. Utvrditi značaj pilećeg mesa kao izvora infekcije ljudi, kao i značaj brojlera kao rezervoara uzročnika kampilobakterioze ljudi;
4. Primeniti adekvatne metode za tipizaciju izolovanih sojeva kako bi se oni uporedili međusobno i sa referentnim sojevima;
5. Predložiti specifične mere u cilju smanjenja rizika od kampilobakterioze ljudi i analizirati njihov efekat na:
 - smanjenje procenta kolonizovanih jedinki na farmama
 - smanjenja broja inficiranih trupova na klanicama
 - obrazovanje potrošača kako da bezbedno rukuju hranom tokom pripreme

4. MATERIJAL I METODE

4.1 PLAN ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je sprovedeno u dve faze:

- formiranje kolekcije sojeva *Campylobacter* spp. (zadržani su sojevi koji su identifikovani kao *C. jejuni* i *C. coli*);
- molekularna ispitivanja odabranih sojeva iz kolekcije sa ciljem određivanja srodnosti među izolatima putem izrade filogenetskih stabala.

4.2 MATERIJAL

4.2.1 Uzorci za ispitivanje

Izbor uzoraka za ispitivanje izvršen je na osnovu parametara preciziranih u izveštaju EFSA iz 2006. godine:

- uzorkovanje je vršeno posle hlađenja, s obzirom da samo hlađenje predstavlja kritičnu tačku – tokom hlađenja dolazi do redukcije broja bakterija na trupu, ali u isto vreme lako dolazi do unakrsne kontaminacije trupova, pa se kao rezultat faze hlađenja može očekivati viša prevalenca, ali niži nivo kontaminacije;
- kao uzorak se može uzeti ceo trup ili koža sa dorzalne strane vrata brojlera (najmanje 25 g uzorka). U ovom istraživanju je umesto celog trupa uziman ispirak trupa u sterilnoj kesi uz upotrebu 100 ml sterilnog slanog peptona. Takođe, uzorkovani su i brisevi trupova. Brisevi su odmah nakon uzorkovanja transportovani u laboratoriju u transportnom medijumu ili u medijumu za obogaćenje;
- uzorkovanje je vršeno na nivou klanice – poreklo brojlera nije uzimano u obzir (da li su sve ptice sa iste farme ili se istog dana vrši klanje sa različitih farmi, pa je došlo do mešanja jata);
- uzorkovanje je vršeno u nekoliko klanica u Pomoravskom okrugu pri čemu je veličina klanice i način rada, kao i kvalitet opreme u njima bio različit – od industrijskih klanica do polu-zanatskih objekata.

Ispitivanja su vršena od februara 2011. do juna 2012. godine. Uzorci su uzimani iz 4 klanice za živinu sa Pomoravskog epizootiološkog područja. Ukupan broj uzoraka sa klanica bio je 190. Pregled broja i vrste uzoraka iz klanice dat je u tablici br. 3.

Tablica 3: Broj i vrsta pregledanih uzoraka iz klanica

klanica uzorak	B	A	W	C	UKUPNO
bris trupa	16	37	15	37	104
ispirak trupa	9		10		19
kožice sa dorzalnog dela vrata	15	15	22		52
jetra	8				8
cekum			6		6
UKUPNO	48	52	53	37	190

Jedan broj ispitivanih uzoraka (43 uzorka) poticao je sa 4 farme za uzgoj živine. Ispitivanja na farmama vršena su da bi se dobio uvid u procenat kolonizovanih jedinki koje, s obzirom da nose *Campylobacter* kako u crevima, tako i na koži i perju, mogu biti izvor kontaminacije trupova u klanicama. Pregled vrsta i broja uzoraka sa farmi dat je u tablici br. 4.

Tablica 4: Broj i vrsta pregledanih uzoraka iz primarne proizvodnje (sa farme)

farma uzorak	S	P	CF	AG	UKUPNO
feces	14	6	2	8	30
bris fecesa		6			6
bris iz objekta			4		4
hrana			1		1
voda			2		2
UKUPNO	14	12	9	8	43

Broja pregledanih uzoraka po mesecima dat je u tablici br. 5.

Tablica 5: Broj pregledanih uzoraka po mesecima tokom trajanja ispitivanja

Period	Broj pregledanih uzoraka
Februar 2011.	24
Jun 2011.	18
Jul 2011.	45
Novembar 2011.	29
Februar 2012.	8
Mart 2012.	30
April 2012.	9
Jun 2012.	40
Oktobar 2012.	30
Ukupno	233

4.2.2 Izolati *Campylobacter* spp.

S obzirom da je jedan od ciljeva ispitivanja bio i upoređivanje izolata poreklom od ljudi sa onima poreklom od živine, tokom ispitivanja korišćeno je i nekoliko izolata koji su nabavljeni iz zavoda za zaštitu zdravlja ljudi (ukupno **7** izolata). Pregled ovih izolata dat je u tablici br. 6.

Tablica 6: Broj i vrsta izolata humanog porekla

ZZJZ izolat	Z	V	UKUPNO
feces čoveka	2	5	7
UKUPNO	2	5	

4.2.3 Hranljive podloge i dodaci

Tokom ovih istraživanja korišćene su komercijalne hranljive podloge i dodaci proizvođača Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK.

Za izolaciju *Campylobacter* vrsta korišćene su tečne (Bolton bujon) i čvrste diferencijalne (CCDA – selektivni *Campylobacter* agar bez dodatka krvi i Columbia krvni agar) podloge uz dodatak odgovarajućih suplemenata. Izolacija je vršena u mikroaerofilnim uslovima u loncu za anaerobe uz upotrebu vrećica za obezbeđenje mikroaerofilnih uslova (CampyGen™).

4.2.4 Reagensi za molekularna ispitivanja

- Polimeraze:
 - DreamTaq Green PCR Master Mix (2×) (ThermoScientific, Waltham, USA) – ready-to-use rastvor koji sadrži DreamTaq™ DNA polimerazu, optimizirani DreamTaq Green pufer, magnezijum-hlorid (MgCl₂) i dNTP miks. Ovaj master miks sadrži i dve boje koje se koriste za obeležavanje produkata, kao i reagens za podešavanje gustine što omogućava direktno očitavanje proizvoda PCR reakcije na gelu.
 - Phusion Hot Start High Fidelity Polymerase (ThermoScientific Fermentas, Waltham, USA)
- Prajmeri (Metabion International AG, Martinsried, Germany)
- Molekularni markeri:
 - Thermo Scientific GeneRuler Express DNA Ladder SM1551 (Thermo Scientific, Waltham, USA)
 - GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331 (ThermoScientific Fermentas, Waltham, USA)
- TBE (Tris borat EDTA bufer): 89mM Tris-HCl, 89mM borna kiselina, 2.5 mM EDTA [pH 8.2]
- Agarozna – Agarose Neo ultra qualitat (Carl ROTH, GmbH, Karlsruhe, Germany)
- Gelovi za elektroforezu: 1.5% agarozna u 0.5x TBE

4.2.5 Oprema

Tokom istraživanja korišćena je standardna laboratorijska oprema. Za molekularna ispitivanja, osim ove opreme, korišćeni su neki specifični aparati:

- centrifuga MPW 350R, MPW Medical Instruments, Poland
- Eppendorf MasterCycler Personal thermocycler, Eppendorf, Germany
- mikrotalasna peć, Neo
- magnetna mešalica, Raypa AG 2, Spain
- vorteks, Velp Scientifica, Italy
- termoblok CH 100, BioSan, Spain
- uobičajen laboratorijski pribor

4.3 METODE

4.3.1 Izolacija *Campylobacter* spp.

Za izolaciju i identifikaciju *Campylobacter* vrsta korišćena je metoda EN/ISO 10272-1:2006 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. Izolati su potvrđeni kao *Campylobacter* spp. primenom testova opisanih u ovom ISO standardu: izostanak rasta na 25° C u mikroaerofilnim uslovima, izostanak rasta na 42° C u aerobnim uslovima, pregled mikroskopskog preparata, oksidaza test. Posle potvrde, izolati su umnoženi u triptikaza-soja bujonu. Pripremljeni izolati čuvani su na -80°C u triptikaza-soja bujonu sa dodatkom glicerola (Cody et al., 2009.) do analize.

4.3.2 Biohemijska identifikacija izolata *Campylobacter* spp.

Za identifikaciju izolata do nivoa vrste primenjeni su biohemijski testovi opisani u primenjenom ISO standardu: detekcija katalaze, detekcija hidrolize hipurata, osetljivost na naldiksičnu kiselinu i cefalotin. Testovi su sprovedeni na način opisan u ovom standardu. Kao potvrda da se radi o vrsti *C. jejuni* korišćen je test hidrolize hipurata.

4.3.3 Priprema bakterijskih izolata za PCR

Izolati *Campylobacter* spp. su posle odmrzavanja osveženi u Bolton bujonu, a zatim kultivisani na Columbia krvnom agaru bez dodatka suplementa. Kolonije sa Columbia krvnog agara su suspendovane u TE (Tris-EDTA-Mg²⁺) puferu. Izolacija DNA je izvršena posle lize ćelija usled zagrevanja suspenzije na 95°C tokom 10 minuta i naglog hlađenja na -20°C. Posle centrifugiranja (13000 rpm, 5 minuta), 50 µl supernatanta je preneto u 500 µl TE pufera i ovako pripremljen izolat je čuvan na -20°C do izvođenja PCR-a. Za analizu je korišćen 1 µl ovog uzorka.

4.3.4 Protokoli za PCR

4.3.4.1 m-PCR

m-PCR je sproveden u zapremini od 25 µl koja sadrži:

- DTG MasterMix (ThermoScientific Fermentas)
- 0.5mM MDmapA1 prajmera
- 0.5mM MDmapA2 prajmera
- 0.5mM COL3 prajmera
- 0.5mM MDCOL2 prajmera.

Spisak prajmera dat je u tablici br. 7.

Amplifikacija je sprovedena u Eppendorf MasterCycler Personal thermocycler-u, pri čemu je korišćen sledeći program:

- inicijalna denaturacija 10 min na 95°C,
- 35 ciklusa:
 - denaturacija 30 s na 95°C,
 - pripajanje 1 min 30 s na 59°C,
 - izduživanje (ekstenzija) 1 min na 72°C
- finalna ekstenzija 10 min na 72°C.

Tablica 7: Spisak prajmera korišćenih u m-PCR analizi

Prajmer	Sekvenca (5'–3')	Referenca
MDmapA1	CTA TTT TAT TTT TGA GTG CTT GTG	Denis <i>et al.</i> , 1999.
MDmapA2	GCT TTA TTT GCC ATT TGT TTT ATT	Denis <i>et al.</i> , 1999.
COL3	AAT TGA AAA TTG CTC CAA CTA TG	Denis <i>et al.</i> , 1999.
MDCOL2	TGA TTT TAT TAT TTG TAG CAG CG	Denis <i>et al.</i> , 1999.

4.3.4.2 RAPD

RAPD analiza je sprovedena u zapremini od 25 µl mešavine koja sadrži:

- DreamTaqGreen Master Mix (ThermoScientific Fermentas),
- 1 µl supernatanta bakterijske DNA kao matrice (templata) i
- 100 pM odgovarajućeg prajmera.

RAPD prajmeri i uslovi amplifikacije za RAPD analizu dati su u tablici br. 8.

Tablica 8: Prajmeri i uslovi amplifikacije za RAPD analizu

Prajmer	Sekvenca (5'–3')	Uslovi umnožavanja	Referenca
AP10	CAGGCCCTTC	1. inicijalna denaturacija 95°C 5 min 2. 45 ciklusa: 94°C 1 min 36°C 1 min 72°C 2 min 3. finalna ekstenzija 72°C 5 min	Selenska-Pobel <i>et al.</i> , 1996.
SPH1	GACGACGACGACGAC	1. inicijalna denaturacija 94°C 5 min 2. 40 ciklusa: 94°C 1 min 32°C 1 min 72°C 2 min 3. finalna ekstenzija 72°C 5 min	Dooley <i>et al.</i> , 1993.
AF14	GGTGCGCACT		Mliki <i>et al.</i> , 2001.
BC318	CGGAGAGCGA		Mliki <i>et al.</i> , 2001.
AX16	GTCTGTGCGG		Mliki <i>et al.</i> , 2001.
AG15	CCCACACGCA		Mliki <i>et al.</i> , 2001.
AK16	CTGCGTGCTC		Mliki <i>et al.</i> , 2001.
OPA8	CCGCAGCCAA		Mliki <i>et al.</i> , 2001.
OPA10	GTGACGTAGG		Mliki <i>et al.</i> , 2001.
DJP17	GTGCGCATCAGGCCGTA	1. inicijalna denaturacija 95°C 5 min 2. 35 ciklusa: 94°C 1 min 57°C 1 min 72°C 2 min 3. finalna ekstenzija 72°C 5 min	Dizajniran za ova istraživanja

4.3.4.3 rep- PCR

rep-PCR analiza je izvedena prema metodi Versalovic *et al.* (1991), primenom BOX prajmera: (GTG)₅ i BOX A1R i para prajmera ERIC 1R/ERIC 2. U 50µl zapremine PCR reakcije su sadržale po 1U Dream Taq Green Polymerase ili Phusion Hot Start High Fidelity Polymerase (ThermoScientific Fermentas), 1µl (~25 ng) bakterijske DNA kao matrice (templata) i 100 pM odgovarajućeg prajmera. Amplifikacija je sprovedena u Eppendorf MasterCycler Personal thermocycler-u prema uslovima datim u tablici br. 9.

Tablica 9: Prajmeri i uslovi amplifikacije za rep-PCR analizu

Prajmer	Sekvenca (5'–3')	Uslovi umnožavanja	Referenca
(GTG) ₅	GTG GTG GTG GTG GTG	1. Inicijalna denaturacija	Versalovic <i>et al.</i> (1991.)
BOX AIR	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G	94°C 3 min 2. 35 ciklusa: 94°C 1 min 53°C 1 min 65°C 8 min 3. konačna ekstenzija 65°C 16 min	
Par prajmera ERIC 1R ERIC 2	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G	1. Inicijalna denaturacija 95°C 5 min 2. 35 ciklusa: 94°C 1 min 53°C 1 min 65°C 8 min 3. konačna ekstenzija 65°C 16 min	

4.3.5 Vizuelizacija dobijenih PCR fragmenata

PCR fragmenati (po 8 µl) su razdvojeni horizontalnom elektroforezom (aparatus za horizontalnu elektroforezu MAXIGEL Eco 2, APELEX) u agaroznom gelu gustine 1.5% (w/v) i 0.5x TBE puferu za elektroforezu pri konstantnom naponu od 100V. Gelovi su vizuelizovani bojenjem etidijum bromidom. Procena veličine dobijenih fragmenata vršena je upoređivanjem sa markerima poznatih molekulskih masa „DNA ladder“ (ThermoScientific Fermentas SM1551 i SM0331).

4.4 KOMPJUTERSKI PROGRAMI KORIŠĆENI PRI OBRADI DOBIJENIH REZULTATA

4.4.1 Filogenetske analize

Sličnost izolata *Campylobacter* spp. procenjivana je na osnovu simple matching coefficient (SSM). SSM je statistički pokazatelj koji govori o sličnosti između podataka kad oni nose informacije podjednake vrednosti koje se obeležavaju sa 0 i 1 pri čemu 0 ne znači odsustvo informacije ili stanja. Formiranje klastera vršeno je na bazi UPGMA (unweighted pair group arithmetic average-linkage algorithm) analize primenom STATISTICA 7 software. STATISTICA 7 software omogućava analizu podataka, njihovu obradu, izradu statističkih pokazatelja. Ovaj program omogućava izradu filogenetskih stabala i formiranje klastera.

5. REZULTATI

Istraživanje je sprovedeno od februara 2011. do oktobra 2012. godine. Ukupno je pregledano 233 uzoraka poreklom od živine (sa klanice i farme), 3 izolata dobijena iz laboratorije za ispitivanje hrane, 7 izolata poreklom od ljudi i 2 referenta soja *C. jejuni*. Ukupno je izolovano i ispitano 55 izolata identifikovanih kao *Campylobacter* spp. i to: 43 izolata poreklom sa klanica živine, 5 izolata poreklom sa farmi, 5 izolata poreklom od ljudi i 2 referentna soja *C. jejuni*.

5.1 Prisustvo *Campylobacter* vrsta na klanici

Od ukupnog broja pregledanih uzoraka sa klanica za živinu (190), 43 uzorka su bila pozitivna na *Campylobacter* spp. što predstavlja 22.6%. Najviše pozitivnih uzoraka bilo je u uzorcima brisa – 34 pozitivna od 102 pregledana i ispirka trupova – 6 pozitivnih od 19 ispitanih (33.3% i 31.6% redom), zatim u uzorcima kože sa dorzalnog dela vrata – 3 pozitivna od 45 ispitanih (6.7%), dok iz jetri i cekuma uzetih na liniji klanja *Campylobacter* vrste nisu izolovane.

5.2 Prisustvo *Campylobacter* vrsta na farmama živine

Od ukupnog broja pregledanih uzoraka sa farmi (43), svega 5 uzoraka je bilo pozitivno što predstavlja 11.6%. Svi pozitivni uzorci bili su uzorci cekuma. Iz uzoraka briseva sa opreme, vode i hrane *Campylobacter* nije izolovan.

U tablici br. 10 dat je pregled broja pregledanih i broja pozitivnih uzoraka po mesecima.

Tablica 10: Broj pozitivnih uzoraka (identifikovanih kao *Campylobacter* spp.) po mesecima (broj pozitivnih / broj pregledanih uzoraka)

Period	Broj pozitivnih uzoraka / broj pregledanih uzoraka										
	Broj pregledanih uzoraka	brisa trupa	ispirak trupa	kožice sa dorzalnog dela vrata	jetra	cekum	feces	brisa fecesa	brisa iz objekta	hrana	voda
Februar 2011.	24	1/16			0/8						
Jun 2011.	18						0/11		0/4	0/1	0/2
Jul 2011.	45			3/45							
Novembar 2011.	29	0/8		0/7		0/6	0/8				
Februar 2012.	8	3/8									
Mart 2012.	30	9/20	2/10								
April 2012.	9		4/9								
Jun 2012.	40	12/20				5/6	0/8	0/6			
Oktobar 2012.	30	9/30									
Ukupno	233	34/102	6/19	3/52	0/8	5/12	0/27	0/6	0/4	0/1	0/2

Pregled izolata prema vrsti uzorka i lokaciji uzorkovanja dat je u tablici br. 11.

Izolati dobijeni iz laboratorije za ispitivanje hrane označeni slovom H su posle zasejavanja i pregleda mikroskopskog preparata odbačeni jer njihov rast na selektivnim podlogama u mikroaerofilnim uslovima nije bio karakterističan za *Campylobacter* vrste. Ovi uzorci su kasnije testirani i m-PCR metodom, a odsustvo amplifikovanih fragmenata je potvrdilo da se ne radi o predstavnicima roda *Campylobacter*.

Izolati poreklom od ljudi su do ispitivanja čuvani na -80° C. Posle odmrzavanja i osvežavanja, 5 izolata je poraslo na selektivnim podlogama. Ovi izolati su ispitani kao i izolati dobijeni od živine.

Tablica 11: Pregled izolata prema vrsti uzorka i lokaciji uzorkovanja

Objekat (vrsta i oznaka)	Poreklo	Oznaka izolata	Objekat (vrsta i oznaka)	Poreklo	Oznaka izolata	
Klanica B	Bris trupa brojlera	B6	Klanica C	Bris trupa brojlera	C22	
	Koža sa dorzalnog dela vrata	B8		Bris trupa brojlera	C23	
	Koža sa dorzalnog dela vrata	B14		Bris trupa brojlera	C24	
	Koža sa dorzalnog dela vrata	B15		Bris trupa brojlera	C25	
	Ispirak trupa brojlera	B7		Bris trupa brojlera	C26	
	Ispirak trupa brojlera	B13		Bris trupa brojlera	C32	
	Ispirak trupa brojlera	B9		Bris trupa brojlera	C33	
	Ispirak trupa brojlera	B10		Bris trupa brojlera	C34	
Klanica W	Ispirak trupa brojlera	W11		Bris trupa brojlera	C35	
	Ispirak trupa brojlera	W12		Bris trupa brojlera	C36	
	Bris trupa brojlera	W52		Bris trupa brojlera	C37	
Klanica A	Bris trupa brojlera	A47		Bris trupa brojlera	C38	
	Bris trupa brojlera	A48		Bris trupa brojlera	C59	
	Bris trupa brojlera	A5		Bris trupa brojlera	C60	
	Bris trupa brojlera	A4		Zavod za javno zdravlje Z	Feces čoveka	Z20
	Bris trupa brojlera	A3			Feces čoveka	Z21
	Bris trupa brojlera	A2	Zavod za javno zdravlje V	Feces čoveka	V16	
	Bris trupa brojlera	A1		Feces čoveka	V17	
	Bris trupa brojlera	A42		Feces čoveka	V18	
	Bris trupa brojlera	A43	Farma P	Cekum brojlera	P27	
	Bris trupa brojlera	A44		Cekum brojlera	P28	
	Bris trupa brojlera	A45		Cekum brojlera	P29	
	Bris trupa brojlera	A46		Cekum brojlera	P30	
	Bris trupa brojlera	A53		Cekum brojlera	P31	
	Bris trupa brojlera	A54	Laboratorija H		H39	
	Bris trupa brojlera	A55			H40	
	Bris trupa brojlera	A56			H41	
	Bris trupa brojlera	A57	Referentni sojevi R	ATCC 29428	R51	
	Bris trupa brojlera	A58		ATCC 33291	R50	

Svi izolati su potvrđeni kao rod *Campylobacter* primenom potvrdnih testova: izostanak rasta na 25° C u mikroaerofilnim uslovima, izostanak rasta na 42° C u aerobnim uslovima, pregled mikroskopskog preparata, oksidaza test. Da bi se identifikacija sprovela do nivoa roda, svi izolati pregledani su na prisustvo enzima koji razlaže hipurat. Prisustvo ovog enzima smatra se potvrdom da je izolat *C. jejuni*. Izolati

poreklom od ljudi potvrđeni kao *Campylobacter* spp. takođe su pregledani na prisustvo ovog enzima. Kao rezultat ove analize 24 izolata je potvrđeno kao *C. jejuni* (B14, B15, B7, B13, B9, B10, W11, W12, W52, A47, A5, A2, A42, A43, A44, A45, A46, A53, A58, C59, C60, V16, R50, R51), a 30 kao *C. coli* (B8, A48, A1, A3, A4, A54, A55, A56, A57, C22, C23, C24, C25, C26, C32, C33, C34, C35, C36, C37, C38, Z20, Z21, V17, V18, P27, P28, P29, P30, P31). Jedan izolat identifikovan je kao *C. lari*.

Ukoliko se posmatraju samo izolati poreklom od živine od ukupno 48 izolata, 21 izolat je potvrđen kao *C. jejuni*, a 26 kao *C. coli*. Jedan izolat je identifikovan kao *C. lari* (B6) što je potvrđeno primenom dodatnih biohemijskih testova (rezultati nisu prikazani u radu).

Od 5 ispitivanih izolata poreklom od ljudi jedan je potvrđen kao *C. jejuni*, a 4 kao *C. coli*.

Oba referentna soja korišćena tokom rada su *C. jejuni*. Ovi sojevi su biohemijski provereni pre upotrebe u radu.

Svi izolati sem izolata A53 dali su jasno pozitivnu ili negativnu reakciju, dok je kod ovog izolata došlo do blage promene boje u plavo-ljubičastu što upućuje na malu količinu uzročnika u uzorku. Rezultati biohemijske karakterizacije izolata dati su u tablica br. 12.

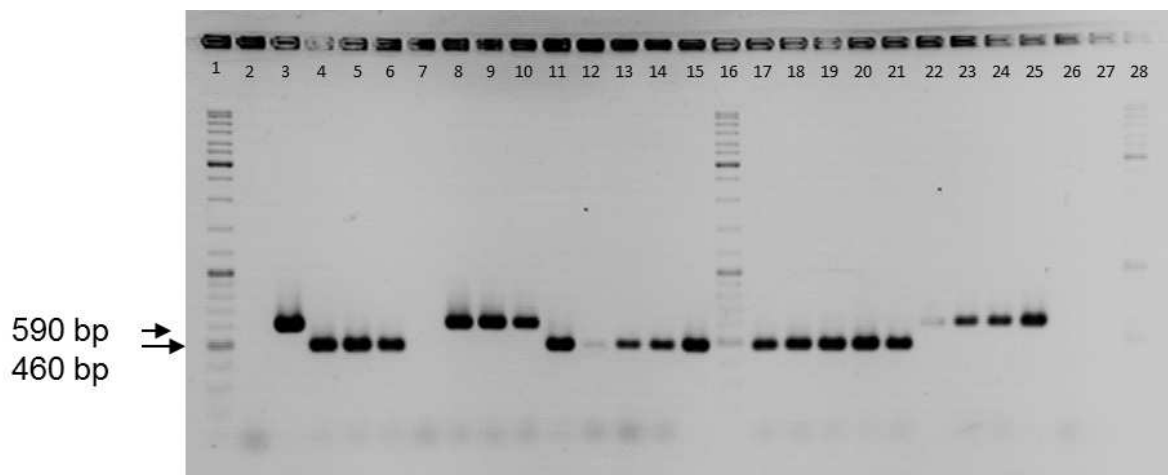
Tablica 12: Karakterizacija *Campylobacter* izolata prema biohemijskim osobinama

Uzorak	Karakteristike				<i>Campylobacter</i>	Uzorak	Karakteristike				<i>Campylobacter</i>
	Rast na 25° C mikroaer.	Rast na 41.5° C aerobno	Oksidaza	Hidroliza hupurata			Rast na 25° C mikroaer.	Rast na 41.5° C aerobno	Oksidaza	Hidroliza hupurata	
B6	-	-	+	-	<i>lari</i>	A58	-	-	+	+	<i>jejuni</i>
B8	-	-	+	-	<i>coli</i>	C22	-	-	+	-	<i>coli</i>
B14	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	C23	-	-	+	-	<i>coli</i>
B15	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	C24	-	-	+	-	<i>coli</i>
B7	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	C25	-	-	+	-	<i>coli</i>
B13	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	C26	-	-	+	-	<i>coli</i>
B9	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	C32	-	-	+	-	<i>coli</i>
B10	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	C33	-	-	+	-	<i>coli</i>
W11	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	C34	-	-	+	-	<i>coli</i>
W12	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	C35	-	-	+	-	<i>coli</i>
W52	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	C36	-	-	+	-	<i>coli</i>
A47	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	C37	-	-	+	-	<i>coli</i>
A48	-	-	+	-	<i>coli</i>	C38	-	-	+	-	<i>coli</i>
A5	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	C59	-	-	+	+	<i>jejuni</i>
A4	-	-	+	-	<i>coli</i>	C60	-	-	+	+	<i>jejuni</i>
A3	-	-	+	-	<i>coli</i>	Z20	-	-	+	-	<i>coli</i>
A2	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	Z21	-	-	+	-	<i>coli</i>
A1	-	-	+	-	<i>coli</i>	V16	-	-	+	+	<i>jejuni</i>
A42	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	V17	-	-	+	-	<i>coli</i>
A43	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	V18	-	-	+	-	<i>coli</i>
A44	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	P27	-	-	+	-	<i>coli</i>
A45	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	P28	-	-	+	-	<i>coli</i>
A46	-	-	+	+	<i>jejuni</i>	P29	-	-	+	-	<i>coli</i>
A53	-	-	+	+/-	<i>jejuni</i>	P30	-	-	+	-	<i>coli</i>
A54	-	-	+	-	<i>coli</i>	P31	-	-	+	-	<i>coli</i>
A55	-	-	+	-	<i>coli</i>	R51	-	-	+	+	<i>jejuni</i>
A56	-	-	+	-	<i>coli</i>	R50	-	-	+	+	<i>jejuni</i>
A57	-	-	+	-	<i>coli</i>						

5.3 REZULTATI MOLEKULARNIH ISPITIVANJA

5.3.1 Rezultati multiplex PCR analize

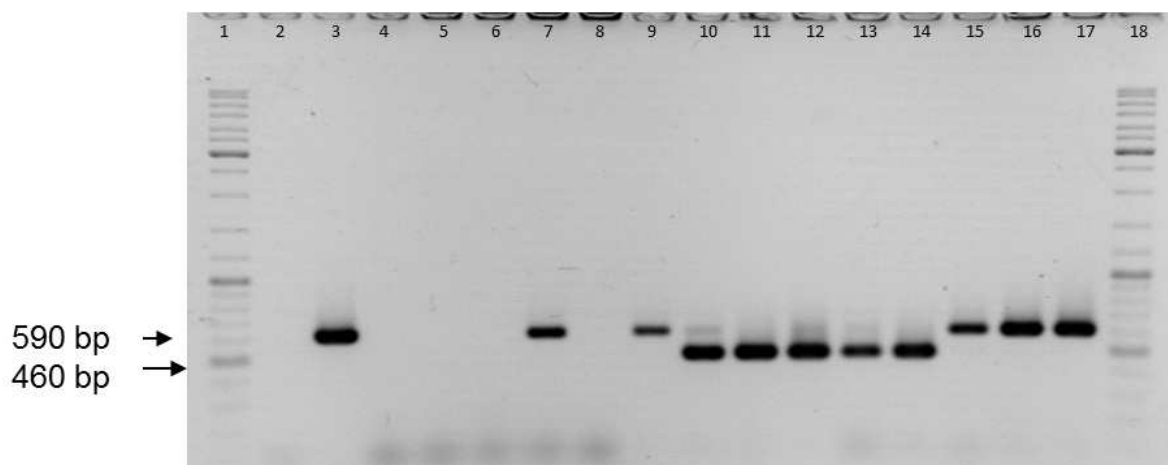
Modifikovani m-PCR je primenjen u cilju potvrde izolata na nivou vrste. Analiza je izvršena upotrebom dva od tri seta prajmera koji su specificirani u radu Denisa i saradnika (1999.). Kao rezultat ove amplifikacije dobijeni su fragmenti dužine 589 bp i 462 bp DNA koji odgovaraju rodu *Campylobacter*, vrstama *jejuni*, odnosno *coli*. Rezultati m-PCR analize dati su na slikama 2a i 2b.



Slika 2a: m-PCR izolata *C. jejuni* i *C. coli* na osnovu *mapA* i *ceuE* gena.

M – GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (Fermentas, Litvanija); sp – slepa proba

a) Linije 1, 16 i 28. M; Linije 3-15. R51; Izolati: A1; A2; A4; B6; B13; B15; V16; V17; Z20; Z21; C23; C24; Linije 17-27. C25; C26; P27; P29; P30; C34; C35; C36; C38; H39; sp



Slika 2b: m-PCR izolata *C. jejuni* i *C. coli* na osnovu *mapA* i *ceuE* gena.

M – GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (Fermentas, Litvanija); sp – slepa proba

b) Linije 1 i 18. M; Linije 3 - 17. R51; sp; Izolati: H40; H41; A43; A46; W52; A53; A54; A55; A56; A57; A58; C59; C60.

Tokom m-PCR analize dobijeni su sledeći rezultati: od 36 ispitivanih izolata 13 izolata je identifikovano kao *C. jejuni*, 17 kao *C. coli*, 1 je dao amplifikaciju na obe karakteristične trake (A53), a 5 nije dalo amplifikovane fragmente. Rezultati su dati u tablici br. 13.

Tablica 13: Karakterizacija izolata na osnovu rezultata m-PCR

Uzorak	m-PCR	Uzorak	m-PCR
R51	<i>C. jejuni</i>	C34	<i>C. jejuni</i>
A1	<i>C. coli</i>	C35	<i>C. jejuni</i>
A2	<i>C. coli</i>	C36	<i>C. jejuni</i>
A4	<i>C. coli</i>	C38	<i>C. jejuni</i>
B6	Nema amplifikacije	H39	Nema amplifikacije
B13	<i>C. jejuni</i>	H40	Nema amplifikacije
B15	<i>C. jejuni</i>	H41	Nema amplifikacije
V16	<i>C. jejuni</i>	A43	<i>C. jejuni</i>
V17	<i>C. coli</i>	A46	Nema amplifikacije
Z20	<i>C. coli</i>	W52	<i>C. jejuni</i>
Z21	<i>C. coli</i>	A53	<i>C. jejuni</i> / <i>C. coli</i>
C23	<i>C. coli</i>	A54	<i>C. coli</i>
C24	<i>C. coli</i>	A55	<i>C. coli</i>
C25	<i>C. coli</i>	A56	<i>C. coli</i>
C26	<i>C. coli</i>	A57	<i>C. coli</i>
P27	<i>C. coli</i>	A58	<i>C. jejuni</i>
P29	<i>C. coli</i>	C59	<i>C. jejuni</i>
P30	<i>C. coli</i>	C60	<i>C. jejuni</i>

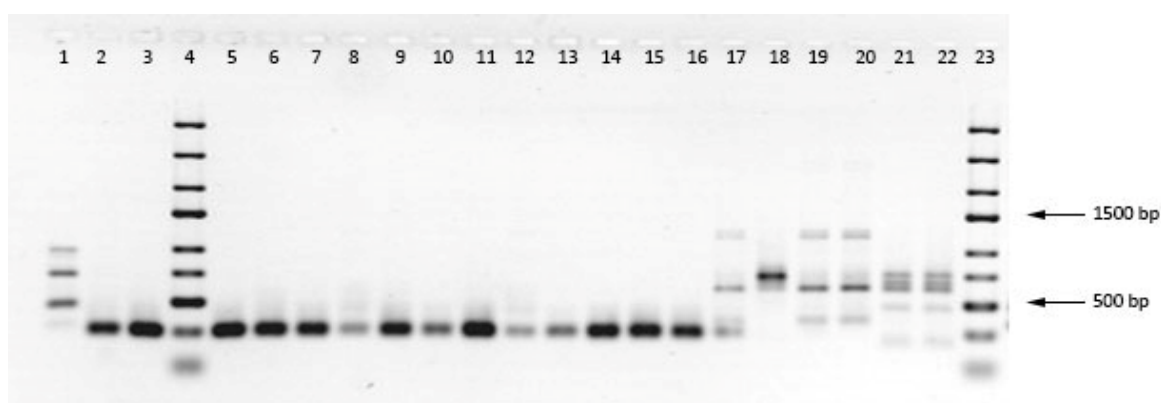
5.3.2 Rezultati RAPD analize

RAPD analiza sprovedena je upotrebom više prajmera: AP10, OPA8, OPA10, BC318, AF14, AX16, AG15, AK16 i SPH1. Neki od ovih prajmera bili su ranije korišćeni za analizu roda *Campylobacter* (npr. OPA8 i OPA10), dok su ostali korišćeni za RAPD analize drugih rodova bakterija i analize biljnog genoma. Jedan prajmer je nososintetisan tokom istraživanja, DJP17.

Rezultati RAPD analize upotrebom prajmera BC318, OPA8, SPH1, AK16, AG15, AP10 i DJP17 prikazani su na slikama 3 do 15. Upotrebom prajmera AP10, AG15, DJP17 bilo je moguće tipizirati sve ispitivane izolate, rezultati prajmera AK16 i SPH1 bili su manje informativni, dok pri upotrebi prajmera BC318, AF14 i OPA8 nisu dobijeni rezultati na osnovu kojih je moguće razlikovanje izolata unutar vrste. Prajmer OPA10 nije rezultovao amplifikacijom ni kod jednog izolata (rezultati nisu prikazani u radu).

Prajmer BC318 nije diskriminatoran u okviru vrste *C. jejuni* jer se kod svih ispitivanih izolata javila ista pojedinačna traka u profilu (slika 3). U okviru vrste *C. coli* izolati su rezultovali amplifikacijom nekoliko traka, pri čemu postoje i razlike među izolatima, pa je moguće iskoristiti ovaj prajmer za tipizaciju, ali u kombinaciji sa drugim prajmerima.

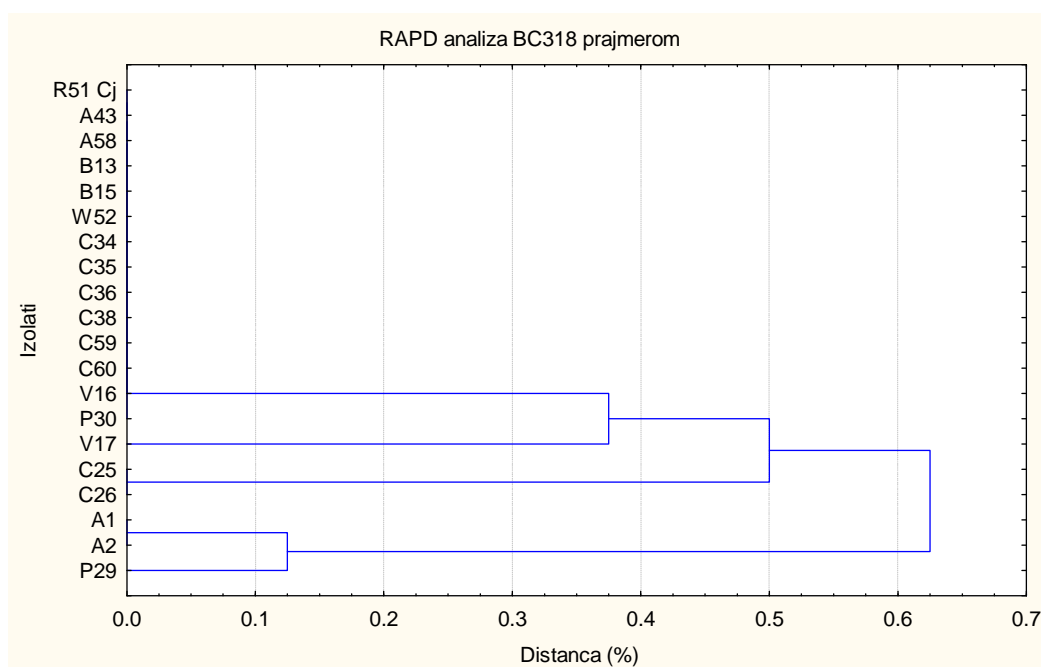
Na osnovu profila dobijenih RAPD prajmerima izrađeni su dendrogrami. Prajmer BC318 grupiše sve ispitivane izolate u 2 klastera. Svi izolati *C. jejuni* nalaze se u jednom klasteru, dok među *C. coli* izolatima postoje razlike koje ih dele u 2 klastera (slika 4). Razlika između klastera iznosi 63%. Klaster 1 koji obuhvata izolate A1, A2 i P29 različit je od ostalih izolata 63%, pri čemu su izolati A1 i A2 identični i veoma slični izolatu P29 (udaljenost oko 13%). Klaster 2 sadrži 2 subklastera: u subklasteru 1 se nalaze izolati *C. coli* C25 i C26 različiti 50% od subklastera 2, dok subklaster 2 ima 2 grane – granu 1 čine izolati *C. coli* P30 i V17 koji su 38% različiti od grane 2, a granu 2 čine svi *C. jejuni* izolati (12 izolata i jedan referentni soj R51).



Slika 3: RAPD profili izolata *C. jejuni* i *C. coli* na osnovu BC318 prajmera.

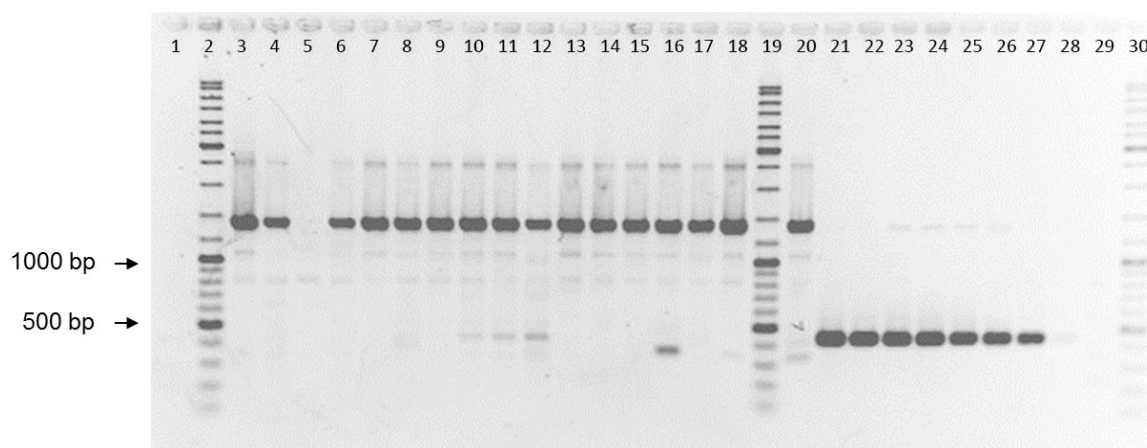
M – GeneRuler Express DNA Ladder SM1551 (Thermo Scientific); sp – slepa proba

Linija 1. *C. coli*: P30. Linije 2-3 R50; R51; Linije 5-16. *C. jejuni*: A43; A58; B13; B15; W52; C34; C35; C36; C38; C59; C60; V16; Linije 17-22. *C. coli*: P29; V17; A1; A2; C25; C26; Linije 4 i 23. M



Slika 4: Dendrogram na osnovu razlika izolata *C. jejuni* i *C. coli* dobijenih RAPD analizom BC318 prajmerom.

Prajmer OPA8 nije diskriminatoran unutar vrsta, ali daje razliku između *C. jejuni* i *C. coli*, pa se može koristiti ukoliko je nedostupno izvodjenje m-PCR (slika 5). U okviru svake od ovih vrsta, OPA8 amplifikuje slične profile za sve izolate, pri čemu postoje određene manje razlike među izolatima *C. jejuni*, dok svi izolati *C. coli* daju isti profil.

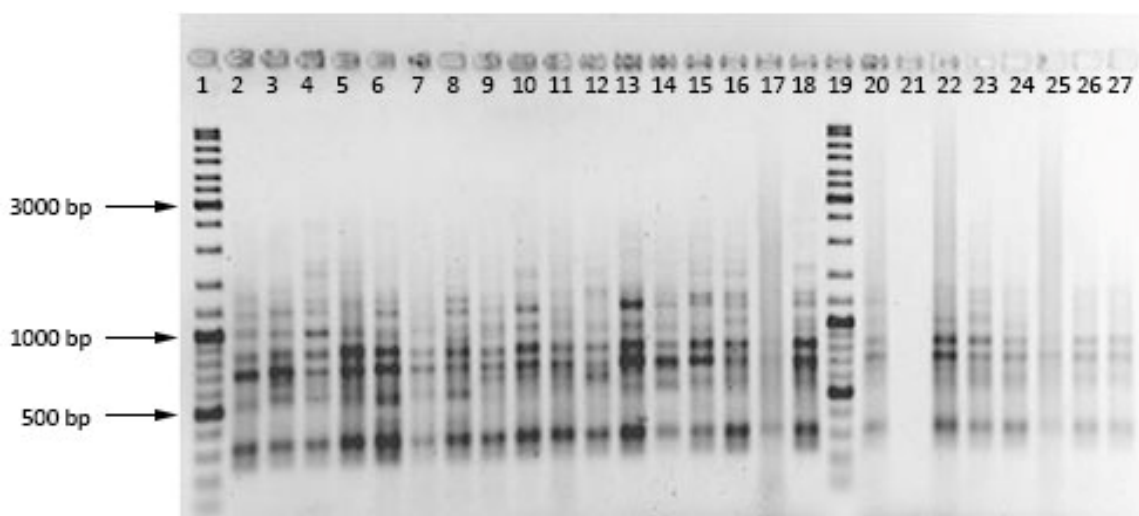


Slika 5: RAPD profili izolata *C. jejuni* i *C. coli* na osnovu OPA8 prajmera.

M – GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Litvanija); sp – slepa proba

Linije 1 i 2. sp; M; Linije 3-18. *C. jejuni*: R51; R50; B13; B15; W52; C34; C35; C36; C38; C59; C60; A43; A58; V16; R50; R51; Linije 19 i 20. M; A53; Linije 21-29. *C. coli*: V17; A1; A4; A55; C25; C26; P29; P30; Linija 30. M.

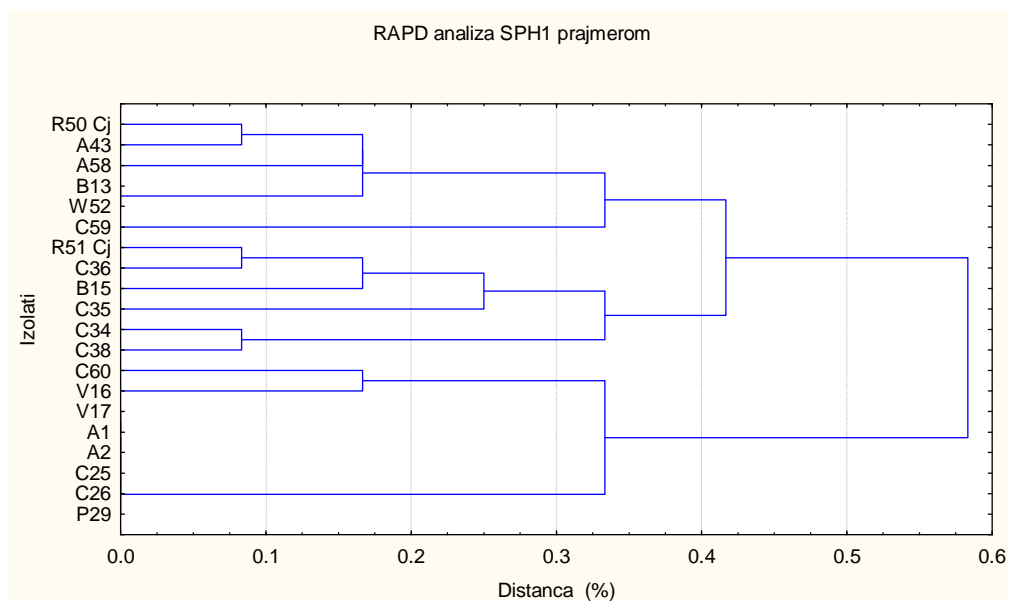
SPH1 prajmer amplifikuje profile ispitivanih izolata koji su umereno informativni, odnosno razlike među izolatima postoje, ali kod *C. coli* nisu dovoljne za samostalno razdvajanje po klasterima (slika 6 i 7). Klaster 1 obuhvata 2 subklastera: u subklasteru 1 se nalaze svi izolati *C. coli*, a u subklasteru 2 su izolati *C. jejuni* V16 i C60 koji se od izolata *C. coli* razlikuju oko 33%. Većina izolata *C. jejuni* grupisana je u okviru klastera 2 sa dva subklastera međusobno različita 42%. Izolati C34, C35, C36, C38 i B15 se nalaze u istom subklasteru kao R51, dok su izolati A43, A58, B13, W52 i C59 grupisani u drugom subklasteru sa R50.



Slika 6: RAPD profili izolata *C. jejuni* i *C. coli* na osnovu SPH1 prajmera.

M – GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Litvanija); sp – slepa proba

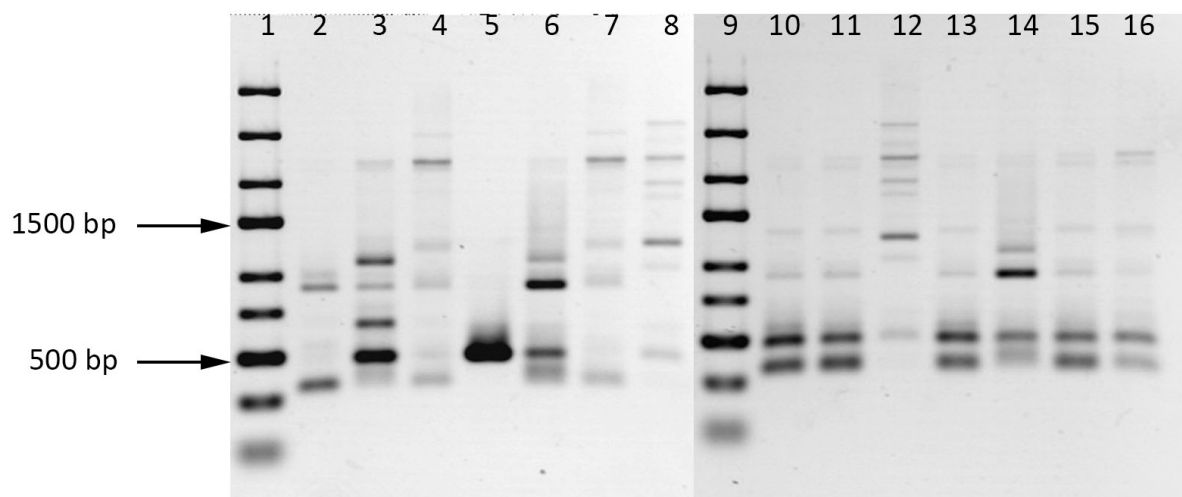
Linije 1 i 19. M; Linije 2-18. *C. jejuni*: R50; R51; A43; A58; B13; B15; W52; C34; C35; C36; C38; C59; C60; V16; R50; sp; R51; Linija 20-21. A53; sp; Linije 22-27. *C. coli*: V17; A1; A2; C25; C26; P29.



Slika 7: Dendrogram na osnovu razlika izolata *C. jejuni* i *C. coli* dobijenih RAPD analizom SPH1 prajmerom

Prajmer AK16 je umereno informativan. Profili koji nastaju amplifikacijom sastoje se od manjeg broja traka u odnosu na SPH1 (slika 8a i 8b). Razlike u okviru *C. jejuni* vrste su izraženije, izolati sadrže od 3 do 8 traka u profilu. Ovim prajmerom dobijaju se razlike čak i između sojeva koji su izolovani istovremeno na istoj lokaciji (C34, C35, C36). Takođe, uočljive su razlike među profilima *C. jejuni* i *C. coli* - *C. coli* daje manje traka u profilu i molekulska masa tih traka je manja. Klaster analiza ovih rezultata daje zanimljiv pogled na prikupljene izolate (slika 9). Izolat V17 koji je poreklom od ljudi i okarakterisan kao *C. coli* u m-PCR analizi blisko je srodan referentnom soju *C. jejuni* R50 (ATCC 33291), njihova udaljenost je oko 12%.

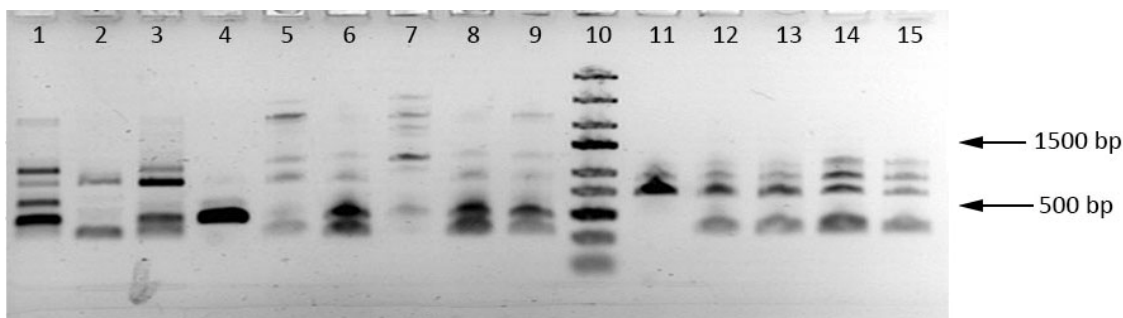
Dendrogram konstruisan analizom rezultata amplifikacije prajmerom AK16 razlikuje 2 klastera međusobno udaljena 66%. Klaster 1 je podeljen na 2 subklastera od kojih prvi sadrži izolate B15 i C36 i razlikuje se 53% od drugog subklastera koji sadrži izolate A43, C59 i referentni soj R51. Klaster 2 sadrži 2 velika subklastera sa više grana. U subklasteru 1 nalazi se 5 izolata različitih od drugih 47%. U drugom subklasteru se nalaze ostali izolati *C. jejuni*. Izolati *C. jejuni* su dispergovani u oba klastera, a izolati *C. coli* poreklom od živine se nalaze u okviru jedne grane drugog subklastera drugog klastera.



Slika 8a: RAPD profili izolata *C. jejuni* na osnovu AK16 prajmera

M – GeneRuler Express DNA Ladder SM1551 (Thermo Scientific)

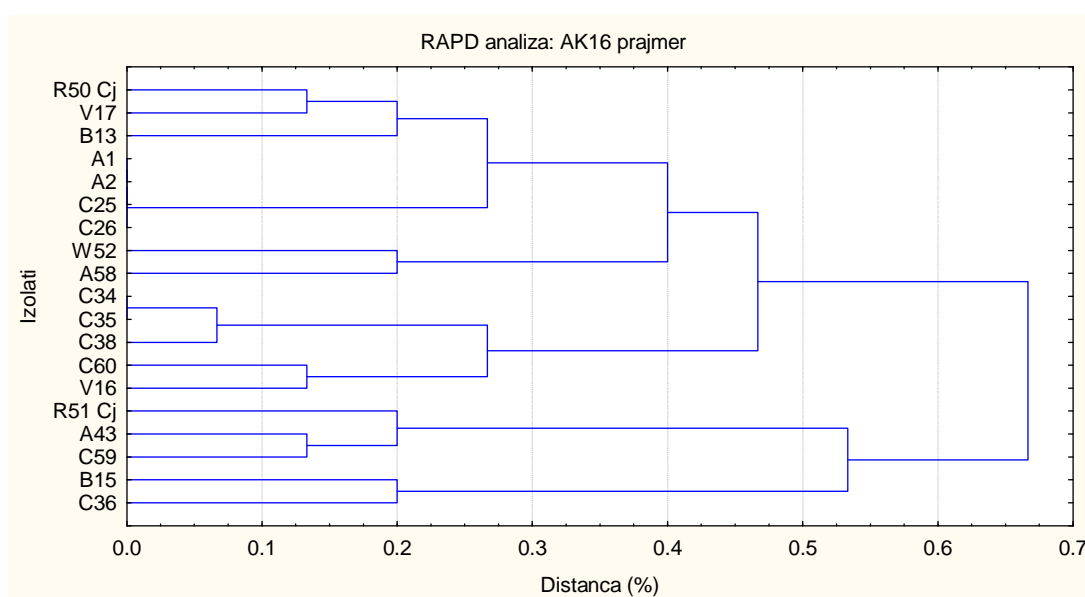
Linije 1 i 9. M; Linije 2-8. R50; R51; W52; A58; A43; B13; B15; Linije 10-16. C34; C35; C36; C38; C59; C60; V16.



Slika 8b: RAPD profili izolata *C. jejuni* i *C. coli* na osnovu AK16 prajmera

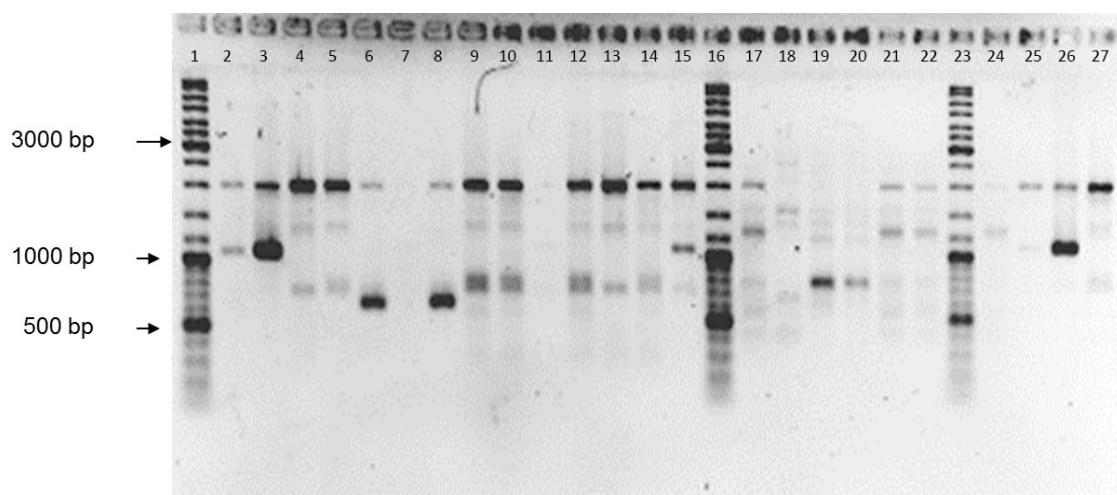
M – GeneRuler Express DNA Ladder SM1551 (Thermo Scientific)

Linije 1-9. *C. jejuni*: R51; R50; C59; A58; W52; C38; B15; C35; V16; Linija 10. M; Linije 11-15. *C. coli*: V17; A1; A2; C25; C26.



Slika 9: Dendrogram na osnovu razlika izolata *C. jejuni* i *C. coli* dobijenih RAPD analizom AK16 prajmerom

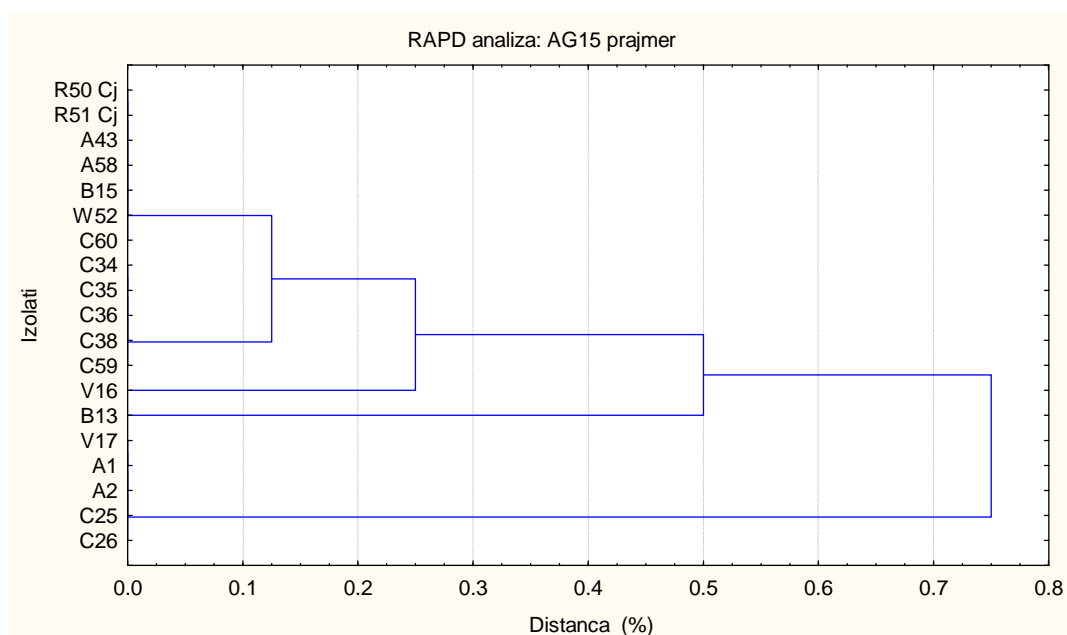
Prajmer AG15 je delimično informativan, jer profili sadrže manji broj traka. Ipak, uočljive su razlike među vrstama i unutar vrste (slika 10), tako da se ovi rezultati mogu uzeti u razmatranje pri izradi kombinovanog RAPD profila izolata. Klaster analiza daje 2 klastera (slika 11). Klaster 1 sadrži samo *C. coli* izolate koji su međusobno identični i od klastera 2 se razlikuju 75%. Klaster 2 sadrži *C. jejuni* izolate i ima 2 subklastera. Subklaster 1 sadrži samo izolat B13 koji se od subklastera 2 razlikuje 50%. Subklaster 2 klastera 2 sadrži 2 grane od kojih grana 1 sadrži samo izolat poreklom od ljudi V16, a grana 2 sadrži 10 izolata *C. jejuni* i dva referentna soja R50 i R51. Izolat V16 u grani 1 se od grane 2 razlikuje 25%.



Slika 10: RAPD profili izolata *C. jejuni* i *C. coli* na osnovu AG15 prajmera.

M – GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Litvanija); sp – slepa proba

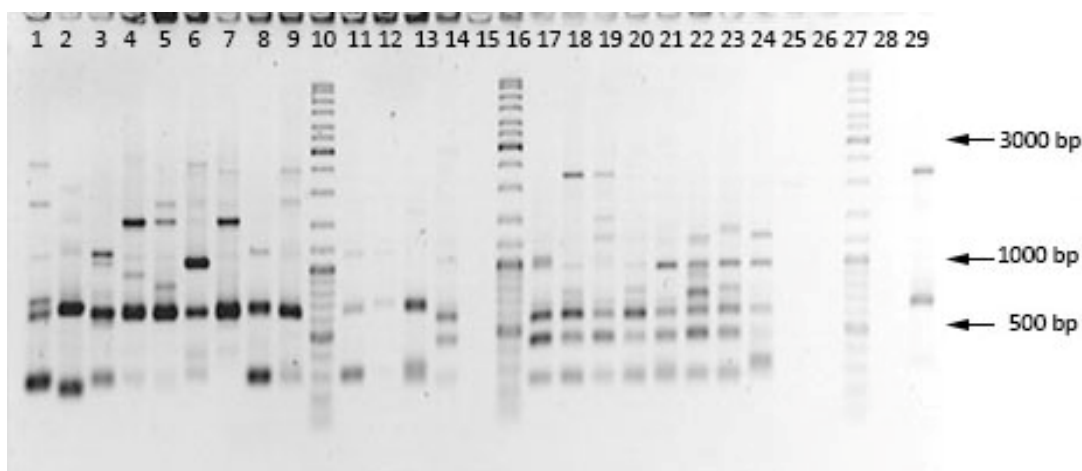
Linije 1, 16 i 23. M; Linije 2-15. *C. jejuni*: R50; R51; A43; A58; B13; sp; W52; C34; C35; sp; C36; C59; C60; V16; Linija 17. A53; Linije 18-22 i 24. *C. coli*: V17; A1; A2; C25; C26; P29; Linije 25-27. *C. jejuni*: B15; R51; C38.



Slika 11: Dendrogram na osnovu razlika izolata *C. jejuni* i *C. coli* dobijenih RAPD analizom AG15 prajmerom.

Analizom izolata prajmerom AP10 dobijeni su profili sa većim brojem traka što omogućava visoku diskriminatornu moć. Prajmer omogućava razlikovanje vrsta *C. jejuni* i *C. coli*, kao i razlikovanje u okviru iste vrste. Dobijeni rezultati su veoma informativni. Značajno je da se profili *C. coli* izolata međusobno razlikuju, može

se uočiti 7 različitih profila među 10 ispitivanih izolata (slike 12 i 13). Klaster analiza pomoću ovog prajmera grupiše izolate u 2 klastera koji razdvajaju *C. jejuni* i *C. coli*, međusobom različitih oko 63%. Klaster 1 sadrži *C. coli* izolate i podeljen je na 2 subklastera. Subklaster 1 obuhvata samo izolat P30 i razlikuje se od subklastera 2 oko 18%. Subklaster 2 sadrži 6 izolata *C. coli* različitog porekla. U okviru klastera *C. jejuni* uočavaju se 2 subklastera na nivou od 55% različitosti. Subklaster 1 obuhvata izolate C36 i C38 poreklom iz brisa trupa brojlera. Drugi subklaster klastera 2 ima dve grane od kojih grana 1 sadrži 4 izolata, a grana 2 sadrži 7 izolata. Grane se međusobno razlikuju 50%.

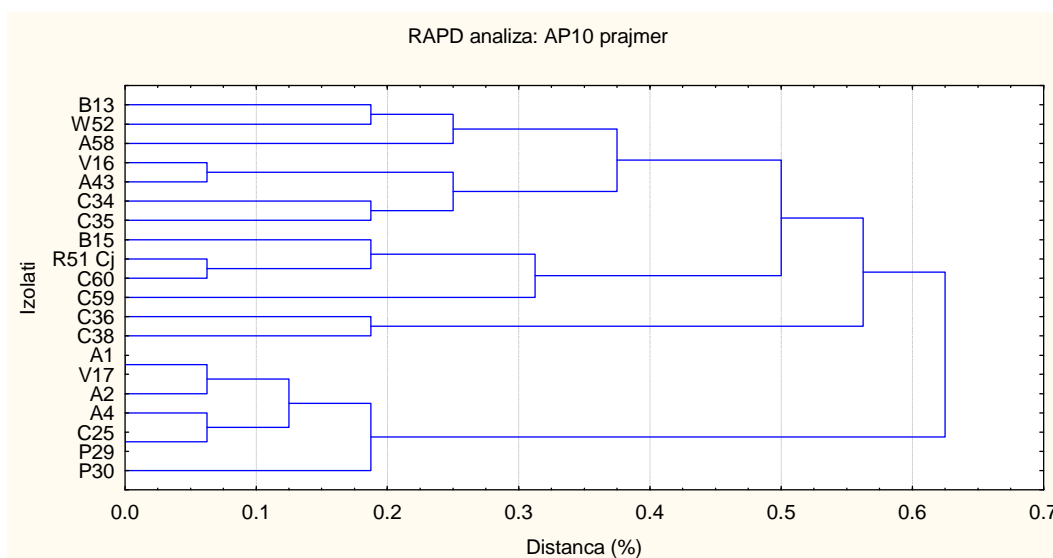


Slika 12: RAPD profili izolata *C. jejuni* i *C. coli* na osnovu AP10 prajmera.

M – GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Litvanija); sp – slepa proba

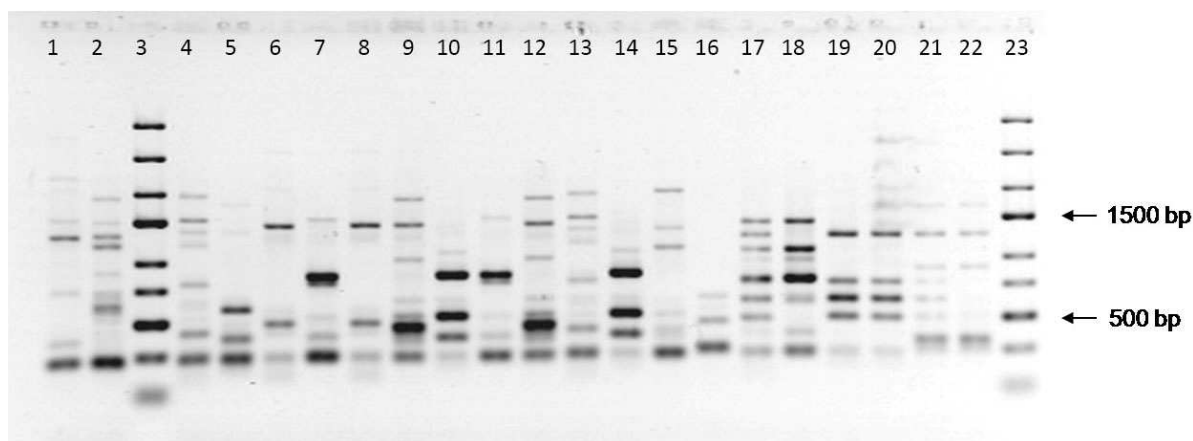
Linije 10, 16 i 27. M; Linije 1-9. *C. jejuni*: B13; B15; V16; C34; C35; C36; C38; C59; A58; Linije 11-13.

C. jejuni: R51; C60; A43; Linije 14-15. A53; sp; Linije 17-26. *C. coli*: A1; A2; A4; V17; C25; P29; P30; C23; Z21; C24; Linija 28. sp; Linija 29. *C. jejuni*: W52.



Slika 13: Dendrogram na osnovu razlika izolata *C. jejuni* i *C. coli* dobijenih RAPD analizom AP10 prajmerom.

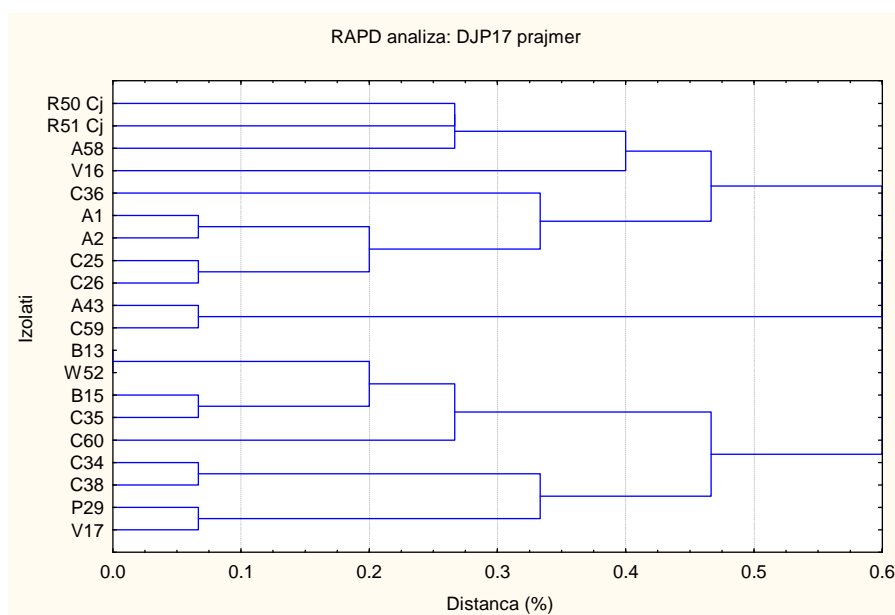
Prajmer DJP17 dizajniran je u ovim istraživanjima na osnovu sekvenci prajmera koji su rezultovali amplifikacijom fragmenata koji formiraju profile dovoljno informativne za razlikovanje izolata unutar vrste. Sastoji se od 17 parova baza, a temperatura pripajanja ovog prajmera iznosi 57°C što je više nego kod drugih korišćenih RAPD prajmera i povećava specifičnost. Ovaj prajmer rezultuje profilima sa 3 do 10 traka koji se razlikuju u okviru vrsta *C. jejuni* i *C. coli* (slika 14). Klaster analiza (slika 15) pomoću ovog prajmera grupiše izolate u 3 subklastera međusobno različitih 60%. Klaster 1 obuhvata 2 subklastera međusobno različita 46%. Subklaster 1 klastera 1 obuhvata dva izolata *C. coli* (P29 i V17) u okviru grane 1 i 2 izolata *C. jejuni* (C34 i C38) u okviru grane 2. Grane su međusobno različite 33%. Subklaster 2 klastera 1 obuhvata 5 izolata *C. jejuni*. Klaster 2 obuhvata 2 izolata *C. jejuni* (A43 i C59) koji su međusobno veoma slični (razlika oko 6%). Klaster 3 obuhvata dva subklastera međusobno različita 46%. U subklasteru 1 klastera 3 razlikuju se 2 grane međusobno udaljene 34%. U grani 1 nalaze se 4 izolata *C. coli*, a u grani 2 samo jedan izolat *C. jejuni* (C36). Subklaster 2 klastera 3 podeljen je na dve grane udaljene 40% od kojih grana 1 obuhvata samo izolat poreklom od ljudi V16, a grana 2 obuhvata 2 referentna soja i jedan *C. jejuni* izolat (A58).



Slika 14: RAPD profili izolata *C. jejuni* i *C. coli* na osnovu DJP17 prajmera.

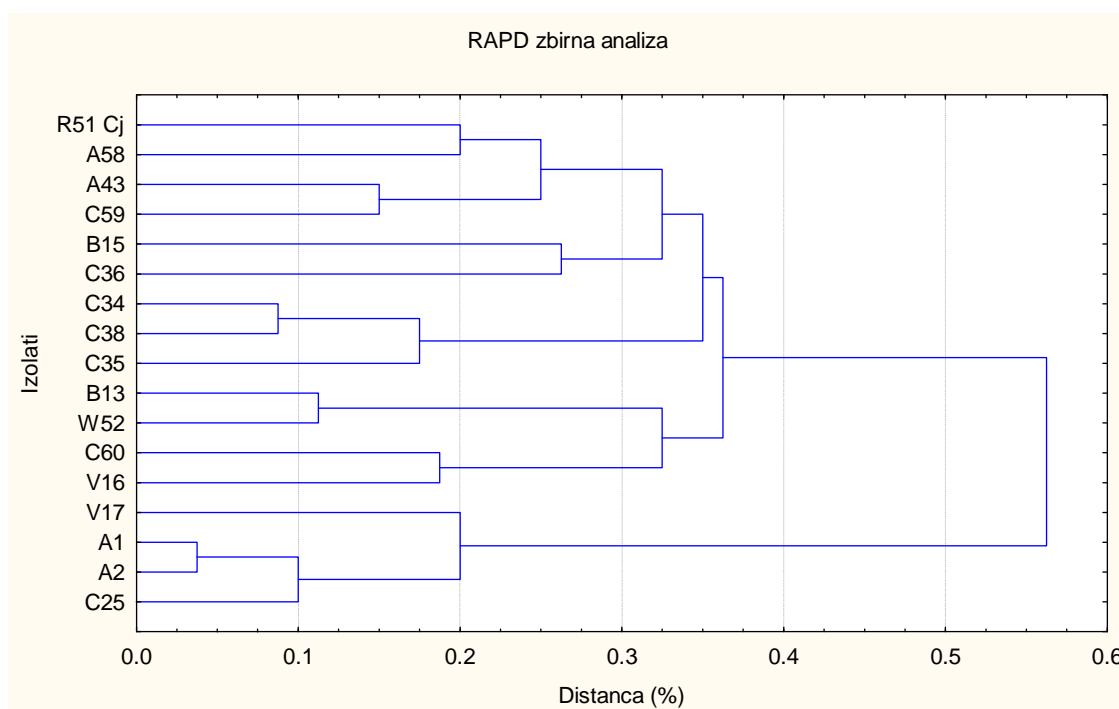
M – GeneRuler Express DNA Ladder SM1551 (Thermo Scientific)

Linije 3 i 23. M; Linije 1-2 i 4-15. *C. jejuni*: R50; R51; A43; A58; B13; B15; W52; C34; C35; C36; C38; C59; C60; V16; Linija 16. A53; Linije 17-22. *C. coli*: P29; V17; A1; A2; C25; C26.



Slika 15: Dendrogram na osnovu razlika izolata *C. jejuni* i *C. coli* dobijenih RAPD analizom DJP17 prajmerom.

Na osnovu zbirne analize RAPD prajmerima dobijen je dendrogram razlika ispitivanih izolata *C. jejuni* i *C. coli*, kao i poređenje sa referentnim sojem *C. jejuni* ATCC 29428. Rezultati su prikazani na slici 16. Svi ispitivani izolati podeljeni su u 2 klastera. Svi izolati *C. coli* grupisani su u klaster 1 koji se od klastera 2 razlikuje 57%. Ovaj klaster je podeljen na 2 subklastera od kojih subklaster 1 sadrži 3 izolata poreklom od živine, a subklaster 2 samo izolat V17 poreklom od ljudi. Izolat V17 je 20% različit od izolata poreklom od živine iz drugog subklastera. Klaster 2 podeljen je na 2 subklastera međusobno različita 37%. Subklaster 1 sadrži 2 grane međusobno različite 33%. U okviru grane 1 nalazi se izolat poreklom od ljudi V16 i izolat poreklom od živine C60 koji se razlikuju 20%. Grana 2 obuhvata 2 izolata *C. jejuni* porekom od živine. Subklaster 2 obuhvata veći broj izolata *C. jejuni* grupisanih u 2 grane koje su međusobno različite 35%. Grana 1 obuhvata izolate C34, C35 i C38 poreklom iz brisa trupa brojlera, a grana 2 obuhvata 5 izolata *C. jejuni* različitog poreka i referentni soj R51.



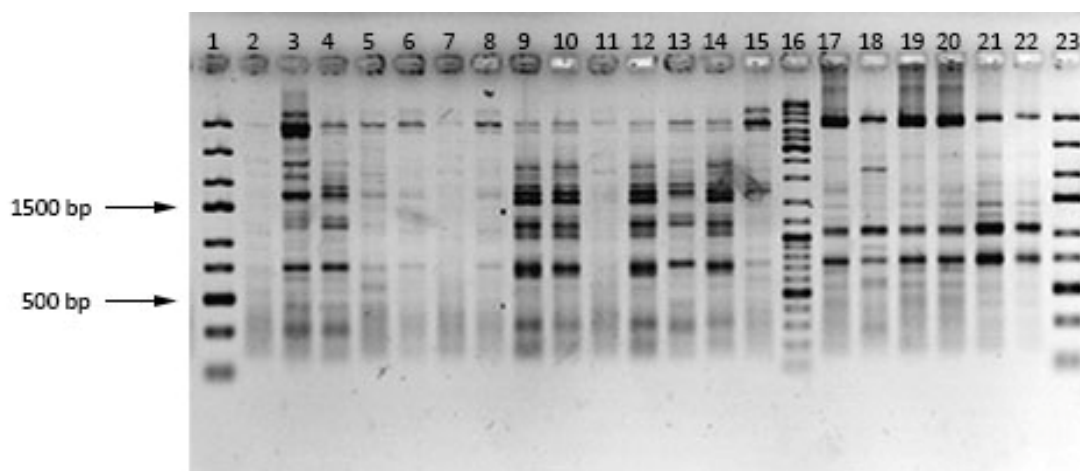
Slika 16: Dendrogram na osnovu razlika izolata *C. jejuni* i *C. coli* dobijenih RAPD analizom

5.3.3 Rezultati rep-PCR

rep-PCR analiza sprovedena je upotrebom prajmera za BOX-PCR (BOXA1R i (GTG)₅), kao i upotrebom prajmera za ERIC-PCR (ERIC 1R i ERIC 2). Prajmeri ERIC i BOXA1R nisu dali amplikone koji bi se mogli porediti. Rezultati amplifikacije sojeva *C. jejuni* sa (GTG)₅ dati su na slikama 17a i 17b. Ovaj prajmer daje određene razlike u okviru vrste, ali one nisu visoko rezolutivne.

Na osnovu analize rezultata (GTG)₅ prajmera izolati *C. jejuni* i *C. coli* se jasno odvajaju u posebne klasterne (slika 18). Udaljenost između ovih klastera je oko 57%. U okviru klastera 1 koji obuhvata izolate *C. coli* uočavaju se 2 subklastera međusobno udaljena 36%. Subklaster 1 obuhvata 4 izolata poreklom od živine, a subklaster 2 samo izolat poreklom od ljudi V17 koji je od subklastera 1 udaljen 28%. Klaster 2 obuhvata *C. jejuni* izolate i sastoji se iz 2 subklastera međusobno udaljena 36%. Subklaster 1 obuhvata 2 grane udaljene međusobom 20%. U grani 1 su grupisani izolati C34, C35, C38 i C60 poreklom iz brisa trupa brojlera, a u grani 2 izolati A43 i C59. Subklaster 2 u posebnoj grani sadrži izolat C36 koji je 24% različit od grane 2 ovog subklastera u kojoj se nalazi 5 izolata različitog porekla i 2 referentna soja. Referentni soj R 51 je najviše različit od ostalih izolata u ovoj grani (razlika 20%).

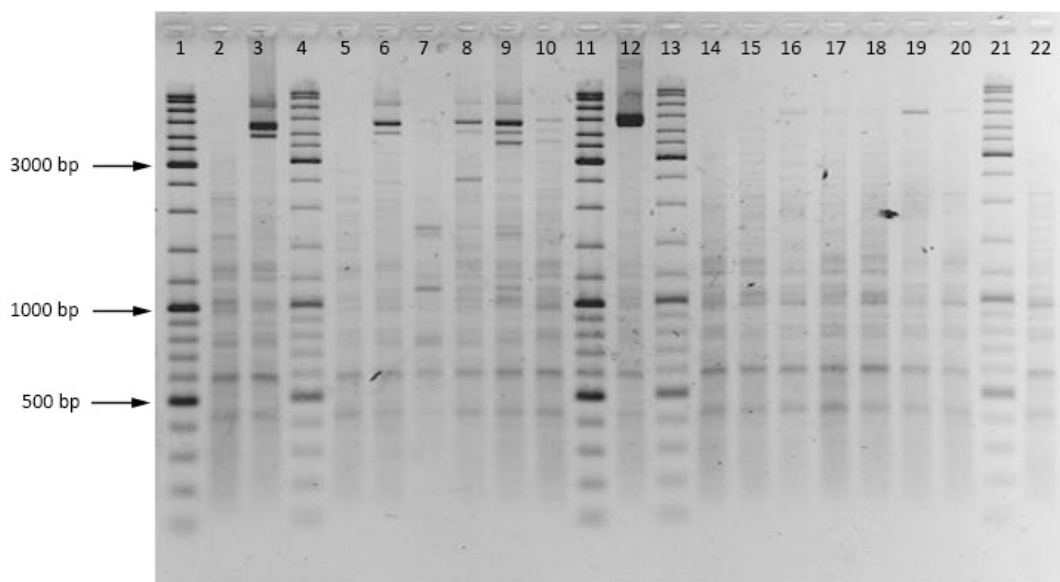
Ostali izolati iz ove grane grupišu se sa referentnim izolatom R50, kome je najbliži izolat poreklom od ljudi V16 (razlika 4%).



Slika 17a: Rep-PCR profili izolata *C. jejuni* i *C. coli* na osnovu BOX elemenata korišćenjem (GTG)₅ prajmera.

M1 – GeneRuler Express DNA Ladder SM1551 (Thermo Scientific); M2 – GeneRuler DNA Ladder Mix SM0331 (Fermentas, Litvanija).

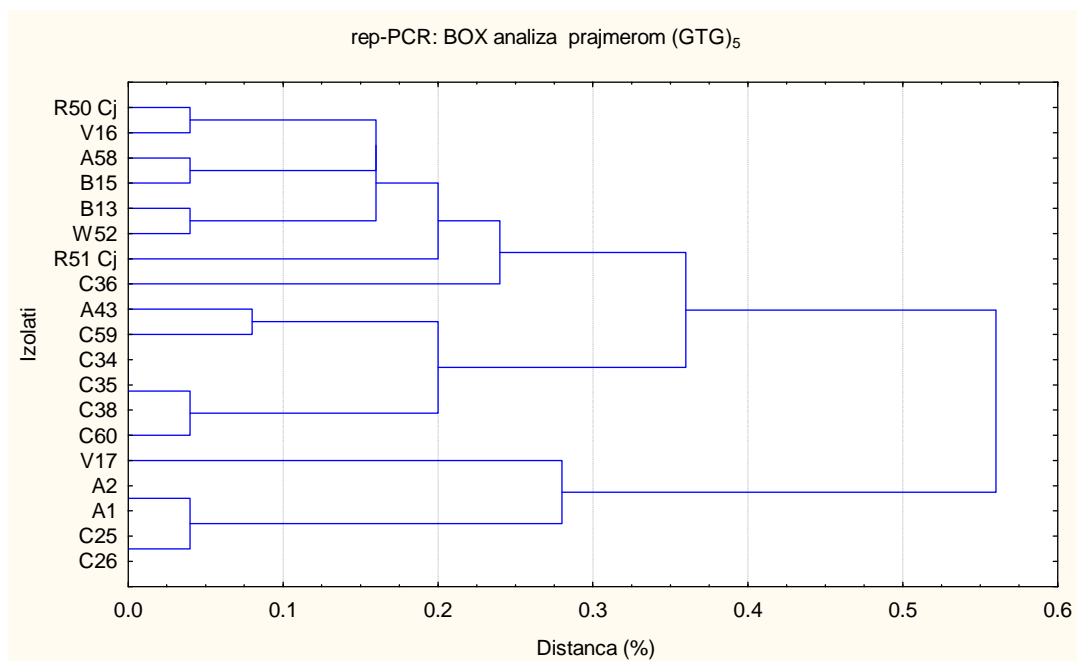
Linije 1 i 23. M1; Linije 2-15. *C. jejuni*: R50; R51; A43; A58; B13; B15; W52; C34; C35; C36; C38; C59; C60; V16; Linija 16. M2; Linija 17. A53; Linije 18-22. *C. coli*: V17; A1; A2; C25; C26.



Slika 17b: Rep-PCR profili izolata *C. jejuni* na osnovu BOX elemenata korišćenjem (GTG)₅ prajmera.

M – GeneRuler DNA Ladder mix SM0331 (Fermentas, Litvanija).

Linije 1, 4, 11, 13 i 21. M; Linije 2-3 i 5-10. R50; R51; A43; W52; B13; A58; C59; C60; Linija 12. A53; Linije 14-20. B15; C34; C35; C36; C38; A43; B15; Linija 22. V16



Slika 18: Dendrogram na osnovu razlika izolata *C. jejuni* i *C. coli* dobijenih rep-PCR analizom

6. DISKUSIJA

Kampilobakterioza je najčešće gastrointestinalno oboljenje bakterijske etiologije u savremenom svetu. U Evropskoj uniji od ovog uzročnika godišnje oboli oko 200 000 ljudi. Prema podacima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (Centers for disease control and prevention), od kampilobakterioze godišnje oboli 14 ljudi na 100 000 stanovnika. Oboljenje izazivaju termotolerantne vrste *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*. Izveštaj EFSA (2010.) za 2008. godinu govori o procentualnoj zastupljenosti uzročnika pri oboljevanju ljudi – *C. jejuni* je dokazan u 39.5% prijavljenih slučajeva, *C. coli* za 2,3%, dok kod čak 49% prijavljenih infekcija nije izvršena identifikacija do nivoa vrste. Nedostatak potpunih epidemioloških podataka otežava povezivanje oboljenja ljudi sa izvorom infekcije ili kontaminacije.

Težište ovog istraživanja stavljeno je na ispitivanje prisustva *Campylobacter* spp. i naročito *Campylobacter jejuni* u jatima brojlera i na trupovima brojlera na klanici i u maloprodaji: Izbor uzoraka za ispitivanje napravljen je na osnovu postulata iznetih u izveštaju EFSA-e o predloženim tehničkim specifikacijama za monitoring na *Campylobacter* vrste (EFSA Journal, 2006.). Razlog za ovakav odabir uzoraka za ispitivanje leži u činjenici da je *Campylobacter* termolabilan, pa se adekvatnim termičkim tretmanom lako uništava. Takođe, uzročnik je osetljiv i na druge spoljašnje činioce (isušivanje, pH i sl.), pa se obradom tokom pripreme proizvoda od pilećeg mesa (sušenje, salamurenje, priprema barenih kobasica) uništava. Opasnost od infekcije zato najviše postoji od sirovog i nedovoljno termički obrađenog pilećeg mesa, iako infekcija može nastati i usled unakrsne kontaminacije određenim proizvodima spremnim za konzumiranje (salate, dresinzi i slično).

Møller-Nielsen i saradnici (1997.) su ispitivali distribuciju serotipova *Campylobacter* vrsta kod pacijenata u Danskoj, kao i kod životinja koje se najviše koriste u ljudskoj ishrani (brojleri, goveda, svinje). Gastroenteritis ljudi uglavnom izaziva *C. jejuni* (94%), dok je *C. coli* odgovoran za svega 6% slučajeva. Distribucija *Campylobacter* spp. kod različitih vrsta životinja je različita: kod brojlera i goveda *C. jejuni* čini 83–91%, dok je kod svinja 95% izolata *C. coli*. Njihovi rezultati upućuju na to da se serotipovi *C. jejuni* izolovani od ljudi, brojlera i goveda u visokom procentu preklapaju, te se ove životinje mogu smatrati rezervoarima uzročnika za ljude.

Slične rezultate dobili su i Sheppard i saradnici (2009.) koji su ispitivali moguće izvore infekcije kod ljudi u Škotskoj. Oni su primenili MLST pristup i tipizirali preko 5600 kliničkih izolata poreklom od ljudi i 3400 izolata različitog porekla. Njihovi rezultati ukazuju da je u oko 90.4% slučajeva kamilobakterioze ljudi uzročnik *C. jejuni*, a u 9.6% *C. coli*. Ispitano je 999 izolata poreklom od životinja koje se koriste u ishrani ljudi. Na osnovu dobijenih rezultata razvijen je model za povezivanje izolata poreklom od ljudi sa potencijalnim izvorom infekcije. Zaključeno je da za *C. jejuni* 58% izolata može da se poveže sa pilećim mesom, 38% sa preživarima, a svega 4% sa divljim pticama i okolinom. Što se tiče *C. coli* 40% izolata je povezano sa pilećim mesom, 40% sa ovcama, 14 % sa govedima, 6% sa svinjama i manje od 1% sa ćurkama.

Kramer i saradnici (2000.) ispitivali su prisustvo *Campylobacter* vrsta u jetrama živine, jagnjadi, goveda i svinja u maloprodaji i upoređivali dobijene izolate sa izolatima poreklom od ljudi iz istog područja u istom vremenskom periodu. Kod ljudi je oko 89.3% izolata identifikovano kao *C. jejuni*, a 10.7% kao *C. coli*. Njihovi rezultati sugerišu da su izolati poreklom od živine i jagnjadi u velikom procentu slični izolatima poreklom od ljudi, pa se može zaključiti da ova hrana ima značajnu ulogu i infekciji ljudi.

U ovom istraživanju ispitan je mali broj izolata poreklom od ljudi, ukupno 5 poreklom iz različitih epidemioloških područja. Od ovih izolata samo jedan je i pri biohemijskom testiranju i pri m-PCR analizi identifikovan kao *C. jejuni*, dok su ostala 4 identifikovani kao *C. coli*. Ovakav nalaz je zanimljiv sa stanovišta upoređivanja odnosa vrsta *Campylobacter* koji izazivaju infekciju kod ljudi u Republici Srbiji sa podacima iz drugih zemalja. Podaci iz Evropske unije sugerišu da je *C. jejuni* mnogo češće uzrok oboljenja ljudi (EFSA, 2011., 2013., Kramer *et al.*, 2000.). S obzirom da je u ovom radu ispitan veoma mali broj izolata poreklom od ljudi, bilo bi zanimljivo u nekom budućem istraživanju detaljno obraditi odnos termotolerantnih vrsta *Campylobacter*-a u infekcijama ljudi.

Jedan od zadataka postavljenih u ovom radu bio je i poređenje dobijenih izolata poreklom od živine sa izolatima poreklom od ljudi. Karakterizacija izolata pomoću RAPD i rep-PCR metode omogućila je formiranje klastera u kojima se nalaze blisko srodni izolati. Prema zbirnom RAPD dendrogramu izolat *C. jejuni* poreklom od ljudi bio je u istom klasteru kao i izolat poreklom iz brisa trupa brojlera (udaljenost izolata oko 18%). U rep-PCR analizi ovaj izolat bio je najbliži referentnom soju *C. jejuni* R50 (ATCC 33291). Izolat poreklom od ljudi potvrđen kao *C. coli* bio je prema

RAPD analizi 20% različit od izolata poreklom od živine, dok je prema rep-PCR metodi razlika bila oko 30%.

Ovo istraživanje bilo je fokusirano na meso brojlera kao potencijalni izvor infekcije za ljude. U više ranijih istraživanja potvrđena je veza između pilećeg mesa i oboljenja ljudi (Møller-Nielsen *et al*, 1997., Sheppard *et al.*, 2009.). S obzirom na savremena saznanja o ekologiji uzročnika, a u vezi sa pilećim mesom, može se zaključiti da je za ljude najznačajniji izvor infekcije sveže pileće meso, sirovo ili nedovoljno termički obrađeno, koje može biti i izvor unakrsne kontaminacije za druge namirnice ukoliko se u toku pripreme hrane njima ne rukuje na odgovarajući način. Da bi se procenio rizik od infekcije ljudi, neophodno je da se odredi nivo kontaminacije trupova na klanici i u maloprodaji. Način formiranja uzorka za monitoring nivoa kontaminacije trupova brojlera *Campylobacter* vrstama na klanici određen je na osnovu parametara koji su navedeni u izveštaju EFSA (2006.).

U ovom istraživanju uzorkovanje u maloprodaji nije vršeno zbog ograničenih materijalnih sredstava i ograničenog vremena. Međutim, ovaj deo lanca svežeg pilećeg mesa takođe je potrebno obraditi u cilju poređenja nivoa kontaminacije i eventualne redukcije kontaminacije trupova posle primene nekih metoda dekontaminacije.

Od ukupno pregledanih 233 uzoraka (190 sa klanice i 43 sa farmi) pozitivno je bilo 48 (43 sa klanice i 5 sa farme) uzoraka. Procenat pozitivnih uzorak na klanici bio je 22.6%, a na farmi 11.6%. Najviše pozitivnih uzoraka bilo je u uzorcima brisa i ispirka trupova (33.3% i 31.6% redom), zatim u uzorcima kože sa dorzalnog dela vrata (6.7%), dok iz jetri i cekuma uzetih na liniji klanja *Campylobacter* vrste nisu izolovane. Od uzoraka sa farme *Campylobacter* je izolovan samo iz uzoraka cekuma. Ispitivanja dokumentovana u ovom radu trajala su 18 meseci, a broj pregledanih uzoraka po mesecima bio je relativno ravnomerno raspoređen. Najviše uzoraka pregledano je tokom perioda februar-mart, jun-jul i oktobar-novembar. Najveći procenat pozitivnih uzoraka zabeležen je u martu (36.7%), junu (42.5%) i oktobru (30%). Zanimljiv je rezultat dobijen u julu, pozitivno je bilo svega 6.7% ispitivanih uzoraka. Razlog za ovakav nalaz treba tražiti u vrsti pregledanih uzoraka – u julu su ispitivane samo kožice sa dorzalne strane vrata koje su i u ranijim mesecima davale mali procenat pozitivnih uzoraka. Tokom marta, juna i oktobra većina ispitivanih uzoraka bili su brisevi ili ispirci trupova. Iz ovoga se može zaključiti da se *Campylobacter* spp.

uglavnom nalazi na koži trupova brojlera. Iz ovih rezultata se može zaključiti da se procenat kolonizacije brojlera i posledično, procenat kontaminiranih trupova na klanicama, povećava sa početkom proleća (već od marta), vrhunac dostiže u letnjim mesecima i opada posle oktobra. U zimskom periodu, procenat pozitivnih trupova znatno je niži.

Tokom eksperimentalnog rada na klanici i terenu prikupljeno je 48 izolata potvrđenih kao rod *Campylobacter*. Od toga je biohemijskom karakterizacijom na osnovu detekcije enzima koji razlaže hipurat 21 izolat okarakterisan kao *C. jejuni*, a 26 kao *C. coli*. Jedan izolat je identifikovan kao *C. lari*. Odnos *C. jejuni* / *C. coli* bio je 44.7% / 55.3%.

Daskalov i Maramski (2012.) iznose podatke o prisustvu *Campylobacter* spp. na klanicama u Bugarskoj. Procenat kontaminiranih trupova iznosi 44.9% što je gotovo duplo više od rezultata dobijenih u ovom istraživanju (22.6%). Odnos *C. jejuni* / *C. coli* bio je 37.4% / 61.8% uz nekoliko izolata *C. lari*. Period ispitivanja trajao je 11 meseci, odnosno gotovo jedna kalendarska godina, a broj uzoraka bio je približno isti po godišnjim dobima. Istraživači su uočili sezonalnost pojave uzročnika, sa vrhuncem u periodu jun-jul.

Ertaş i saradnici (2004.) ispitivali su prevalencu *C. jejuni* i *C. coli* kod brojlera u Istočnoj Turskoj koristeći metode za izolaciju (mikrobiološka izolacija i PCR) i tipizaciju (RAPD uz korišćenje OPA-11 prajmera i *flaA*-RFLP metoda). Ispitivali su uzorke jetre i creva sa klanice živine. Procenat pozitivnih uzoraka bio je 25% od čega je 56% identifikovano kao *C. jejuni*, a 44% kao *C. coli*. *flaA*-RFLP metoda dala je sedam različitih profila među ovim izolatima, a RAPD pet različitih profila. Diskriminatorsna moć RAPD metode bila je niža nego *flaA*-RFLP metode. Ovi rezultati ukazuju na nisku heterogenost među izolatima u ovom geografskom području.

U ovom istraživanju procenat pozitivnih uzoraka bio je 22.6% što je slično nalazima Ertaş i saradnika. Za razliku od turskih izolata, među izolatima iz Republike Srbije preovladavaju izolati *C. coli*, što otvara nova pitanja o prisustvu *C. coli* kod živine u intenzivnom uzgoju i njegovom značaju kao uzročniku oboljenja ljudi.

Da bi se postigao zadovoljavajući odnos diskriminativnosti, brzine i ekonomičnosti metoda pogodnih za rutinsku primenu, u ovim istraživanjima je korišćena kombinacija multipleks – PCR i RAPD metoda. Analizirana je diskriminativnost i reproducibilnost profila primenom većeg broja prajmera i odabrani

ili dizajnirani novi prajmeri koji do sada nisu bili primenjivani na *Campylobacter* vrstama. Ovi rezultati su upoređeni sa rezultatima BOX-PCR. Za razlikovanje vrsta u okviru roda *Campylobacter* uglavnom se koristi m-PCR. Rezultati amplifikacije sa nekim prajmerima, kao što su BC318 i OPA8 se mogu primenjivati u tu svrhu zajedno sa m-PCR ili u nedostatku mogućnosti da se m-PCR izvede kao preliminarna analiza posle biohemijskih ispitivanja.

Tokom ovog istraživanja korišćena su dva referentna soja: *C. jejuni* ATCC 29428 (R51) poreklom iz fecesa deteta i *C. jejuni* ATCC 33291 (R50) poreklom iz fecesa odraslog muškarca, izolovan u Koloradu, SAD. S obzirom da su oba soja poreklom od ljudi, njihovo upoređivanje sa izolatima poreklom od živine može poslužiti u epidemiološke svrhe, za povezivanje epidemija ljudi sa mesom živine kao izvorom infekcije.

U molekularnim ispitivanjima izolata korišćeno je više različitih prajmera. Prema dobijenim rezultatima oni se mogu podeliti u četiri grupe:

1. neinformativni unutar vrste, ali daju razlike među *Campylobacter* vrstama: multiplex-PCR (mapA/ceuE); RAPD (OPA8, BC318)
2. umereno informativni unutar vrste: RAPD (SPH1, AG15); rep-PCR ((GTG)₅);
3. informativni unutar vrste: RAPD (AP10, AK16, DJP17)
4. nema dobre amplifikacije, mali broj fragmenata za razmatranje ili nedovoljno jasni profili: rep-PCR (REP, ERIC, BOXA1R), RAPD (OPA10, AF14, AX16)

Od ukupnog broja izolata m-PCR metodom je ispitano 37 izolata. Zbog nedostatka vremena i materijalnih sredstava nisu postojale mogućnosti da se na ovaj način ispituju svi izolati. Izbor izolata za ispitivanje izvršen je prema više kriterijuma:

- datum izolovanja – podjednaka zastupljenost svih godišnjih doba
- poreklo izolata – izabrani su izolati dobijeni iz različitih uzoraka (sa klanice, sa farme, porekla od ljudi)
- lokacija izolovanja – izabrani su uzorci sa različitih ispitivanih lokacija

Primena m-PCR metode u ovom istraživanju izvršena je iz dva razloga:

1. potvrda identifikacije izolata kao *Campylobacter* spp.

2. potvrda identifikacije uzročnika do nivoa vrste kad je ona sprovedena putem biohemijskih testova, odnosno identifikacija do nivoa vrste u slučajevima kad biohemijsko testiranje nije sprovedeno

Poređenjem rezultata dobijenih detekcijom enzima koji razlaže hipurat i analizom m-PCR odabranog seta izolata dobijeni su delimično različiti rezultati. Izolati C32 do C38 su bili negativni na prisustvo enzima koji razlaže hipurat, ali su u m-PCR analizi identifikovani kao *C. jejuni*. Izolat A2 je biohemijski identifikovan kao *C. jejuni*, dok je u m-PCR-u potvrđen kao *C. coli*. Ovakvi nalazi mogu se uporediti sa radom Al Amri i saradnika (2007.). Ova grupa naučnika takođe je dobila lažno negativne rezultate, tj. iako su bili negativni na prisustvo enzima koji razlaže hipurat, izolati su ipak pripadali vrsti *C. jejuni*. Takođe, identifikovali su i lažno pozitivne rezultate, pa su izolati koji su razlagali hipurat bili u m-PCR-u identifikovani kao *C. coli*. Zaključak ove grupe naučnika na osnovu eksperimentalnog rada i literaturnih podataka (Linton *et al.*, 1997., Sinha *et al.*, 2004.) bio je da je verovatno da *C. coli* poseduje gen za enzim čiji supstat je sličan hipuratu, pa u određenim uslovima deluje i na hipurat što dovodi do lažno pozitivnih rezultata. Lažno negativni rezultati nastaju u slučajevima kad gen za proizvodnju enzima koji razlaže hipurat nije aktivan.

Izolat A46 je pozitivan na prisustvo enzima koji razlaže hipurat, što ga klasifikuje kao *C. jejuni*, ali nije dao amplifikaciju tokom m-PCR-a. Verovatan razlog za to je što je porast ovog soja posle odmrzavanja bio veoma slab, pa je količina izolovane DNA verovatno bila nedovoljna za amplifikaciju, a sama DNA bila degradirana. Izolat B6 nije dao amplifikaciju ni sa jednim prajmerom, što je još jedna potvrda da se ne radi o *C. jejuni* niti *C. coli*, kao što je zaključeno posle biohemijskih ispitivanja (izolat identifikovan kao *C. lari*).

Izolat A53 dao je amplifikaciju sa oba prajmera, pri čemu je traka dobijena sa prajmerima karakterističnim za *C. coli* mnogo izraženija od trake karakteristične za *C. jejuni*. Daljim ispitivanjima upotrebom RAPD i rep-PCR prajmera dobijeni su šaroliki rezultati – izolat se povremeno ponašao kao *C. coli* (prajmeri SPH1, AP10, (GTG)₅), a povremeno kao *C. jejuni* (prajmeri AG15, OPA8). Iz ovih rezultata može se zaključiti da se radi o mešanoj kulturi koja sadrži oba uzročnika, odnosno da se radi o mešanoj infekciji brojlera.

Russel i saradnici (1990.) radili su ispitivanje prisustva *Campylobacter* vrsta kod makaki majmuna u uzgajalištu u kome su vladali endemski uslovi za ovog uzročnika. Ustanovili su da su jedinke tokom dužeg vremenskog perioda bile

kolonizovane različitim sojevima *C. jejuni* i *C. coli*, pri čemu je kolonizacija jednim sojem trajala oko 3 do 4 nedelje. Njihovi nalazi navode na zaključak da je kontinualna infekcija u endemskim područjima ustvari posledica višestruke reinfekcije jedinke različitim sojevima uzročnika. Ovakav nalaz može sugerisati i povremeno postojanje mešane infekcije pri čemu su u datom trenutku u organizmu jedinke prisutna dva različita soja uzročnika. S obzirom na nalaz tokom ovog istraživanja u vezi sa uzorkom A53 otvara se pitanje sličnog procesa kod brojlera što može biti tema daljeg rada u ovoj oblasti.

Boes i saradnici (2005.) ispitivali su prisustvo *Campylobacter* vrsta kod svinja koje se gaje na farmama različitih tipova: čisto svinjarske farme, mešovite farme sa živinom i mešovite farme sa govedima. Odnos izolovanih *Campylobacter* vrsta varirao je u zavisnosti od životinjske vrste, pa se tako kod svinja *C. jejuni* javlja u niskom procentu (1.3 – 2.5%), a *C. coli* u visokom (preko 90%), dok kod živine i goveda dominira *C. jejuni* (47.2% svih ispitanih uzoraka kod goveda, odnosno 37.1% kod živine bilo je pozitivno na *C. jejuni*). Kod svinja je zapaženo i da se kod jedinki kod kojih je izolovan *C. jejuni* veoma često izoluje i *C. coli*, odnosno mešana infekcija *Campylobacter* vrstama je uobičajena. Ispitivanje izolata PFGE metodom nije dalo nedvosmislene rezultate što se tiče mogućnosti prenošenja *C. jejuni* sa jedne životinjske vrste na drugu. Nasuprot tome, izolati *C. coli* poreklom od svinja i goveda bili su međusobno identični.

Al Amri i saradnici (2007.) takođe su dobili dokaze o postojanju mešane infekcije pri ispitivanju fecesa živine i stolice ljudi. Od 114 ispitivanih uzoraka, kod 9 je utvrđena mešana infekcija. Od ovih 9 uzorka većina je bila poreklom od živine (77.8%, odnosno 7 uzoraka od 9). Kultivisanjem ovih uzoraka klasičnom mikrobiološkom metodom u svih 9 slučajeva je dobijen rast *C. jejuni*. Mogućnost detekcije ovakve mešane infekcija značajna je sa stanovišta izbora terapije pri lečenju živine zbog visokog procenta rezistencije *C. coli* na eritomicin koji je najčešće lek izbora pri lečenju infekcije sa *C. jejuni*.

Zanimljiv je nalaz u klanici A pri uzorkovanju u mesecu oktobru 2012. godine. Od 7 briseva sa trupova brojlera, 6 je bilo identifikovano kao *Campylobacter* spp., od čega je 5 potvrđeno kao *C. coli*, a jedan kao *C. jejuni*. Ovakav nalaz govori u prilog već iznetim podacima o mešanoj infekciji kod jedinki, kao i o prisustvu dve ili čak više vrsta *Campylobacter*-a u jatuu.

Za RAPD analizu u ovom istraživanju izabrano je 9 prajmera. Neki od tih prajmera (OPA8 i OPA10) ranije su korišćeni za analizu *Campylobacter* spp., naročito *C. jejuni* i *C. coli*. Grupe naučnika koje su ih koristile prijavile su dobru diskriminatornu moć ovih prajmera (Tan *et al.*, 2009.) i preporučili ih kao alatku za tipizaciju. Ostali prajmeri koje su odabrani u ovom radu (AP10, SPH1, AF14, BC318, AX16, AG15, AK16) do sada nisu primenjivani za tipizaciju bakterija iz roda *Campylobacter*. Oni su korišćeni za tipizaciju bakterija iz zemljišta (de Brujin, 1992., Dooley *et al.*, 1993., Selenska-Pobell *et al.*, 1996.) i za analizu biljnih genoma (Mliki *et al.*, 2001.). S obzirom da je osnovni princip RAPD metode proizvoljan izbor prajmera, za ovo istraživanje su odabrani prajmeri koji su na drugom supstratu već dali informativne rezultate.

RAPD analiza je široko primenjivana u ispitivanju roda *Campylobacter* i dala je reproducibilne i diskriminativne rezultate pri korišćenju nekih od prajmera. Mnoge grupe naučnika su primenjivale RAPD za tipizaciju *Campylobacter* izolata.

Trajkowska *et al.* (2011.) ispitivali su 26 sojeva *Campylobacter jejuni* primenom Penner-ove serotipizacije i RAPD analizom. Od 26 sojeva, 21 soj je bio tipiziran primenom Penner-ove šeme (dobijene su 3 serogrupe), dok 5 izolata nije bilo moguće tipizirati. Upotrebom RAPD metode tipizirani su svi izolati. Dobijena su 4 genetička profila. Svaka od Penner-ovih serogrupa obuhvatala je različite profile identifikovane RAPD metodom.

Açık i Çetinkaya (2006.) ispitivali su prisustvo *C. jejuni* i *C. coli* kod naizgled zdravih goveda i ovaca iz različitih geografskih lokacija. Ukupno je prikupljeno 348 izolata od čega 218 *C. jejuni* i 130 *C. coli*. Svi izolati su profilisani upotrebom RAPD metode uz korišćenje OPA11 prajmera. Kod goveda ustanovljeno je 37 profila među izolatima *C. jejuni* i svega 5 profila među izolatima *C. coli*, dok je kod ovaca broj različitih profila *C. jejuni* bio 21, a *C. coli* 24.

Leonard i saradnici (2003.) su u svom ispitivanju koristili prajmer 1283. Ispitivali su izolate poreklom od ljudi RAPD metodom i metodom DNA microarray-a. Ovaj prajmer je omogućio odvajanje izolata po logičnim klasterima, odnosno u istom klasteru su se našli izolati od različitih pacijenata iz iste epidemije.

Carvalho i saradnici (2001.) su primenjivali RAPD analizu za karakterizaciju invazivnih i neinvazivnih sojeva *Campylobacter* spp, uglavnom *C. jejuni*. Ispitano je 119 sojeva *C. jejuni* koji su testirani na sposobnost adherencije i invazije u Hep-2 ćelijama. Na osnovu ovih rezultata sojevi su podeljeni u invazivne i

neinvazivne, pri čemu se neinvazivnim smatraju oni koji imaju sposobnost adherencije nižu od 20%. Izolati su zatim ispitivani primenom 7 proizvoljno dizajniranih RAPD prajmera od kojih su 4 generisali profile koji mogu poslužiti za razlikovanje izolovanih sojeva. Prajmer 1290 omogućavao je tipizaciju svih ispitivanih izolata i davao je najveći broj traka u profilu, veličina trake bila je od 0.2 do 3 kbp. Traka veličine 1.6 kbp bila je prisutna većinom kod invazivnih sojeva uz nekoliko izuzetaka među neinvazivnim. Ovaj fragment nazvan je marker povezan sa invazivnošću (invasion-associated marker – IAM). Prajmer dizajniran da amplifikuje deo ovog IAM lokusa omogućava njegovu PCR amplifikaciju i kod drugih izolovanih sojeva, pa se može koristiti za diferencijaciju da li je izolat odgovoran za neku epidemiju ili oboljenje invazivan ili ne.

Hilton i saradnici (1997.) su ispitivali izolate *Campylobacter* spp. iz okoline, poreklom od živine, poreklom od ljudi i referentne sojeve primenom RAPD metode upotrebom prajmera 1254. Svi ispitivani izolati dali su čitljive jedinstvene profile. Na izrađenom dendrogramu uočavaju se klasteri koji sadrže samo izolate poreklom od živine, ali i mešani klasteri gde su grupisani izolati živinskog porekla zajedno sa izolatima poreklom od ljudi ili izolati poreklom od ljudi i izolati iz okoline. Referentni sojevi bili su grupisani u više klastera.

Fayos i saradnici (1993.) ispitivali su 28 izolata *C. jejuni* RAPD analizom sa OPA11 prajmerom. Dobijeni rezultati omogućili su razlikovanje izolata *C. jejuni* koji su pripadali istim sergrupama po Penner-ovoj serotipizaciji. U istom istraživanju sprovedena je i ribotipizacija izolata. Profili dobijeni RAPD analizom i ribotipizacijom bili su veoma slični.

U ovom istraživanju dobijeni su rezultati različite diskriminativnosti u odnosu na primenjeni prajmer.

Prajmer BC318 grupiše sve izolate *C. jejuni* u jedan klaster, jer svi izolati daju samo jednu traku veličine oko 300 bp, tako da nije informativan na nivou vrste. Izolati *C. coli* međusobno su različiti i grupisani u oba klastera. Neki od *C. coli* izolata su sličniji izolatima *C. jejuni* nego drugim izolatima *C. coli* (P30 i V17). Izolati P29, A1 i A2 su grupisani u klaster koji se najviše razlikuje od ostalih *C. coli* izolata, udaljenost iznosi oko 63%.

Prajmer OPA8 nije rezolutivan, omogućava detekciju razlika na nivou roda, odnosno razlikuje *C. jejuni* od *C. coli*, ali je neinformativan u okviru vrste. Među izolatima *C. jejuni* mogu se uočiti određene razlike, npr. izolati C36, C38 i C59 daju

traku veličine oko 500 bp koja ne postoji kod drugih izolata, a humani izolat V16 daje traku veličine oko 400 bp koja je jedinstvena za njega. Ove razlike nisu dovoljne za diskriminaciju izolata. Među *C. coli* izolatima nisu zapažene razlike. Ovaj prajmer može da se primenjuje u cilju identifikacije da li se radi o *C. jejuni* ili *C. coli* vrsti u nedostatku mogućnosti izvođenja m-PCR-a.

Prajmer OPA10 nije rezultirao ampifikacijom ispitivanih izolata, bez obzira da li se radi o vrsti *C. jejuni* ili *C. coli* (rezultati nisu prikazani).

Istraživanja Tana i saradnika (2009.) rezultiralo je suprotnim rezultatima u odnosu na ovde opisano istraživanje. Oni su ispitivali prisustvo *Campylobacter* vrsta i njihovu rezistenciju na antibiotike u sušiju uzorkovanom u supermarketima. Uzorci su tipizirani RAPD analizom, pri čemu su korišćena četiri prajmera: OPA, OPA8, OPA10 i OPA11. Tipizirano je 50 izolata, pri čemu je bilo moguće tipizirati sve izolate sa sva četiri prajmera. Dendrogram koji je konstruisan na osnovu ovih rezultata pokazao je da se izolati grupišu u 4 velike grupe sa sličnošću od 60%. Rezultati dobijeni u ovom radu, odnosno nedostatak amplifikacije prajmerom OPA10 i mali broj amplikona dobijen prajmerom OPA8, mogu se objasniti izvesnim razlikama u genomu kod autohtonih izolata koje dovode do nemogućnosti vezivanja određenih prajmera koji su dali dobre rezultate kod izolata sa drugih geografskih prostora, što je već potvrđeno kod drugih bakterijskih vrsta.

SPH1 prajmer daje umereno informativne rezultate. Na gelu se među izolatima *C. jejuni* razlikuju 4 profila, a među izolatima *C. coli* samo jedan profil. Referentni izolati i svi ispitivani izolati *C. jejuni*, osim izolata C60 poreklom iz brisa trupa brojlara i V16 poreklom iz humanog fecesa, grupisani su u okviru jednog klastera sa 2 subklastera koji se međusobno razlikuju oko 42%. Izolati C60 i V16 grupisani su u grani 2 subklastera 1 sa izolatima *C. coli* koji su grupisani u grani 1 od kojih se razlikuju 33%. U odnosu na ostale izolate i referentne sojeve *C. jejuni* razlikuju se 58%. Izolati *C. jejuni* koji se nalaze u klasteru 2 podeljeni su u 2 subklastera. Subklaster 1 obuhvata izolate C34, C35, C36, C38 i B16 koji su slični referentnom soju R51 (ATCC 29428). Izolati C34, C35, C36 i C38 potiču iz brisa trupa brojlara i uzorkovani su istovremeno na jednoj klanici. Oni su međusobno slični, ali ipak postoje neke razlike. Subklaster 2 obuhvata izolate A43, A58, B13, W52 i C59 bliske referentnom soju R50 (ATCC 33291). Ovi izolati su različitog porekla, uzorkovani tokom dužeg vremenskog perioda, u različitim klanicama. Iz ovih rezultata se može zaključiti da su izolati *C.*

jejuni prisutni na terenu međusobno različiti, a da je za područje Republike Srbije karakteristično prisustvo izolata koji su slični referentnom soju R50.

Dendrogram na osnovu analize prajmerom AK16 satoji se iz 2 klastera. Klaster 1 obuhvata 4 izolata *C. jejuni* (A43, C59, B15 i C36) i referentni soj R51 i razlikuje se od klastera 2 66%. Izolati B15 i C36 čine poseban subklaster koji se od subklastera 2 u ovom klasteru razlikuje 53%. U odnosu na rezultat analize prajmera SPH1 koji grupiše izolate C34 do C38 zajedno, AK16 ih razdvaja i povezuje sa izolatim drugog porekla. U klasteru 2 se razlikuju 2 subklastera međusobno različita 47%. U subklasteru 1 nalaze se izolati C34, C35, C38, C60 i V16. Izolat poreklom od ljudi V16 najbliži je izolatu C60 poreklom iz brisa trupa bojlera (razlika 12%). Subklaster 2 obuhvata 2 grane od kojih grana 1 obuhvata izolate *C. jejuni* W52 i A58, a grana 2 u jednoj subgrani grupiše izolate *C. coli* A1, A2, C25 i C26, a u drugoj subgrani referentni soj R50, *C. coli* izolat poreklom od ljudi V17 i *C. jejuni* izolat poreklom od živine B13. Ovakvo grupisanje izolata različite vrste i različitog porekla nije postignuto ni jednim od ostalih korišćenih prajmera.

Izolati *C. coli* ovim prajmerom međusobno daju manje razlike, mada je uočljivo da je izolat V17 poreklom iz fecesa čoveka značajno različit od ostalih izolata. Izolat V17 blisko je srodan referentnom soju *C. jejuni* R50 (ATCC 33291), njihova udaljenost je oko 12%. Ostali *C. coli* izolati se grupišu zajedno. S obzirom da su razlike među *C. coli* izolatima poreklom od živine dobijene ovim prajmerom gotovo zanemarljive, a da je izolat poreklom od ljudi V17 od njih različit 26%, moguće je da izvor infekcije ljudi u konkretnom primeru nije bilo živinsko meso.

Prajmer AG15 je delimično informativan. Svi izolati su podeljeni u 2 klastera. Omogućava razdvajanje vrsta jer su svi *C. coli* izolati grupisani u klaster 1. Značajan je zato što je ovaj klaster udaljen od klastera *C. jejuni* oko 75% što je najveća udaljenost dobijena u ovom istraživanju. Klaster 2 se deli na 2 subklastera međusobno udaljena 50%. Subklaster 1 sadrži samo izolat B13 poreklom iz ispirka trupa rojlera. Subklaster 2 ima 2 grane od kojih grana 1 obuhvata samo jedan izolat i to poreklom od ljudi V16 koji se od grane 2 razlikuje 25%. Grana 2 sadrži 10 izolata *C. jejuni* i dva referentna soja R50 i R51. Izolati *C. jejuni* u ovoj grani su različitog porekla (izolati C34, C35, C59, A43, A58, W52). Takođe, svi izolati istog porekla su grupisani u isti klaster (C34, C35, C36, C38) što je različito u odnosu na rezultate analize sa nekim drugim prajmerima gde se izolati istog porekla grupišu u različite klastere (npr. kod prajmera OPA8, AK16). Ovi rezultati sugerišu blisku povezanost svih *C. jejuni* izolata

sakupljenih tokom dužeg vremenskog perioda iz više klanica na jednom epizootiološkom/epidemiološkom području i njihovu značajnu udaljenost od izolata poreklom od ljudi. Izolat porekom od ljudi ne potiče sa istog epidemiološkog područja, tako da se ne može isključiti njegova veza sa izolatima poreklom od živine sa epidemiološkog područja na kome je izolovan. Ovo bi moglo biti polazište daljeg rada u okviru potencijalnog planskog monitoringa na *Campylobacter* vrste.

Prajmer AP10 jedan je od prajmera koji su visoko diskriminativni. Na gelu se uočava 11 profila *C. jejuni* i 6 profila *C. coli*. Svaki izolat *C. jejuni* daje jedinstven profil. Jedino izolat C59 daje profil identičan referentnom soju R51 ATCC 29428. Ovo je razlika u odnosu na rezultat dobijen prajmerom SPH1 gde je izolat C59 bliži referentnom soju R50 (razlika 34%), dok je od referentnog soja R51 udaljen 42%.

Na dendrogramu se uočavaju jasno odvojeni klasteri *C. jejuni* i *C. coli*. Međusobna udaljenost ovih klastera je oko 63%. Klaster *C. coli* izolata je podeljen na 2 subklastera. Subklaster 1 obuhvata samo izolat P30 poreklom iz uzorka cekuma uzorkovanog na farmi živine i razlikuje se od subklastera 2 oko 18%. Subklaster 2 sadrži 6 izolata *C. coli* različitog porekla: poreklom od ljudi, iz cekuma, iz brisa trupa. Uzorci P29 i P30 su izolovani prilikom istog uzorkovanja na farmi živine, ali su pri tipizaciji ovim prajmerom svrstani u posebne subklasterne. Ovakav rezultat potvrđuje sposobnost diskriminacije prajmera AP10.

U okviru klastera *C. jejuni* uočavaju se 2 subklastera na nivou od 55% različitosti. Subklaster 1 obuhvata izolate C36 i C38 poreklom iz brisa trupa brojlera. Drugi subklaster klastera 2 ima dve grane od kojih grana 1 sadrži 4 izolata od kojih je jedan referentni soj R51, a ostali su poreklom iz brisa trupa brojlera i kože sa dorzalnog dela vrata. Grana 2 sadrži 7 izolata različitog porekla: izolat poreklom od ljudi, bris trupa brojlera, ispirak trupa brojlera. Grane se međusobno razlikuju 50%.

I u klasteru *C. jejuni* primećuje se sposobnost prajmera da izolate istog porekla grupiše u različite subklasterne. Primer su izolati C34, C35, C36 i C38 koji su izolovani sa iste klanice u istom uzorkovanju, a pripadaju različitim subklasterima: C36 i C38 čine subklaster 1, a C34 i C35 pripadaju jednoj od grana subklastera 2. Međusobna udaljenost ovih izolata iznosi 55 % što je značajan nivo različitosti s obzirom na zajedničko poreklo. Objašnjenje ovog rezultata moguće je tražiti u činjenici da su izolati C36 i C38 hipurat negativni, pa su tokom izolacije kulturelnom metodom klasifikovani kao *C. coli*. m-PCR je, međutim, potvrdio da se radi o vrsti *C. jejuni*. Da bi se potvrdila primenljivost prajmera AP10 u smislu detekcije izolata *Campylobacter*

spp. koji pripadaju vrsti *jejuni* iako su hipurat negativni potrebno je izvršiti dalja ispitivanja na većem broju uzoraka.

Prajmer DJP17 je dizajniran u ovom radu na osnovu sekvenci prajmera koji su rezultovali amplifikacijom fragmenata koji formiraju profile dovoljno informativne za razlikovanje izolata unutar vrste. Sastoji se od 17 parova baza, tako da je duži je nego uobičajeni RAPD prajmeri. Takođe, temperatura pripajanja ovog prajmera iznosi 57° C, što je više nego kod drugih korišćenih RAPD prajmera. Ove karaktersitike povećavaju specifičnost prajmera.

Na dendrogramu koji nastaje na osnovu rezultata RAPD analize prajmerom DJP17 uočavaju se 3 klastera koji se međusobno razlikuju 60%. Klasteri su podeljeni na više subklastera, a subklasteri na više grana, što govori u prilog visokoj rezolutivnosti prajmera DJP17 koji razlikuje veliki broj različitih profila među ispitivanim izolatima. Dodatna ispitivanja ovog prajmera na većem broju izolata mogla bi potvrditi njegovu vrednost za epidemiološke studije.

Klaster 1 nastao ispitivanjem prajmerom DJP17 obuhvata 2 subklastera međusobno različita 46%. Subklaster 1 klastera 1 obuhvata dva izolata *C. coli* različitog porekla: P29 poreklom iz cekuma živine i V17 poreklom od ljudi u okviru grane 1. U grani 2 se nalaze 2 izolata *C. jejuni* (C34 i C38) poreklom iz istog uzorkovanja briseva trupova brojlera. Grane su međusobno različite 33%. Subklaster 2 klastera 1 obuhvata 5 izolata *C. jejuni* različitog porekla. Podeljen je na 2 grane od kojih grana 1 obuhvata samo jedan izolat C60 poreklom iz brisa trupa brojlera. Grana 2 obuhvata 4 izolata poreklom iz brisa trupa brojlera, ispirka trupa i kože sa dorzalnog dela vrata. Ovi izolati su međusobno različiti oko 20%. S obzirom da su izolovani iz različitog materijala, u različitim klanicama tokom dužeg vremenskog perioda, njihova grupisanost u isti klaster, subklaster i granu, potvrđuje vrednost prajmera DJP17 za epidemiološka istaživanja.

Klaster 2 obuhvata 2 izolata *C. jejuni* (A43 i C59) koji su međusobno veoma slični (razlika oko 6%). Ova dva izolata se najviše razlikuju od drugih *C. jejuni* izolata. Primenom nekih drugih prajmera kao AK16, ovi izolati su se takođe grupisali zajedno, ali se pri analizi prajmerom DJP17 izdvajaju u poseban klaster.

Klaster 3 obuhvata dva subklastera međusobno različita 46%. U subklasteru 1 klastera 3 razlikuju se 2 grane međusobno udaljene 34%. U grani 1 nalaze se 4 izolata *C. coli* poreklom sa farme (cekum brojlera) i iz klanice (bris tupa brojlera), a u grani 2 samo jedan izolat *C. jejuni* (C36) poreklom iz brisa trupa brojlera. Ovaj izolat

je poreklom iz iste klanice i iz istog uzorkovanja kao izolati C34, C35 i C38 koji se nalaze u različitim granama i subklasterima klastera 1. Subklaster 2 klastera 3 podeljen je na dve grane udaljene 40% od kojih grana 1 obuhvata samo izolat poreklom od ljudi V16, a grana 2 obuhvata 2 referentna soja i jedan *C. jejuni* izolat (A58) poreklom iz brisa trupa brojlera. Izolat V16 razlikuje se od referentnih sojeva R50 i R51 oko 40%. Iako su referentni sojevi izolovani iz uzoraka poreklom od ljudi – fecesa čoveka i deteta, ovo je očekivan rezultat uzimajući u obzir različito geografsko poreklo.

Izolati *C. jejuni* i *C. coli* nisu jasno odvojeni u posebne klasterne kod primene prajmera DJP17. Neki izolati *C. coli* su bliži izolatima *C. jejuni* što se može povezati sa amplifikacijom konzervativnih regiona u genomu specifičnih za rod *Campylobacter*. Razlike u profilima nastaju usled amplifikacije varijabilnih regiona u genomu i različitog rasporeda target sekvenci.

Izolat A53 koji je okarakterisan kao *C. jejuni* i *C. coli* (mešana infekcija) sa prajmerom DJP17 daje isti profil kao izolat A58 sa kojim je istog porekla. Sa drugim RAPD prajmerima, npr. AG15 ovaj izolat daje profil koji je identičan sa profilom *C. coli* C26 i P29. Ovo je još jedan dokaz da se radi o mešanoj infekciji, jer izolat ponekad reaguje kao *C. jejuni*, a ponekad kao *C. coli*.

Mazurier i saradnici (1992.) su primenjivali RAPD metod u pokušaju tipizacije izolata *C. jejuni* bez prethodne potrebe za prečišćavanjem DNA. Izolati su korišćeni direktno, bez prethodne izolacije kompletne DNA. Primenjena su tri proizvoljno dizajnirana RAPD prajmera dužine 10 bp koji su primenjeni u tri posebne PCR reakcije. Na ovaj način je bilo moguće testirati veliki broj raznovrsnih izolata. U zavisnosti od prajmera dobijeni su različiti nivoi diskriminacije među izolatima.

Svi RAPD prajmeri koji su amplifikovali odgovarajuće profile iskorišteni su za zbirnu analizu izolata. Od ukupno 10 primenjenih RAPD prajmera, tri (AP10, AG15, DJP17) imaju visoko diskriminatorni potencijal. Dodatna amplifikacija prajmerima AG15 i OPA8 omogućava adekvatnu primenu na izolatima različitog porekla (izolati sa klanica, sa farme, poreklom od ljudi), što zadovoljava zahteve o primeni najmanje 4 prajmera dobre rezolucije za pouzdanu RAPD analizu. Kombinovana primena omogućava znatno informativnije podatke o razlikama u genomu svakog izolata.

Na dendrogramu zbirne RAPD analize jasno su odvojeni klasteri izolata *C. jejuni* od *C. coli* što ide u prilog tvrdnji da se RAPD analiza može koristiti u cilju

diferencijacije vrsta unutar roda *Campylobacter*. Takođe, jasna je međusobna diferencijacija izolata u okviru vrste, s tim što su razlike među *C. jejuni* izolatima veće nego među ispitivanim *C. coli* izolatima. Analiza većeg broja *C. coli* izolata doprineće boljoj proceni diverziteta u okviru te vrste. Kombinovanom RAPD analizom su izolati različitog porekla grupisani zajedno. Izolat A58 srodan je soju R51 koji je referentni soj *C. jejuni* ATCC 29428. Izolat poreklom od ljudi *C. jejuni* V16 blisko je srodan izolatu sa klanice živine C60. Nasuprot tome, izolat poreklom od ljudi *C. coli* V17 razlikuje se od živinskih izolata za 20% što je najveća razlika u klasteru *C. coli*. Ovaj nalaz može ići u prilog tvrdnji da se *C. coli* kod ljudi ne javlja kao infekcija vezana sa konzumacijom brojlerskog mesa već je druge etiologije. Podaci dobijeni u dosadašnjem istraživanju nisu dovoljni za formiranje definitivnog zaključka zbog malog broja izolata poreklom od ljudi dostupnih za poređenje. Dopunska ispitivanja izolata sa istog lokaliteta, ali različitog porekla bi mogla dati više informacija o etiologiji oboljenja ljudi.

Litrup i saradnici (2007.) su primenom MLST pristupa na izolatima *C. coli* poreklom od ljudi i poreklom od brojlera i svinja ustanovili da se neki od serotipova preklapaju kod svih vrsta. Na uzorku od 160 *C. coli* izolata, samo 10% izolata poreklom od ljudi preklapalo se sa izolatima poreklom od svinja, što bi značilo da svinjsko meso nije glavni izvor kampilobakterioze uzrokovane sa *C. coli*.

Za rep-PCR analizu primenjeni su sledeći prajmeri: (GTG)₅ i BOXA1R za BOX-PCR i par prajmera ERIC 1R i ERIC 2 za ERIC-PCR analizu. Prajmeri BOXA1R i ERIC 1R i ERIC 2 nisu dali zadovoljavajuću amplifikaciju sa ispitivanim izolatima u nekoliko ponovljenih analiza. Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa istraživanjima drugih grupa naučnika koji su dobili diskriminatorne profile primenom ERIC-PCR-a (Wardak i Jagielski, 2009., Wilson *et al.*, 2009., Sahilah *et al.*, 2010.). Razlog za nedostatak zadovoljavajuće amplifikacije kod ERIC-PCR analize može biti u specifičnosti izolata *Campylobacter* vrsta sa geografskog područja Republike Srbije, pa bi standardna metodologija mogla biti podvrgnuta modifikacijama koje bi dovele do željenog rezultata.

Prajmer (GTG)₅ je jedan od prajmera za BOX-PCR. Na dendrogramu se uočavaju dva jasno odvojena klastera, *C. jejuni* i *C. coli*. Klaster *C. coli* je podeljen na dva subklastera međusobno različita 28%. U subklasteru 1 nalaze se svi izolati poreklom od živine, a u subklasteru 2 samo izolat V17 poreklom od ljudi. Ovakav nalaz u skladu je sa nalazom zbirne RAPD analize gde su takođe *C. coli* izolati grupisani u

poseban klaster sa 2 subklastera i V17 je sam u subklasteru 2. Razlika između subklastera kod zbirne RAPD analize iznosi 28%. Klaster *C. jejuni* je podeljen na 2 podklastera. Izolat V16 nalazi se u istom klasteru kao referentni soj R50.

Behringer et al. (2011.) sprovedli su studiju tipizacije na 100 izolata *C. jejuni* i *C. coli* izolovanih iz brojlera ili mesa brojlera poreklom iz tri geografska regiona. U studiji je ispitano 49 izolata *C. jejuni* i 51 izolat *C. coli*. Svi izolati su poreklom iz fecesa brojlera i sa trupova zaklanih brojlera. Ovi rezultati (procentualna zastupljenost sojeva *C. jejuni* / *C. coli*) odgovaraju nalazima ovog istraživanja. REP-PCR metoda omogućila je tipizaciju 100% ispitivanih sojeva, ali je dolazilo do preklapanja profila *C. jejuni* i *C. coli*. REP-PCR metoda omogućava bolje rezultate kod tipizacije *C. jejuni* nego *C. coli*, ali ne omogućava nedvosmisleno razlikovanje ove dve vrste. Rezultati analize prajmerom (GTG)₅ omogućili su razlikovanje vrsta, ali su profili u okviru vrste slabije diskriminativni. Neophodna je analiza znatno većeg broja izolata kako bi se potvrdila diskriminativnost ovog prajmera na autohtonim izolatima Srbije.

Na osnovu svih sprovedenih istraživanja može se zaključiti da su ispitivani izolati pripadali rodu *Campylobacter*, vrstama *jejuni* i *coli*, a da je upotrebom RAPD i rep-PCR analize moguće izvršiti njihovu genotipizaciju i razdvajanje do soja. Stepem razlika koje se dobijaju među izolatima zavisi od primenjenog prajmera.

Izolati *C. jejuni* međusobno se više razlikuju nego *C. coli*. Pri primeni prajmera BC318 svi izolati daju iste profile, pa se on može koristiti samo za razlikovanje *C. jejuni* od *C. coli*, ali ne i za tipizaciju unutar vrste. Prajmeri AG15, OPA8 i SPH1 daju razlike u okviru *C. jejuni* izolata koje nisu dovoljno informativne. Prajmeri AK16, AP10 i DJP17 daju veliki broj profila i njihova diskriminatorsna moć je visoka. Zajednički se mogu koristiti za tipizaciju izolata.

Izolat poreklom od ljudi V16 pri analizi većinom RAPD prajmera (OPA8, AG15, AP10, DJP17) formira specifične profile, različite od živinskih. Prajmerom BC318 rezultuje istovetnim profilom kao i svi ostali izolati, a primenom SPH1 i AK16 formira isti profli kao neki od živinskih izolata (C60). Na dendrogramu zbirne RAPD analize izolat V16 se takođe grupiše sa izolatom C60 koji je poreklom iz brisa kože brojlera. Ovaj nalaz govori u prilog teorijama da je živinsko meso čest uzročnik kampilobakterioze ljudi. Na dendrogramu rep-PCR analize sa (GTG)₅

prajmerom V16 je najbliži referentnom soju R 50 ATCC 33291, a od izolata C60 je udaljen oko 36%. Ovi rezultati pokazuju da izolati poreklom od ljudi sa različitog geografskog područja imaju sličan raspored repetitivnih elemenata, ali da se u analizi kompletnog genoma dosta razlikuju.

Što se tiče ostalih izolata *C. jejuni*, izolati C34, C35 i C38 koji potiču iz istog uzorkovanja zajedno su grupisani i na osnovu zbirne RAPD analize i na osnovu rep-PCR analize prajmerom (GTG)₅. Među njima postoje razlike u profilima dobijenim sa različitim prajmerima, ali nisu delili uzorke u različite klastere ili su klasteri u kojima su se nalazili bili veoma bliski (udaljenost 18% sa RAPD prajmerima i 4% sa (GTG)₅). Udaljenost u zbirnoj RAPD analizi je znatno veća jer su rezultati dobijeni sa više pojedinačnih prajmera i obuhvaćena je analiza kompletnog genoma, dok se kod (GTG)₅ radi o pojedinačnom prajmeru koji daje analizu konzervativnijih sekvenci - BOX repetitivnih elemenata. Za razliku od ovih izolata, izolat C36 koji potiče iz istog uzorkovanja značajno je udaljen od ostalih, grupiše se sa izolatima B15 (analiza prajmerima AK16 i zbirna RAPD analiza) ili R51 (prajmeri SPH1 i (GTG)₅).

Izolati C32 do C38 su biohemijskim testovima identifikovani kao *C. coli*, a u m-PCR-u su prepoznati kao *C. jejuni*. Tokom RAPD i rep-PCR analiza davali su profile kao *C. jejuni* izolati. Njihova velika međusobna heterogenost iako potiču od istog uzorkovanja na klanici i od istog jata, govori u prilog navodima da se u jatu sukcesivno menja više sojeva *Campylobacter*-a tokom tova, pri čemu nema dokaza da bilo koji soj isključuje prisustvo ostalih (Bull *et al.*, 2006., Höök *et al.*, 2005.).

Izolati A43 i C59 koji potiču sa različitih lokacija međusobno se grupišu u istom klasteru pri analizi prajmerima AK16, DJP17 i u zbirnoj RAPD analizi, kao i kod analize sa (GTG)₅ prajmerom. Ovo govori u prilog tvrdnji da su neki genotipovi *C. jejuni* šire rasprostranjeni na terenu. Ispitivanja u ovom radu bila su ograničena na jedno uže područje, tako da bi eventualno proširenje ispitivanja na teritoriju cele Srbije moglo dati više podataka o rasprostranjenosti nekih genotipova uzročnika.

Tokom istraživanja, veća pažnja je usmeravana na analizu *C. jejuni* izolata, tako da je analiziran manji broj *C. coli* izolata u početnim istraživanjima, a kasnije samo nekolicina reprezentativnih izolata iz prethodnih analiza. Većina ispitanih *C. coli* izolata međusobno je dosta slična, razlike koje postoje ih dele u 2 ili 3 klastera

(prajmeri AP10, DJP17, BC318). Pri analizi prajmerima SPH1, AG15 i (GTG)₅ svi izolati su grupisani u okviru jednog klastera, odnosno nisu pokazali međusobne razlike.

Najrazličitiji od svih ispitivanih *C. coli* izolata je izolat poreklom od ljudi V17. Izolat potiče iz fecesa osobe sa dijagnostikovanom kampilobakteriozom. Prema biohemijskim ispitivanjima i m-PCR analizi identifikovan je kao *C. coli*. RAPD prajmerima BC18, AK16, AG15, AP10 i DJP17 daje jedinstven profil ovog izolata, različit od živinskih izolata. RAPD prajmerima OPA8 i SPH1 dao je istovetne profile kao i živinski izolati što je u skladu sa zaključkom da su ovi prajmeri diskriminatorni na nivou vrste, ali se ne mogu koristiti za razlikovanje unutar vrste.

Od ostalih *C. coli* izolata može se izdvojiti izolat P29 poreklom iz cekuma brojlera koji je pri analizi prajmerom BC318 sličan izolatima A1 i A2 koji su poreklom iz brisa trupa brojlera, ali se pri analizi prajmerima AK16, AG15, AP10 i DJP17 razlikuje od njih. Ovaj izolat je biohemijski i u m-PCR-u okarakterisan kao *C. coli*.

Izolati A1 i A2 daju iste profile primenom BC318, SPH1, OPA8, AK16 i AG15, ali se razlikuju primenom AP10 i DJP17. Izolati C25 i C26, takođe poreklom iz brisa trupa brojlera, daju različite profile pri analizi sa prajmerom DJP17, dok ostali prajmeri ne rezultuju razlikama u profilima.

Iz napred izloženog može se zaključiti da su neki od RAPD prajmera (AP10, DJP17) korišćenih u ovom istraživanju visoko rezolutivni i daju razlike unutar *C. coli* vrste, čak i među sojevima istog porekla. Naročit značaj pri ispitivanju autohtonih *Campylobacter* izolata ima diskriminatorna moć prajmera DJP17, koji je dizajniran za potrebe ovih istraživanja.

*
* *

Tokom ovog istraživanja prikupljeni su podaci o prisustvu termotolerantnih *Campylobacter* vrsta na farmama i klanicama živine, dobijeni izolati tipizirani upotrebom molekularnih metoda i grupisani u klastere na osnovu kojih je urađena njihova filogenetska analiza. Nivo prisustva *Campylobacter* vrsta na farmama i klanicama u Republici Srbiji je na nivou ili nešto ispod nivoa prijavljenog u okruženju i

Evropskoj uniji. Stepen različitosti autohtonih izolata ispitanih u ovoj studiji bio je do 75% na nivou roda (razlikovanje klastera izolata *C. jejuni* od klastera izolata *C. coli* upotrebom prajmera AG15), odnosno do 66% u okviru vrsta (izolati *C. jejuni* međusobno upotrebom prajmera AK16). Ovakva situacija je u saglasnosti sa opštom slikom prisustva *Campylobacter* vrsta u različitim zemljama sveta, kako u procentualnoj zastupljenosti uzročnika na farmama i klanicama, tako i u smislu raznovrsnosti izolata. Razlike u odnosu na podatke iz sveta se zapažaju u odnosu na broj obolelih ljudi, koji je znatno niži u Republici Srbiji. Razlog za ovakve podatke je nepostojanje sistema detekcije i praćenja kampilobakterioze ljudi u zdravstvenom sistemu Republike Srbije. Procenat pregledanih uzoraka osoba sa simptomima kampilobakterioze je nizak iz razloga neobraćanja pacijenata za lekarsku pomoć ili odluke lekara da ne pošalje uzorke na analizu.

Ipak, na osnovu nalaza ove studije, može se zaključiti da kolonizacija živine kampilobakterijama postoji i da meso živine može predstavljati uzrok nastanka alimentarnih gastrointestinalnih oboljenja ljudi. Zato je u interesu poboljšanja zdravlja ljudi primeniti sve raspoložive strategije za smanjenje procenta kolonizovanih jedinki na farmi i kontaminiranih trupova na klanici.

Strategije borbe protiv *Campylobacter* vrsta obuhvataju kompleksan pristup problemu kroz čitav lanac proizvodnje mesa brojlera.

Faktori rizika nastanka kolonizacije brojlera i kontaminacije trupova su mnogobrojni, a u cilju smanjenja njihovog uticaja moguće je primeniti različite strategije (EFSA, 2011.):

1. intervencije protiv prisustva *Campylobacter* vrsta u primarnoj proizvodnji
 - striktna primena biosigurnosnih mera na farmama – postavljane dezinfekcionih barijera, ograničavanje poseta farmi, kontrola insekata i drugih štetočina
 - voda za piće – voda za piće mora biti po kvalitetu ista kao voda za ljudsku upotrebu; ukoliko se koristi bunarska voda, mora biti adekvatno tretirana
 - smanjenje starosti brojlera za klanje – preporuka je da se klanje vrši u starosti 33 – 35 dana, jer je dokazano da se sa povećanjem starosti za 10 dana, nivo kolonizacije povećava dvostruko

- izostanak proređivanja jata – proređivanje jata je važan faktor rizika nastanka kolonizacije zbog povećane manipulacije pticama i prisustva radnika u jatu
 - primena bakteriocina – primena baktericina u hrani pre klanja može redukovati prisustvo *Campylobacter* vrsta u crevima brojlera gotovo u potpunosti
 - primena hemijskih aditiva u hrani i vodi – organske kiseline i neki biološki agensi se mogu dodavati hrani i vodi u cilu redukcije broja *Campylobacter*-a u crevima brojlera
2. intervencije protiv prisustva *Campylobacter* vrsta u transportu i pre klanja
- uskraćivanje vode i hrane pre i tokom transporta – primenjuje se da bi se smanjio volumen creva i količina fecesa koja se izlučuje tokom transporta
 - čišćenje i dezinfekcija transportnih kaveza
3. intervencije protiv prisustva *Campylobacter* vrsta tokom klanja i obrade
- prevencija prosipanja sadržaja creva
 - praktikovanje zakazanog klanja – jata koja su detektovana kao pozitivna na *Campylobacter* spp. treba da se kolju posle negativnih jata, a trupovi iz ovakvih jata se posle klanja posebno tretiraju (zamrzavanje, toplotna obrada, dekontaminacija)
 - dekontaminacija – može se vršiti primenom fizičkih uticaja ili hemijskim sredstvima, s tim što je hemijska dekontaminacija zabranjena. Fizička sredstva koja pokazuju dobre rezultate su primena temperature (smrzavanje i upotreba toplote) i jonizujućeg zračenja.

Takođe, neophodno je raditi na povećanju svesti krajnjih korisnika mesa brojlera (restorani i domaćinstva) o potrebi pravilnog rukovanja hranom, prvenstveno u smislu smanjenja unakrsne kontaminacije različitih vrsta hrane tokom rukovanja. Primenom higijenskih mera u kuhinji i pravilnog čuvanja hrane, kontaminacija mesa brojlera se smanjuje ili potpuno uništava, a unakrsna kontaminacija druge hrane sprečava. Ovo je s obzirom na karakteristike uzročnika i njegovo lako uništavanje delovanjem spoljašnjih faktora najefikasniji vid borbe protiv kampilobakterioze ljudi.

Sve ove mere u manjem ili većem stepenu smanjuju broj *Campylobacter*-a u mesu brojlera i mogućnost nastanka kampilobakterize ljudi. Primena nekoliko mera u kombinaciji može predstavljati efikasnu strategiju borbe sa ovim patogenom.

7. ZAKLJUČAK I BUDUĆI RAD

Cilj ovih istraživanja bila je detekcija *Campylobacter* vrsta i tipizacija izolovanih sojeva, posebno *C. jejuni* u živinskom mesu u Republici Srbiji. Tokom ostvarenja postavljenog cilja, odgovoreno je na sve zadatke:

1. Ispitivanjem uzoraka uzetih od brojlera na farmi tokom uzgoja utvrđeno je da je procenat kolonizovanih brojlera 11.6%. Iz uzoraka koji su uzeti iz okruženja (voda, hrana, brisevi opreme) *Campylobacter* vrste nisu izolovane.
2. *Campylobacter* vrste su dokazane u 22.6% trupova zaklanih brojlera. Primenom biohemijskih analiza i modifikovane multipleks PCR metode izolati *Campylobacter* vrsta su identifikovani kao *C. jejuni* (44.7%) i *C. coli* (55.3%).
3. Izolati *C. jejuni* poreklom od ljudi i živine su se primenom RAPD i rep-PCR analize grupisali u okviru istog klastera, što ukazuje da je izvor infekcija ljudi moglo biti meso brojlera. Izolat *C. coli* poreklom od ljudi se genotipski razlikovao od izolata sa trupova zaklanih brojlera i verovatno je drugog porekla.
4. Zadovoljavajući rezultati tipizacije izolata *Campylobacter* vrsta dobijeni su primenom RAPD i rep-PCR metode. Međutim, RAPD analiza je omogućila bolju genotipizaciju i razlikovanje izolata unutar vrste. Stepenn međusobnih razlika je zavisio od primenjenog prajmera, tako da je izvršena selekcija prajmera za primenu u dijagnostici adekvatna visokoj rezoluciji uz što manje finansijske resurse.
5. RAPD analiza primenom 5 odabranih prajmera: DJP17, AP10, AK16, AG15 i OPA8 omogućava dobru rezoluciju za genotipizaciju i razlikovanje autohtonih izolata istog ili različitog porekla (izolati sa klanica, sa farme, poreklom od ljudi). Kao reproducibilan, rezolutivan i ekonomičan preporučuje se, u ovim istraživanjima razvijen, brzi skrining diverziteta autohtonih *Campylobacter* izolata kombinovanjem modifikovanog m-PCR i RAPD pomoću DJP17 i AP10 prajmera.

6. S obzirom na ustanovljeno prisustvo različitih *Campylobacter* vrsta i različitih izolata u okviru vrste, a u cilju smanjenja njihovog prisustva na farmama i u klanicama, preporučuje se sprovođenje svih biosigurnosnih mera.

LITERATURA

- Achen M, Morishita TY and Ley EC, 1998:** *Shedding and colonisation of Campylobacter jejuni in broilers from day-of-hatch to slaughter age*, Avian Dis., Vol. 42, Issue 4, p. 732-737
- Açık MN and Çetinkaya B, 2006:** *Random amplified polymorphic DNA analysis of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from healthy cattle and sheep*, J Med. Microb., 55: 331-334
- Al Amri A, Senok AC, Ismaeel AY, Al-Mahmeed AE and Botta GA, 2007:** *Multiplex PCR for direct identification of Campylobacter spp. in human and chicken stools*, J. Med. Microbiol., 56, p. 1350–1355
- Allos BM and Blaser MJ, 1995:** *Campylobacter jejuni and the expanding spectrum of related infections*, Clin. Infect. Dis. 20: 1092-1099
- Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI and Swerdlow DL, 1999:** *Campylobacter jejuni – An emerging foodborne pathogen*, Emerg. Infect. Dis., Vol. 5, No. 1, p. 28-35
- Behringer M, Miller WG and Oyarzabal O, 2011:** *Typing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR*, J. Microbiol. Meth., 84, p: 194-201
- Biswas D, Hannon SJ, Townsend HGG Potter A and Allan B, 2011:** *Genes coding for virulence determinants of Campylobacter jejuni in human clinical and cattle isolates from Alberta, Canada, and their potential role in colonization of poultry*, Int. Microbiol. 14:25-32
- Blaser MJ, 1997:** *Epidemiologic and clinical features of Campylobacter jejuni infections*, J. Infect. Dis., Vol. 176, Suppl. 2, p. 103-105
- Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP and Blaser MJ, 1988:** *Experimental Campylobacter jejuni Infection in Humans*, J Infect Dis. 157 (3): 472-479.
- Boes J, Nersting L, Nielsen EM, Kranker S, Enøe C, Wachmann HC, Baggesen DL, 2005:** *Prevalence and diversity of Campylobacter jejuni in pig herds on farms with and without cattle or poultry*, J Food Prot., 68(4):722-7
- Bryan FL and Doyle MP, 1995:** *Health risk and consequences of Salmonella and Campylobacter jejuni in raw chicken*, J. Food Protect., Vol. 58, No. 3, p. 326-344
- Bull SA, Allen VM, Domingue G, Jørgensen F, Frost AJ, Ure R, Whyte R, Tinker D, Corry JEL, Gillard-King J and Humphrey TJ, 2006:** *Sources of Campylobacter spp. Colonizing Housed Broiler Flocks during Rearing*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 72 no. 1 645-652

- Bustamante VH, Puente JL, Sanchez-Lopez F, Bobadilla M and Calva E, 1995:** *Identification of Campylobacter jejuni and C. coli using the rpoB gene and a cryptic DNA fragment from C. jejuni*, Gene, Vol. 165, p. 1-8
- Carvalho ACT, Ruiz-Palacios GM, Ramos-Cervantes P, Cervantes LE, Jiang X and Pickering LK, 2001:** *Molecular Characterization of Invasive and Noninvasive Campylobacter jejuni and Campylobacter coli Isolates*, J. Clin. Microbiol., vol. 39, no. 4, p. 1353-1359
- Ceelen L, Decostere A, Ducatele R and Haesebrouck F, 2006:** *Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle*, Microbiol. Res., 161: 109-120
- Cody AJ, Maiden MCJ and Dingle KE, 2009:** *Genetic diversity and stability of the porA allele as a genetic marker in human Campylobacter infection*, Microb., 155(12), p. 4145-4154
- Corry and Atabay, 2001:** *Poultry as a source of Campylobacter and related organisms*, J. Appl. Microbiol. Volume 90, Issue S6, pages 96S–114S
- Daskalov H and Maramski A, 2012:** *Prevalence and factors affecting the presence of Campylobacter spp. in broiler carcasses in Bulgaria*, Turk. J. Vet. Anim. Sci.2012; 36(5): 539-545
- De Bruijn FJ, 1992:** *Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of Rhizobium meliloti isolates and other soil bacteria*, Appl. Environ. Microbiol., 58(7): 2180-2186
- Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G and Colin P, 1999:** *Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of Campylobacter jejuni and C. coli*, Lett. Appl. Microbiol., Vol. 29, p. 406-410
- Dingle KE, Colles FM, Ure R, wagenaar JA, Duim B, Bolton FE, Fox AJ, Wareing DRA and Maiden MCJ, 2002:** *Molecular characterisation of Campylobacter jejuni clones: a basis for epidemiological investigation*, Emerg. Infect. Dis., Vol. 8, No. 9, p. 949-955
- Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure, R, Fox AJ, Bolton FE, Bootsma HJ, Willems RJL, Urwin R and Maiden MCJ, 2001:** *Multilocus sequence typing system for Campylobacter jejuni*, J. Clin. Microb., Vol. 39, No. 1, p. 14-23
- Dingle KE, van den Braak N, Colles FM, Price LJ, Woodward DL, Rodgers FG, Endtz HP, van Belkum A and Maiden MCJ, 2001:** *Sequence typing confirms that Campylobacter jejuni strains associated with Guillain-Barre and Miller-Fisher syndromes are of diverse genetic lineage, serotype and flagella type*, J. Clin. Microb., Vol. 39, No. 9, p. 3346-3349
- Dooley JJ, Harrison SP, Mytton LR, Dye M, Cresswell A, Skot L and Beeching JR, 1993:** *Phylogenetic grouping and identification of Rhizobium isolates on the*

basis of random amplified polymorphic DNA profiles, Can. J. Microbiol. 39: 665-73

Dorrell N, Mangan JA, Laing KG, Hinds J, Linton D, Al-Ghusein H, Barrell BG, Parkhill J, Stoker NG, Karlyshev AV, Butcher PD and Wren BW, 2001: *Whole genome comparison of Campylobacter jejuni human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity*, Genome Res., Vol. 11, p. 1706-1715

Doyle MP, Beuchat LR and Montville TJ, 1997: *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, American Society for Microbiology, 1325 Massachusetts Ave., Washington, DC 20005

Duim B, Ang CV, van Belkum A, Rigter A, van Leeuwen NWJ, Endtz HP and Wagenaar JA, 2000: *Amplified fragment length polymorphism analysis of Campylobacter jejuni strains isolated from chicken and from patients with gastroenteritis or Guillain-Barre or Miller-Fisher syndrome*, Appl. Envir. Microb., Vol. 66, No. 9, p. 3917-3923

Duim B, Vandamme PAR, Rigter A, Laevens S, Dijkstra JR and Wagenaar JA, 2001: *Differentiation of Campylobacter species by AFLP fingerprinting*, Microbiology, Vol. 147, p. 2729-2737

Duim B, Wassenaar TM, Rigter A and Wagenaar JA, 1999: *High-resolution genotyping of Campylobacter strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting*, Appl. Envir. Microb., Vol. 65, No 6, p. 2369-2375

EFSA Journal 2013; 11(4): 3129: *Scientific report of EFSA and ECDC – The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011*

EFSA Journal 2011; 9(4): 2105: *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 2011; 9(3): 2090: *Scientific report of EFSA and ECDC – The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009*

EFSA Journal 2010 (1496): *Scientific report of EFSA and ECDC – The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2008*

EFSA Journal, 2006: *Report on proposed technical specifications for a coordinated monitoring programme for Salmonella and Campylobacter in broiler meat in the EU*, 92, 1-33

Enright MC and Spratt BG, 1999: *Multilocus sequence typing*, Trends Microb., Vol. 7, No. 12, p. 482-487

- Ertas HS, Çetinkaya B, Muz A, Öngör H, 2004:** *Genotyping of broiler-originated Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolates using fla typing and random amplified polymorphic DNA methods*, In. J Food Microb., 94: 203-209
- Everest PH, Goossens H, Butzler JP, Lloyd D, Knutton S, Ketley JM and Williams PH, 1992:** *Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by Campylobacter jejuni and C. coli*, J. Med. Microbiol. 37: 319-325
- Fayos A, Owen RJ, Hernandez J, Jones C and Lastovica A, 1993:** *Molecular subtyping by genome and plasmid analysis of Campylobacter jejuni serogroups O1 and O2(Penner) from sporadic and outbreak cases of human diarrhoea*, Epidemiol. Infect., 111, p.415-427
- Foley SL, Lynne AM and Nayak R, 2009:** *Molecular typing methodologies for microbial tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens*, Inf. Gen. Evol., 9: 430-440
- Ge Z, Schauer DB and Foz JG, 2008:** *In vivo virulence properties of bacterial cytolethal distending toxin*, Cell Microbil., 10: 1599-1607
- Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W and Harper WES, 1989:** *Transfer of Campylobacter pylori and Campylobacter mustelae to Helicobacter gen. nov. as Helicobacter pylori comb. nov and Helicobacter mustelae comb. nov., respectively*, Intern. J. Syst. Bact., Vol. 39, p. 397-405
- Hadden RDM and Gregson NA, 2001:** *Guillain-Barr syndrome and Campylobacter jejuni infection*, J. Appl. Microb., Vol. 90, p. 145S-154S Suppl. S 2001.
- Harrington CS, Thomson Carter FM and Carter PE, 1997:** *Evidence for recombination in the flagellin locus of Campylobacter jejuni: implications for the flagellin gene typing scheme*, J. Clin. Microb., Vol. 35, p. 2386-2392
- Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH and Vogt PH, 1997:** *Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol*, BioTechniques 23:504-511
- Hiett KL, Seal BS and Siragusa GR, 2006:** *Campylobacter spp. subtype analysis using gel-based repetitive extragenic palindromic – PCR discriminates in parallel fashion to flaA short variable region DNA sequence analysis*, J. Appl. Microb. 101, p. 1249-1258
- Hilton AC, Mortiboy D, Banks JG and Penn CW, 1997.:** *RAPD analysis of environmental, food and clinical isolates of Campylobacter spp.*, FEMS Immun. & Med. Microbiol., [Volume 18, Issue 2](#), p. 119–124
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST, 1994:** *Bergey's manual of determinative bacteriology*, ninth edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA

- Helena Höök H, Abdel Fattah M, Ericsson H, Vågsholm i and Danielsson-Tham ML, 2005:** *Genotype dynamics of Campylobacter jejuni in a broiler flock*, Vet. Microbiol., Volume 106, Issues 1–2, Pages 109–117
- Hu L and Kopecko DJ, 1999:** *Campylobacter jejuni 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells*, Infect. Immun., Vol. 67, No. 8, p. 4171-4182
- Humphrey TJ, Henley A and Lanning DG, 1993:** *The colonisation of broiler chickens with Campylobacter jejuni: some epidemiological investigations*, Epidemiol. Infect., Vol. 110, p. 601-607
- Ishii S and Sadowsky MJ, 2009:** *Application of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution*, Env. Microb. 11 (4): 733-740
- Jenssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, Vos P, Zabeau M and Kersters K, 1996:** *Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy*, Microbiology, Vol. 142, p. 1881-1893
- Kalvatchev Z, Draganov P, Kalvatchev N, 2004:** *Efficiency of multiplex polymerase chain reaction (M-PCR) for detection and molecular analysis of human viruses*, Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 18/2004/3
- Kapperud G, Skjerve E, Vik I, Hauge K, Lysaker A, Aalmen I, Ostroff SM and Potter M, 1993:** *Epidemiological investigation of risk factors for Campylobacter colonisation in Norwegian broiler flocks*, Epidemiol. Infect., Vol. 111, p. 245-255
- Kaur R, Ganguly NK, Kumar L and Walia BNS, 1993:** *Studies on the pathophysiological mechanism of Campylobacter jejuni-induced fluid secretion in rat ileum*, FEMS Microb. Lett., Vol. 111, p. 327-330
- Ketley JM 1997:** *Pathogenesis of enteric infection by Campylobacter*, Microbiology 143, 5–21
- Kirpekar F, Nordhoff E, Larsen LK, Kristiansen K, Roepstorff P and Hillenkamp F, 1998:** *DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry*, Nucl. Acids Res., Vol. 26, No. 11, p. 2554-2559
- Kokotovic B and On SLW, 1999:** *High-resolution genomic fingerprinting of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli by analyses of amplified fragment length polymorphism*, FEMS Microb. Lett., Vol. 173, p. 77-84
- Konkel ME and Cieplak W Jr, 1992:** *Altered synthetic response of Campylobacter jejuni to cocultivation with human epithelial cells is associated with enhanced internalization*, Infect. Immun., 60: 4945-4949

- Konkel ME, Monteville MR, Rivera-Amill V and Joens LA, 2001:** *The pathogenesis of Campylobacter jejuni –mediated enteritis*, Curr. Issues Microbiol., 2(2): p. 55-71
- Kramer JM, Frost JA, Bolton FJ, Wareing DRA, 2000.:** *Campylobacter Contamination of Raw Meat and Poultry at Retail Sale: Identification of Multiple Types and Comparison with Isolates from Human Infection*, J. Food Protect., Volume 63, Number 12, pp. 1654-1659(6)
- Kumar NS and Gurusubramanian G, 2011:** *Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications*, Sci Vis 11 (3), 116-124
- Lindstedt BA, Heir E, Vardund T, Melby KK and Kapperud G, 2000:** *Comparative fingerprinting analysis of Campylobacter jejuni subsp. jejuni strains by amplified fragment length polymorphism genotyping*, J. Clin. Microb., Vol. 38, No. 9, p. 3379-3387
- Linton D, Lawson AJ, Owen RJ and Stanley J, 1997:** *PCR Detection, Identification to Species Level, and Fingerprinting of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli Direct from Diarrheic Samples*, J. Clin. Microbiol., p. 2568–2572
- Litrup E, Torpdahl M, Nielsen EM, 2007:** *Multilocus sequence typing performed on Campylobacter coli isolates from humans, broilers, pigs and cattle originating in Denmark*, J Appl Microbiol.;103(1):210-8.
- Leonard EE, Takata T, Blaser MJ, Falkow S, Tompkins LS and Gaynor EC, 2003:** *Use of an Open-Reading Frame–Specific Campylobacter jejuni DNA Microarray as a New Genotyping Tool for Studying Epidemiologically Related Isolates*, J Infect Dis. (2003) 187 (4): 691-694.
- Maiden MCJ and Dingle KE, 2008:** *Population biology of Campylobacter jejuni and related organisms*, in **Campylobacter** 3rd edition, edited by Nachamkin I, Szymanski CM and Bleser MJ, 2008, ASM Press, Washington DC
- Mazurier S, van de Giessen A, Heuvelman K, Wernars K, 1992:** *RAPD analysis of Campylobacter isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA*, Lett Appl Microbiol. 1992;14(6):260-2.
- McCarthy ND, Gillespie IA, Lawson AJ, Richardson J, Neal KR, Hawtin PR, Maiden MC and O'Brien SJ, 2012:** *Molecular epidemiology of human Campylobacter jejuni shows association between seasonal and international patterns of disease*, Epidemiol. Infect., 140(12): 2247–2255
- Mliki A, Staub EJ, Zhangyong S and Abdelwahed G, 2001:** *Genetic diversity in melon (Cucumis melo L.): An evaluation of African germplasm*, Genetic Resources and Crop Evolution, 48: 587-597
- Møller Nielsen E, Engberg J, Fussing V, Petersen L, Brogren CH, On SLW, 2000:** *Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping of*

Campylobacter jejuni isolates from human, poultry and cattle, J Clin. Microb. 38(10):3800

- Møller Nielsen E, Engberg J and Madsen M, 1997:** *Distribution of serotypes of Campylobacter jejuni and C. coli from Danish patients, poultry, cattle and swine*, FEMS Immunol. Med. Microbiol., Volume 19, Issue 1, September 1997, Pages 47–56
- Nachamkin I, Bohachick K & Patton CM, 1993:** *Flagellin gene typing of Campylobacter jejuni by restriction fragment length polymorphism analysis*, J. Clin. Microbiol., Vol. 31, No. 6, p. 1531-1536
- Newell DG, McBride H, Saunders F, Dehele Y and Pearson AD, 1985:** *The virulence of clinical and environmental isolates of Campylobacter jejuni*, J. Hyg. 94: 45-54
- Nogva H, Bergh A, Holck A and Rudi K, 2000:** *Application of 5'-nuclease PCR assay in the evaluation and development of methods for quantitative detection of Campylobacter jejuni*, Appl. Environ. Microbiol., Vol. 66, p. 4029-4036
- On SLW, 1998:** *In vitro genotypic variation of Campylobacter coli documented by pulsed-field gel electrophoretic DNA profiling: implications for epidemiological studies*, FEMS Microbiol. Lett. 165:341–346
- On SLW & Harrington CS, 2001:** *Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differential Campylobacter fetus subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods*, J. Appl. Microb., Vol. 90, p. 285-293
- Panigrahi P, Losonky G, De Tolla LJ and Moris JG, 1992:** *Human immune response to Campylobacter jejuni proteins expressed in vitro*, Infect. Immun., 60.: 4938-4944
- Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quall MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AHM, Whitehead S and Barrell BG, 2000:** *The genome sequence of the food-bourne pathogen Campylobacter jejuni reveals hipervariable sequences*, Nature, Vol. 403, p. 665-668
- Pasquali F, De Cesare A, Manfreda G and Franchini A, 2011:** *Campylobacter control strategies in European poultry production*, W. Poultry Sci. J., Vol. 67, p. 5 – 18
- Payne RE, Lee MD, Dreesen DW and Barnhart HM, 1999:** *Molecular epidemiology of Campylobacter jejuni in broiler flocks using randomly amplified polymorphic DNA-PCR and 23S rRNA-PCR and role of litter in its transmission*, Appl. Environ. Microbiol.: 65 (1):260

- Pearson AD, Greenwood MH, Feltham RKA, Healing TD, Donaldson J, Jones DM and Colwell RR, 1996:** *Microbial ecology of Campylobacter jejuni in a United Kingdom chicken supply chain: intermittent common source, vertical transmission and amplification by flock propagation*, Appl. Environ. Microb., Vol. 62, No. 12, p. 4614-4620
- Persson S and Olsen KEP, 2005:** *Multiplex PCR for identification of Campylobacter coli and Campylobacter jejuni from pure cultures and directly on stool samples*, J. Med. Microbiol, vol. 54, No 11, p. 1043-1047
- Russel RG, Sarmiento JI, Fox J and Panigrahi P, 1990:** *Evidence of reinfection with multiple strains of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in Macaca nemestrina housed under hyperendemic conditions*, Infect Immun., 58(7): 2149–2155
- Russel RG, O'Donnoghue M, Blake DC Jr, Zulty J and De Tolla LJ, 1993:** *Early colonic damage and invasion of Campylobacter jejuni in experimentally challenged infant Macaca mulatta*, J. Infect. Dis., 168: 210-215
- Sahilah AM, Tuan Suraya TS, Noraida I, Ahmad Azuhairi A, Chai LC and Son R, 2010:** *Detection of virulence genes and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR) analysis among raw vegetables isolates of Campylobacter jejuni*, Int. Food Res. J., 17: 681-690
- Savelkoul PHM, Aarts HJM, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls L, and Lenstra JA, 1999:** *MINIREVIEW: Amplified-fragment length polymorphism: the state of an art*, J. Clin. Microb., Vol. 37, No. 10, p. 3083-3091
- Selenska-Pobell S, Evguenieva-Hackenberg E, Radeva G and Squartini A, 1996:** *Characterization of Rhizobium hedusari by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic fingerprinting*, J. Appl. Bacteriol., 80: 517-28
- Shanker S, Lee A and Sorrel TC, 1990:** *Horizontal transmission of Campylobacter jejuni amongst broiler chicks: experimental studies*, Epidemiol. Infect., Vol. 104, p. 101-110
- Sheppard SK, Dallas JF, MacRae M, McCarty ND, Sproston EL, Gormley FJ, Strachan NJC, Ogden ID, Maiden MCJ and Forbes KJ, 2009:** *Campylobacter genotypes from food animal, environmental sources and clinical disease in Scotland 2005/6*, Int. J Food Microb., 134: 96-103
- Sheppard SK, Dallas JF, Strachan NJC, MacRae M, McCarthy ND, Wilson DJ, Gormley FJ, Falush D, Ogden ID, Maiden MCJ and Forbes KJ, 2009:** *Campylobacter Genotyping to Determine the Source of Human Infection*, Clin. Infect. Dis. 2009; 48:1072–8
- Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA and Teixeira P, 2011:** *Campylobacter spp. as a food-bourne pathogen: a review*, Frontiers Microbiol., Vol. 2, Art. 200, p. 1-11

- Sinha S, Prasad KN, Pradhan S, Jain D. and Jha S, 2004:** *Detection of preceding Campylobacter jejuni infection by polymerase chain reaction in patients with Guillain-Barre syndrome*, Trans R Soc Trop Med Hyg 98, 342–346
- Skirrow MB and Blaser MJ, 2000:** *Clinical aspects of Campylobacter infection*, in: Nachamkin I and Blaser MJ (Eds), *Campylobacter* 2nd edition ASM Press, Washington DC, 2000., pp. 69-88
- Spratt BG, 1999:** *Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet*, Curr. Opin. Microb., Vol. 2, p. 312-316
- Stern NJ, Cox NA and Musgrove MT, 2001:** *Incidence and levels of Campylobacter in broilers after exposure to an inoculated seeder bird*, J. Appl. Poult. Res., Vol. 10, p. 315-318
- Suerbaum S, Lohrengel M, Sonnevend A, Ruberg F and Kist M, 2001:** *Allelic diversity and recombination in Campylobacter jejuni*, J. Bacteriol., Vol. 183, No. 8, p. 2553-2559
- Szymanski CM, King M, Haardt M and Armstrong GD, 1995:** *Campylobacter jejuni motility and invasion of caco-2 cells*, Infect. Immun., Vol. 63, No 11, p. 4295-4300
- Tan YF, Haresh KK, Chai LC and Son R, 2009:** *Antibiotic susceptibility and genotyping by RAPD of Campylobacter jejuni isolated from retailed ready-to-eat sushi*, Internat. Food Res. J. 16: 31-38
- Tauxe RV, 2002:** *Emerging foodborne pathogens*, Intern. J. Food Microb., Vol. 78, p.31-41
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH and Swaminathan B, 1995:** *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing*, J. Clin. Microb., Vol. 33. No. 9, p. 2233-2239
- Trajkovska-Dokić E, Stojkovska S, Icev K and Grozdanova A, 2011:** *Serogrouping and randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of Campylobacter jejuni*, Maced. J Med. Sci., electronic publication ahead of print, <http://dx.doi.org/10.3889/MJMS.1857-5773.2011.0200>
- Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R and De Ley J, 1991:** *Revision of Campylobacter, Helicobacter and Wolinella taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal for Arcobacter gen. nov.*, Int. J. Syst. Bacteriol., Vol. 41, p. 88-103
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K and Swings J, 1996:** *Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics*, Microb. Rev., Vol. 60, p. 407-438

- Varnam AH and Evans MG, 1996:** *Food borne pathogens*, Manson Publishing Ltd., London
- Veron M and Chatelain R, 1973:** *Taxonomic study of the genus Campylobacter Sebald and Veron and designation of the neotype strain for the type species, Campylobacter fetus (Smith and Taylor) Sebald and Varon*, Intern. J. Syst. Bact., Vol. 23, p. 122-134
- Versalović J, Koeth T and Lupski JR, 1991:** *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes*, Nucl. Acids Res., Vol. 19, No. 24, p. 6823-6831
- Versalović J, Schneider M, de Bruijn FJ and Lupski JR, 1994:** *Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction*, Meth. Mol. Cell. Biol., Vol. 5, no. 1, pp. 25-40
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M, 1995:** *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*, Nucl. Acid Res., Vol. 23, Issue 21, p. 4407-4414
- Wardak S and Jagielski M, 2009:** *Evaluation of genotypic and phenotypic methods for the differentiation of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli clinical isolates from Poland. II. PFGE, ERIC-PCR, PCR-flaA-RFLP and MLST*, Med. Dosw. Mikrobiol., 61(1):63-77.
- Wassenaar, TM, 2000:** *Molecular methods for detection, speciation and subtyping of Campylobacter spp.*, Lohmann Information, No. 24, page 13-19
- Wassenaar TM, Geilhausen B and Newell DG, 1998:** *Evidence of genomic instability in Campylobacter jejuni isolated from poultry*, Appl. Environ. Microbiol. 64:1816–1821
- Wassenaar TM, 1997:** *Toxin production by Campylobacter species*, Clin. Microb. Rev., Vol. 10. No. 3, p. 466-476
- Wassenaar TM and Newell DG, 2000:** *Genotyping of Campylobacter spp*, Appl. Environ. Microb., Vol. 66, No. 1, p. 1-9
- Wilson MK, Lane AB, Law BF, Miller WG, Joens LA, Konkel ME and White BA, 2009:** *Analysis of the pan genome of Campylobacter jejuni isolates recovered from poultry by pulse-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing (MLST) and repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR) reveals different discriminatory capabilities*, Microb. Ecol. 58: 843-855
- Woodward DL & Rodgers FG, 2002:** *Identification of Campylobacter Heat-Stable and Heat-Labile Antigens by Combining the Penner and Lior Serotyping Schemes*, J. Clin. Microbiol., Vol. 40, No. 3, p. 741-745

BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena M. Petković je rođena 9. jula 1975. godine u Jagodini. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Jagodini. Fakultet veterinarske medicine u Beogradu upisala je 1994. godine i diplomirala 2001. godine sa prosečnom ocenom 9.36. Godine 2001. upisala je poslediplomske studije na Fakultetu veterinarske medicine, na Katedri za higijenu i tehnologiju namirnica, odsek Higijena i tehnologija namirnica animalnog porekla, gde je 6. juna 2005. godine odbranila magistarsku tezu pod nazivom „*Primena i razvoj testova molekularne genetike za tipizaciju sojeva Campylobacter jejuni*“. Od decembra 2011. godine zaposlena je u Veterinarskom specijalističkom institutu „Jagodina“ u Jagodini u Odeljenju za mikrobiološko ispitivanje namirnica animalnog porekla.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а JELENA PETKOVIĆ

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ANALIZA FIZICA PRISUSTVA CAMPYLOBACTER JEJUNI
U HANCI PROIZVODNJE ŽIVINSKOG MESA

- 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 интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25.9.2013

JPetkovic

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора JELENA PETKOVIC'

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада ANALIZA BIZIKA PRISUSTVA CAMPYLOBACTER JEJUNI U LANCU

Ментор PROF DR OLIVERA BUNEC'

Потписани JELENA PETKOVIC'

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 28. 9. 2013.

Petkovic'

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

ANALIZA FIZIKA PRISUSTVA CAMPYLOBACTER JEJUNI
U LANCU PROIZVODNJE ŽIVINSKOG MESA

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 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 докторанда

У Београду, 25. 9. 2013

Preković

1. Ауторство - Дозвољава 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. Дозвољава 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. Дозвољава 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. Дозвољава 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. Дозвољава 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. Дозвољава 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.