

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Daniela PETEK

**TIPIZACIJA BAKTERIJ *Campylobacter jejuni* NA
OSNOVI MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ (MLST)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Daniela PETEK

**TIPIZACIJA BAKTERIJ *Campylobacter jejuni* NA OSNOVI
MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ (MLST)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) OF *Campylobacter jejuni*
STRAINS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo in Genskem laboratoriju na Oddelku za živilstvu Biotehniške fakultete in Statens Serum Institutu v Kopenhagenu na Danskem.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Sonja Smole Možina, za somentorico doc. dr. Neža Čadež in za recenzentko prof. dr. Darja Žgur Bertok.

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Somentorica: doc. dr. Neža ČADEŽ

Recenzentka: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Neža ČADEŽ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Daniela Petek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.25. 083:577.2.083 (043) = 163.6
KG	<i>Campylobacter jejuni</i> /tipizacija/PCR/sekvenciranje/tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij/MLST/alelni tip/sekvenčni tip/klonski kompleks
AV	PETEK, Daniela
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ČADEŽ, Neža (somentorica)/ŽGUR BERTOK, Darja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2012
IN	TIPIZACIJA BAKTERIJ <i>Campylobacter jejuni</i> NA OSNOVI MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ (MLST)
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 58 str., 17 pregl., 15 sl., 75 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	

Bakterije vrste *Campylobacter jejuni* so najpogostejši povzročitelj bakterijskega gastroenteritisa pri ljudeh. Njihova epidemiologija je še v marsičem nepojasnjena, zato se razvijajo različne tipizacijske metode kot orodje za odkrivanje izvora in poti širjenja okužb. Namen diplomske naloge je bila tipizacija 55 sevov različnega izvora z genotipizacijsko metodo na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST). Sedem sevov je izviralo iz vode, 18 iz piščančjega mesa, 6 iz piščančjega fecesa, 4 iz puranjega fecesa, 5 iz govejega fecesa, 4 iz puranov in 10 iz humanih kliničnih vzorcev, poleg tega smo analizirali še referenčni sev *C. jejuni*. Uporabili smo analizo sekvenc sedmih hišnih genov *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA* in variabilne regije gena *flaA* z računalniškim programom Bionumerics®. Namen analize je bil ugotoviti morebitno povezavo med izvorom izolatov in ugotovljenimi sekvenčnimi tipi oz. klonskimi kompleksi. Sevi z enakim izvorom naj bi imeli pogosteje enake alele za hišne gene *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA* in regijo *flaA* in s tem isti sekvenčni tip oz. klonski kompleks. Z analizo MLST pa smo ugotovili, da sevi z enakim izvorom niso imeli enakih alelov hišnih genov. Pripadali so različnim sekvenčnim tipom in so bili uvrščeni v različne klonske komplekse. Najpogosteje (pri 19 izolatih od 55 analiziranih) smo potrdili klonski kompleks CC-21, ki je tudi sicer znan kot najpogostejši v evropskih državah. Odkrili smo ga pri vseh tipih izolatov, razen iz vode. Iz alelnih profilov sedmih hišnih genov in variabilnih regij *flaA* smo skupno določili 33 različnih sekvenčnih tipov za 48 sevov bakterij *C. jejuni*, ki smo jim uspeli določiti sekvence v vseh analiziranih regijah, kar odraža izjemno raznolikost analiziranih sevov. Pričakovali smo, da se bodo pojavili novi aleli hišnih genov in regij *flaA*, ki jih še ni v podatkovni bazi MLST. Domnevo smo potrdili z novimi vpisi v podatkovno zbirko, predvsem za analizirane seve iz površinskih vod.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDC 579.25.083:577.2. 083 (043) = 163.6
 CX *Campylobacter jejuni*/typing/PCR/sequencing/multilocus sequence
 typing/MLST/allele type/sequence type/clonal complex
 AU PETEK, Daniela
 AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/ČADEŽ, Neža (co-advisor)/ŽGUR
 BERTOK, Darja (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme
 in Microbiology
 PY 2012
 TI MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) OF *Campylobacter jejuni*
 STRAINS
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO IX, 58 p., 17 tab., 15 fig., 75 ref.
 LA SI
 AL sl/en

AB *Campylobacter jejuni* is the most common cause of human bacterial gastroenteritis. Because its epidemiology still remains unclear, many different typing methods are being developed as tools for defining the source of infectious strains and elucidation of their transmittance. The aim of this diploma work was to type 55 *C. jejuni* strains from different sources with multilocus sequence typing (MLST) method. Seven of the strains were isolated from water, eighteen from broiler meat, six from broiler faeces, four from turkey faeces, five from bovine faeces, four from turkeys and ten from human clinical samples. The reference strain of *C. jejuni* was also tested. In addition to that also. Nucleotide sequences of seven housekeeping genes (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*) and variable region of *flaA* gene were analyzed with Bionumerics® computer software. The main purpose of this study was to determine potential correlation between the sources of different isolates and determined sequence types or clonal complexes. Bacterial strains of common origin were expected to have the same alle types of housekeeping genes gene *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA* and *flaA* region and would therefore belong to the same sequence type or clonal complex. Our results, however did not confirm this hypothesis. Isolates of common origin belonged to different sequence types and were assigned to different clonal complexes. The most frequently determined clonal complex was CC-21 (19 out of 55 isolates) which is also the most commonly determined clonal complex in other European countries. It was identified in all isolates of common origin, except those isolated from water. There were 48 *C. jejuni* isolates, for which sequences of all analyzed regions were determined. They were classified to 33 different sequence types identified based on seven housekeeping gene alleles and variable regions of *flaA* gene. This reflects high diversity of analyzed group of isolates. As expected, novel alleles of housekeeping genes were identified and deposited into public database. Majority of the strains with novel allele sequences were isolated from water samples.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE DIPLOMSKE NALOGE	2
1.1.1 Cilji diplomske naloge	2
1.1.2 Delovne hipoteze diplomske naloge	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SPLOŠNE IN FIZIOLOŠKE ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Campylobacter</i>	3
2.2 EPIDEMIOLOGIJA	3
2.3 TIPIZACIJA	5
2.3.1 Fenotipizacijske metode	6
2.3.2.1 Tipizacija na podlagi restrikcijskih analiz DNA	7
2.3.2.2 Tipizacija na podlagi naključnih pomnožkov PCR	9
2.3.2.4 Tipizacija MLST za <i>C. jejuni</i>	11
2.4 PRIMERJAVA METOD IN RAZISKAVE	13
2.5 DOLOČANJE IZVORA SEVOV <i>Campylobacter jejuni</i>	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Mikroorganizmi	18
3.1.2 Mikrobiološka gojišča	18
3.1.3 Reagenti	19
3.1.4 Laboratorijska oprema in materiali	23
3.2 METODE DELA	24
3.2.1 Revitalizacija kultur	24
3.2.2 Priprava lizatov – PREPMAN PrepMan Ultra® (Applied Biosystems)	24
3.2.3 Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij - analiza MLST	24
3.2.3.1 Verižna reakcija s polimerazo - PCR	24
3.2.3.2 Gelska elektroforeza	25
3.2.3.3 Čiščenje pomnožkov PCR z encimi	25

3.2.3.4	Določanje nukleotidnega zaporedja.....	26
3.2.3.5	Končno čiščenje pomnožkov pred sekvenciranjem	27
3.2.3.6	Avtomatska kapilarna elektroforeza.....	27
3.2.3.7	Obdelava podatkov z računalniškim programom Bionumerics®-analiza MLST	28
4	REZULTATI.....	29
4.1	POMOŽEVANJE MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ HIŠNIH GENOV <i>Campylobacter jejuni</i> Z METODO PCR	29
4.3	DOLOČITEV SEKVENČNIH TIPOV	30
4.3.1	Določitev alelnih tipov	31
4.3.2	Določitev sekvenčnih tipov (ST)	34
4.5	ANALIZA KRATKE VARIABILNE REGIJE GENA <i>flaA</i>	34
4.7	ANALIZA LOKUSOV HIŠNIH GENOV IN REGIJ <i>flaA</i> GLEDE NA IZVOR SEVOV	39
4.8	ANALIZA SEKVENC GLEDE NA GEOGRAFSKO POREKLO SEVOV	43
5	RAZPRAVA.....	45
5.1	ANALIZA LOKUSOV HIŠNIH GENOV GLEDE NA IZVOR SEVOV	45
5.1.1	Izolati iz vode	45
5.1.2	Izolati iz piščančjega in puranjega mesa	46
5.1.3	Izolati iz piščančjega, puranjega in govejega fecesa.....	46
5.1.4	Humani izolati.....	46
6	SKLEPI	48
7	POVZETEK.....	49
8	VIRI	50
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava osnovnega medija krvnega agarja Columbia.....	18
Preglednica 2: Sestavine dodatka za rast (Oxoid, SR023E).....	18
Preglednica 3: Sestavine dodatka za selektivnost (Oxoid, SR069).....	18
Preglednica 4: Sestavine osnovnega medija Brain Heart Infusion.....	19
Preglednica 5: Sestavine gojišča za zamrzovanje.....	19
Preglednica 6: Sestava mešanice PCR.....	20
Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi v založni koncentraciji 10 μ M (Sigma).....	20
Preglednica 8: Sestava 50 x pufera TAE.....	20
Preglednica 9: Sestava 1 x pufer TAE.....	21
Preglednica 10: Sestava molekulskega označevalca dolžin pomnožkov-100 baznih parov.....	21
Preglednica 11: Sestava mešanice ExoISAP za čiščenje pomnožkov PCR.....	21
Preglednica 12: Sestava mešanice za sekvenciranje za 1 reakcijo.....	22
Preglednica 13: Začetni oligonukleotidi za sekvenciranje.....	22
Preglednica 14: Sestava mešanice za končno čiščenje pomnožkov za 1 reakcijo.....	22
Preglednica 15: Sestava in količina, potrebna za izvedbo PCR za 1 reakcijo.....	25
Preglednica 16: Sestava in količina sekvenčne mešanice za 1 sekvenčno reakcijo.....	26
Preglednica 17: Najpogostejši alelni vzorci z ustreznim sekvenčnim tipom.....	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Lokacije genskih lokusov na kromosomu, referenčnega seva <i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (Dingle in sod., 2001).	10
Slika 2: Shema eksperimentalnega dela.	17
Slika 3: Shema mikrotitrne ploščice za PCR.	25
Slika 4: Shema mikrotitrne plošče za sekvenciranje.	26
Slika 5: Naprava za PCR, AB Applied Biosystems 270 Thermal Cycler.	27
Slika 6: Sekvenator AB Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzer.	28
Slika 7: Primer agaroznega gela s pomnožki PCR.	29
Slika 8: Ukazno okno v programu Bionumerics®.	30
Slika 9: Pogostost alelnih tipov, lokusov <i>aspA</i> , <i>glyA</i> , in <i>gltA</i> v populaciji 55 analiziranih sevov <i>C. jejuni</i> .	31
Slika 10: Pogostost alelnih tipov, lokusov <i>pgm</i> , <i>glnA</i> , <i>tkf</i> in <i>uncA</i> v populaciji 55 analiziranih sevov <i>C. jejuni</i> .	32
Slika 11: Dendrogram sorodnosti 55 sevov <i>C. jejuni</i> , z izpisanimi alelnimi vzorci, določenimi s programom Bionumerics®.	33
Slika 12: Dendrogram sorodnosti sevov glede na klonske komplekse ter sekvence <i>flaA</i> -nuc ter <i>flaA</i> -pep.	37
Slika 13: Dendrogram humanih, živalskih in iz vode izoliranih sevov, z oznako sekvenčnega tipa, klonskega kompleksa in izvora.	40
Slika 14: Shematski prikaz raznolikosti klonskih kompleksov sevov istega izvora.	41
Slika 15: Dendrogram humanih in živalskih sevov ter sevov, izoliranih iz vode, z oznako ST, CC in regije izolacije.	43

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizen dolžin pomnoženih delov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)
BHI	mikrobiološko gojišče (angl. Brain Heart Infusion Broth)
CC	klonski kompleks (angl. Clonal Complex)
cDNA	komplementarna DNA
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CFU	kolonije tvoreče enote oz. kolonijske enote (angl. Colony Forming Unit)
ddH ₂ O	dvakrat destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat (angl. Deoxynucleotide Triphosphate)
<i>flaA</i>	gen za flagelin
<i>glnA</i>	glutamin sintetazni gen
<i>gltA</i>	citrat sintazni gen
<i>glyA</i>	serin hidroksimetil transferazni gen
MEE	multilokusna encimska elektroforeza (angl. Multilocus Enzyme Electrophoresis)
MLST	tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. Multilocus Sequence Typing)
mRNA	informacijska RNA
NMR	jedrska magnetna resonanca (angl. Nuclear Magnetic Resonance)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
<i>pgm</i>	fosfoglukomutazni gen
qRT-PCR	kvantitativna obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo
PFGE	pulzna gelska elektroforeza (angl. Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
RAPD-PCR	naključno pomnoževanje polimorfne DNA (angl. Random Amplification of Polymorphic DNA)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism)
rRNA	ribosomska RNA
ST	sekvenčni tip
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (angl. Single Nucleotide Polymorphism)
SVR	kratka variabilna regija (angl. Short Variable Region)
<i>tkt</i>	transketolazni gen
<i>uncA</i>	ATP sintazni gen
UPMGA	metoda neponderirane aritmetične sredine (angl. Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean)

1 UVOD

Bakterije rodu *Campylobacter* so po Gramu negativne, običkane bakterije v obliki spirano zavitih palčk. So mikroaerofilne in termotolerantne, najbolje rastejo pri 42 °C. V rod *Campylobacter* uvrščamo tudi *Campylobacter jejuni*. Njihov naravni rezervoar je gastrointestinalni trakt perutnine, goveda in prašičev. Do okužbe ljudi z *C. jejuni* največkrat pride zaradi zaužitja premalo toplotno obdelanega perutninskega mesa, nepasteriziranega mleka in onesnažene vode. Pri ljudeh pride do okužb prebavil, ki se kaže kot vodena driska v lažji obliki ali v hujši obliki kot krvava driska. Ob okužbi prebavil običajno pride tudi do povišane telesne temperature. Lažje oblike okužb večinoma izzvenijo same. Pri hujši obliki okužbe je potrebno zdravljenje z antibiotiki. Zdravljenje lahko oteži odpornost proti antibiotikom. Pri preprečevanju okužb si lahko pomagamo z dobro higieno pri pripravi mesa, pravilno toplotno obdelavo mesa, s pasterizacijo mleka in kloriranjem vode.

Čeprav je *C. jejuni* najpogostejši povzročitelj bakterijskega gastroenteritisa pri ljudeh, je njegova epidemiologija še v marsičem nepojasnjena in prav zato se razvijajo različne tipizacijske metode kot pomembno orodje za odkrivanje izvorov in poti širjenja okužb. Vir okužbe je običajno skupen, vendar pa ga je zaradi razpršenosti težko izslediti. Eden od načinov je, da preučujemo pot okužbe z tipizacijskimi metodami.

Kampilobaktri so genetsko zelo raznoliki in njihovo raznolikost je mogoče detektirati na fenotipskem in genotipskem nivoju. Najpogosteje uporabljene metode določanja genetske raznolikosti so gelska elektroforeza v pulzirajočem polju (PFGE), polimorfizem dolžnin restrikcijskih fragmentov pomnoženih s PCR (PCR-RFLP), restrikcijska analiza fragmentov rDNK, pomnoženih z verižno polimerazno reakcijo, pomnoževanje z naključnimi začetnimi oligonukleotidi (RAPD, AP-PCR), dolžinski polimorfizem pomnoženih fragmentov (AFLP) in druge (Nachamkin in sod., 1993; Shi in sod., 2002). Primernejše so genotipizacijske metode, ker lahko z njimi identificiramo posamezne seve znotraj vrst, kar je nujno za epidemiološke in taksonomske študije (Čadež in Štorman, 2004).

Novejša metoda je tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST). Pri kampilobaktrih vključuje analizo nukleotidnega zaporedja sedmih lokusov hišnih genov *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA* in gena *flaA*. Posamezen lokus uvrstimo na podlagi nukleotidnega zaporedja oziroma alela v alelni tip, kombinacijo posameznih alelnih tipov pa v posamezne sekvenčne tipe (ST), le-te pa v klonske komplekse. Pri tem uporabljamo podatkovno bazo, dostopno na medmrežju PubMLST (Jolley, 2012). Novi sekvenčni in klonski tipi, ki še niso v MLST-podatkovni bazi, se dodatno vpisujejo v bazo. Ta

podatkovna baza služi kot koristen vir informacij in je epidemiološko orodje za preučevanje izbruhov kampilobakterioz.

1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE DIPLOMSKE NALOGE

1.1.1 Cilji diplomske naloge

Zadali smo si naslednje cilje:

- Z reakcijo PCR pomnožiti nukleotidna zaporedja sedmih hišnih genov (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*) in kratke variabilne regije SVR- *flaA* za 55 sevov *Campylobacter jejuni*, izoliranih iz različnih virov (voda, puranji, goveji, piščančji, feces, piščančje in puranje meso ter humani klinični vzorci).
- S sekvenciranjem določiti zaporedja nukleotidov v regijah genov *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA* ter *flaA*-nuc in *flaA*-pep.
- S programom Bionumerics (Applied Method, Belgija) določiti sekvenčne tipe (ST) in klonske komplekse (CC) vseh 55 izolatov.
- Morebitne nove sekvenčne tipe in klonske komplekse vnesti v podatkovno zbirko za *C. jejuni* in primerjati klonske komplekse izolatov različnega izvora.

1.1.2 Delovne hipoteze diplomske naloge

Predpostavili smo naslednje:

- Sevi z enakim izvorom naj bi imeli pogosteje enake alele za hišne gene *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA* in regijo *flaA* in s tem isti sekvenčni tip in zato bodo uvrščeni v isti klonski kompleks.
- Pričakovali smo tudi, da je lahko prišlo do nukleotidnih sprememb v hišnih genih sevov istega izvora, zaradi mutacij genov, horizontalnih prenosov in rekombinacij in jih bomo zato lahko uvrstili tudi v različne klonske komplekse.
- Pričakovali smo tudi, da se bodo pojavili novi aleli hišnih genov, ki jih še ni v podatkovni bazi MLST.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNE IN FIZIOLOŠKE ZNAČILNOSTI BAKTERIJ RODU *Campylobacter*

Zgodovina bakterij rodu *Campylobacter* sega več kot sto let nazaj, v leto 1886, ko jih je verjetno med prvimi opisal Escherich, ki pa tem bakterijam še ni pripisoval vzroka za nastanek bolezni. Šele leta 1972 so eksperimentalno potrdili, da so bakterije rodu *Campylobacter* povzročiteljice bolezni, ki so povezane s hrano (Park, 2002).

Bakterije rodu *Campylobacter* so po Gramu negativne ukrivljene palčke s polarnima bičkoma. Celični premer bakterij je od 0,2 do 0,5 μm (Horrocks, 2009). Uvrščamo jih v red *Campylobacteriales* (skupaj z rodovoma *Helicobacter* in *Wollinella*). V rod *Campylobacter* uvrščamo 18 vrst, med katerimi so najbolj zanimive termotolerantne vrste, ki povzročajo kampilobakterioze pri ljudeh in rastejo med 30 in 64 °C. Optimalna temperatura za njihovo rast je 42 °C (Humphrey in sod., 2007).

C. jejuni se od drugih patogenov, ki povzročajo okužbe preko živil, razlikuje v tem, da je mikroaerofil. Zato za rast potrebuje mikroaerofilno atmosfero, ki je sestavljena iz 10 % CO₂ in 5 % O₂ (Humphrey in sod., 2007; Park, 2002).

C. jejuni in ostale bakterije rodu *Campylobacter* nimajo proteinov hladnega stresa kot ostale bakterije, zato ne morejo rasti pri temperaturah, nižjih od 30 °C. Kljub temu, da se pri nizkih temperaturah ne morejo razmnoževati, lahko na določeni hrani preživijo daljša obdobja v velikem številu. Prav tako kažejo pri nizkih temperaturah opazno metabolno aktivnost, vključno z *de novo* sintezo proteinov, kemotakso in aerotakso (Humphrey in sod., 2007).

Campylobacter spp. je občutljiv na visoke temperature. Pri toplotnem šoku se zaščiti s sintezo proteinov toplotnega stresa, kot so DnaJ, DnaK, Lon proteaza, HrcA, GrpE in HspR. Mutante v genu *dnaJ* so nesposobne rasti pri 46 °C, kar vpliva tudi na sposobnost kolonizacije. Odziv toplotnega stresa pri vrsti *Campylobacter* spp. uravnava dvokomponentni sistem RacRS. Ta sistem je odgovoren za različno izražanje proteinov pri 37 °C in 42 °C (Park, 2002). Dokazano je, da bakterije, ki so pred izpostavitvijo visokim temperaturam stradane 5 ur, lažje prenašajo stres toplotnega šoka in preživijo v večjem številu kot bakterije, ki predhodno rastejo pri optimalnih hranilnih pogojih (Klančnik in sod., 2006).

2.2 EPIDEMIOLOGIJA

Kampilobaktri so v naravi zelo razširjeni in živijo kot komenzali v prebavilih, sečilih in rodilih številnih domačih živali, kot so govedo, ovce, prašiči, perutnina, koze, psi, mačke, divje živali, glodalci in različne ptice. Pri ljudeh povzročajo bolezen, imenovano kampilobakterioza (Kapperud in sod., 2003). Od vseh vrst rodu *Campylobacter* je

najpogostejši povzročitelj okužb *C. jejuni*, ki je povzročitelj kampilobakterioz v približno 90 % primerov (de Haan in sod., 2010a).

Največjo nevarnost za sporadične okužbe z bakterijami *Campylobacter* spp. predstavlja perutninsko meso, saj je velik delež svežega, pa tudi zamrznjenega mesa, okuženega. Stopnja kontaminacije je glede na literaturne vire različna in sega od $\log_{10} 2$ do $\log_{10} 5$ CFU (Nachamkin in Blaser, 2000) oz. do $\log_{10} 3$ CFU/g (Bardoň in sod., 2011) na piščančji trup, kar lahko poleg nizke infektivne doze predstavlja veliko nevarnost za potrošnike. Dokaz za to lahko najdemo v primeru t.i. dioksinske krize v Belgiji, kjer so leta 1999 v maju in juniju zaradi vsebnosti dioksina iz prodaje umaknili perutnino in mleko. V tem času pa se je pojavnost humanih kampilobakterioz zmanjšala kar za 40 % (Humphrey in sod., 2007; Bardoň in sod., 2011).

Človek se lahko okuži ali z uživanjem okužene hrane, vode, mleka ali z neposrednim stikom z okuženimi živalmi. Epidemiološke študije v različnih državah kažejo na to, da so največkrat za epidemije krivi dejavniki kot so prehranjevanje z nepravilno toplotno obdelanim mesom in nepravilno ravnanje s piščanci po zakolu, ko jih obdelujejo (Kapperud in sod., 2003).

Analize v Evropski uniji so pokazale zelo močno povezavo med okužbo jate piščancev s kampilobaktrom in kontaminacijo trupov teh piščancev. Verjetnost, da bodo trupi piščancev okuženi s kampilobaktri, je okrog 30-krat večja pri okuženih jatah, kot pri neokuženih. Prav tako je stopnja kontaminacije piščančjih trupov iz koloniziranih jat praviloma veliko večja od kontaminacije trupov iz nekoloniziranih jat. Okuženi trupi pa lahko izvirajo tudi iz nekoloniziranih jat, kar nakazuje možnost navzkrižne kontaminacije v klavnicah (EFSA, 2010).

Drugi pomembni dejavniki, ki lahko povzročijo okužbo, so stiki s hišnimi ljubljenci, pitje neobdelane pitne vode in kopanje v naravnih vodnih izviri. Pogosto pride tudi do neposrednega prenosa med ljudmi (Wolfs in sod., 2002; Andlovic, 2002).

Na območju držav Evropske unije se izvaja sistem nadzora nad okužbami s kampilobaktri. V Evropi, Severni Ameriki in Japonski so kampilobakterioze zelo razširjene, vendar redko prihaja do izbruhov. V kolikor se pojavijo, predvsem zaradi kontaminacije virov pitne vode, so manjših razsežnosti. Večina okužb se namreč pojavi sporadično in kljub obsežnim raziskavam ostaja njihov izvor največkrat neznan (Olson in sod., 2008).

Horizontalni prenosi kampilobaktra med jatami se lahko kontrolirajo s prehranskimi dodatki v obliki mešanic s kompetitivno nepatogeno črevesno floro, vendar v praksi ta pristop do zdaj ni pokazal zelenih rezultatov. Ena izmed rešitev je tudi razvoj učinkovitega cepiva proti kampilobakteriozi za živali. Kot najbolj učinkovita metoda se je izkazala terapija z bakteriofagi, vendar uporaba bakteriofagov, podobno kot uporaba antibiotikov, lahko vodi v razvoj odpornih sevov, ki nato predstavljajo še večji problem (Humphrey in sod., 2007).

Eden od načinov zniževanja števila bakterij na mesu je tudi daljše hlajenje mesa in s tem tudi sušenje, ki je neugodno za preživetje kampilobaktrov. Ugotovljeno je namreč bilo, da svinjsko in goveje meso, ki se dlje časa sušita v hladilnici, vsebujeta nižje število bakterij, kot piščančje meso, ki gre takoj v prodajo (Humphrey in sod., 2007).

V manj razvitih državah zbolevalo predvsem otroci starosti do dveh let, v razvitih državah pa mladi in odrasli. Največ obolenj je v poletnih mesecih, predvsem junija in julija (Andlovic, 2002). V večini držav Evropske unije in ZDA v zadnjih petih letih, je *Campylobacter* spp. postal glavni bakterijski povzročitelj gastrointestinalnih okužb. Podoben pojav je bil prvič opažen tudi v Sloveniji, leta 2009. V letu 2010 se je število prijavljenih primerov kampilobakterioze v Evropski uniji povečal za 6,7 % v primerjavi z letom 2009 (EFSA, 2009; EFSA, 2012; IVZ, 2010; CDC, 2010).

Pomembnost epidemioloških preiskav se kaže prav v tem, da se z njihovo pomočjo lahko določijo primarni viri okužb. Ko pride do epidemije, je vir okužbe pri človeku namreč velikokrat neznan in ga je težko določiti, zato je za dobro opravljeno epidemiološko raziskavo potrebno izbrati ustrezne metode tipizacije (Foley in sod., 2009; Champion in sod., 2005).

V bakteriološkem laboratoriju na Inštitutu za varovanje zdravja izvajajo molekularno tipizacijo z metodo PFGE - pulzno gelsko elektroforezo. Ugotavljajo, da je običajno vir okužbe skupen, vendar ga je zaradi razpršenosti težko izslediti. Lahko pa sledijo poti okužbe s tipizacijo in subtipizacijo povzročitelja (IVZ, 2009).

2.3 TIPIZACIJA

Tipizacija bakterijskih izolatov *C. jejuni* se deli na dve skupini, fenotipizacijske in genotipizacijske metode (Eberle in Kiess, 2012).

Metode se razlikujejo glede na lastnosti, kot so ponovljivost, občutljivost, sposobnost razlikovanja sevov in enostavnost vrednotenja rezultatov. Večina fenotipizacijskih in genotipizacijskih metod omogoča razlikovanje bakterijskih izolatov med vrstami in podvrstami. Prav to razlikovanje med vrstami izboljša sposobnost za odkrivanje in sledenje bakterij, ki se prenašajo od na primer živalskega izvora do bolnika. Uporaba teh tipizacijskih metod doprinaša k razumevanju populacijske genetike, epidemiologije, načina prenašanja s hrano oziroma vzdolž proizvodne prehranske verige ter k nadzoru patogenosti in preventivne prakse (Wiedman, 2002).

2.3.1 Fenotipizacijske metode

Klasične fenotipizacijske metode temeljijo na prisotnosti ali odsotnosti biološke in metabolne aktivnosti organizma (Arbeit, 1995).

Najbolj pogosto uporabljene fenotipizacijske metode za *Campylobacter* spp. so biotipizacija, serotipizacija in multilokusna encimska elektroforeza (MEE). Biotipizacija je tipizacija, ki temelji na metaboli aktivnosti bakterije, kot so biokemijske reakcije in toleranca na okoljske dejavnike. Metode za biotipizacijo so enostavne za uporabo in so stroškovno ugodne, vendar so najmanj diskriminatorne, torej slabo razlikujejo posamezne seve (Eberle in Kiess, 2012).

Multilokusna encimska elektroforeza temelji na fenotipskem polimorfizmu, ki je posledica različne proteinske strukture. Struktura proteinov odraža sekvenco strukturnih genov, ki imajo zapis za te proteine. Proteini se ločijo na poliakrilamidnem gelu glede na njihovo elektroforetsko mobilnost, ki je posledica naboja proteinov ter glede na njihovo velikost. Sprememba elektroforetske mobilnosti proteina oziroma encima je odvisna od mutacij na genskem lokusu, ki so povzročile zamenjavo aminokislina. Edinstveni profil na podlagi elektroforeze je tako imenovani elektromorf (Arbeit, 1995).

Pri serotipizaciji se uporabljajo protitelesa in antiserumi za odkrivanje površinskih antigenov, ki so prisotni na površini bakterij. *Campylobacter* spp. ima na svoji površini več struktur kot so lipopolisaharidi in membranske beljakovine (Linton in sod., 2001).

V uporabi sta dve serotipizacijski metodi - metoda po »Penner in Hennessy«, ki zazna toplotno stabilne antigene (HS) (Penner in Hennessy, 1980) in serotipizacijska metoda, ki zazna toplotno labilne antigene (Lior in sod., 1982). Serotipizacijske metode so dolgotrajne in tehnično zahtevne. Proizvodnja antiserumov je velik strošek, kar najpogosteje omejuje uporabo tovrstnih metod.

2.3.2 Genotipizacijske metode

Genotipizacijske metode temeljijo na molekularnih značilnostih kromosomske ali plazmidne DNA (Shi in sod., 2002). Za genotipizacijo *Campylobacter* spp. se uporabljajo tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij-MLST, verižna reakcija s polimerazo-PCR za pomnoževanje deločenih regij DNA, pulzna gelska elektroforeza, ribotipizacija in flagelinska tipizacija (Eberle in Kiess, 2012).

Genotipizacija bakterij rodu *Campylobacter* je bila v preteklosti omejena zaradi pomanjkljivosti, kot so nestandardizirane tehnike in pomanjkanja univerzalnega sistema za izolacijo. Vse to je preprečilo razvoj mednarodne tipizacijske baze *Campylobacter* (Dingle in sod., 2001).

Metode za tipizacijo, ki se uporabljajo za dokazovanje sevov in za razlikovanje med sevi, so razdeljene v tri večje skupine: tipizacija na podlagi restrikcijskih analiz DNA, tipizacija na podlagi reakcije PCR in tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij.

2.3.2.1 Tipizacija na podlagi restrikcijskih analiz DNA

Prva skupina metod temelji na restrikcijskih analizah DNA. Najstarejša metoda, ki so jo uporabljali za epidemiološke raziskave, je določanje profilov plazmidov (Mayer, 1988).

Določanje profilov plazmidov

Metoda je enostavna, izolacija plazmida pa je možna na več različnih načinov (Kado in Liu, 1981). Profil plazmida so določili na podlagi števila in velikosti fragmentov DNA, ki so se ločili s pomočjo gelske elektroforeze (Olsen in sod., 1993). Tako dobljene profile iz različnih izolatov so lahko primerjali med seboj. Velika slabost te metode je, da konformacijska oblika plazmida vpliva na potovanje v gelu med potekom gelske elektroforeze (Aktas in sod., 2007).

RFLP-polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov

Metoda polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov, je oblika RFLP-tipizacije, pri kateri se z restrikcijskimi encimi, ki redko režejo, razdeli genom na manjše število fragmentov DNA različnih velikosti, ki jih ločimo s pomočjo pulzne elektroforeze. Encima, ki se najpogosteje uporabljata za tipizacijo bakterij *Campylobacter*, sta *SmaI* in *KpnI* (Foley in sod., 2009).

Drugi pristop je prenos fragmentov DNA na membrane, čemur sledi hibridizacija z označeno sondo za določen ponavljajoč se odseke DNA (Grimont in Grimont, 1986). Za primerjavo bakterijskih sevov je pomembna velikost in število restrikcijskih fragmentov. Za genetsko primerjavo se uporabljajo razlike v restrikcijskih vzorcih. Za tipizacijo bakterij iz rodu *Campylobacter* se je metoda PFGE izkazala za eno izmed boljših tipizacijskih metod (Nielsen in sod., 2000).

Fla-tipizacije

Metoda *fla*-RFLP vključuje pomnoževanje zaporedja gena *flaA* in restrikcijo pomnožkov PCR z restrikcijskimi encimi. Podvojena DNA se obdela z restrikcijskimi endonukleazami. Nato poteče hibridizacija s sondo in nato še gelska elektroforeza (Fitzgerald in sod., 2001). *FlaA* in *flaB* sta gena, ki kodirata flagelin pri *Campylobacter* spp., njuna velikost je 59 kDa in sta v veliki meri homologna (Guerry, 2007).

Velja za uporabno, zanesljivo, a relativno drago metodo. Rezultati med laboratoriji niso neposredno primerljivi, ker mednarodni standard za uporabo točno določenih začetnih oligonukleotidov in restrikcijskih encimov ni določen.

Restriksijski encimi, ki se uporabljajo pri *fla*-tipizaciji, so *AlnI*, *DdeI*, *HinfI*, *EcoRI*, *PstI* in se ponavadi uporabljajo v kombinaciji. Encim *HinfI* ni dovolj diskriminatoren, v kombinaciji z encimom *DdeI* pa je diskriminacija povečana. Encim *DdeI* ima najvišjo diskriminacijsko stopnjo pri veterinarskih izolatih (Wassenaar in Newell, 2000).

PFGE-pulzno gelska elektroforeza

PFGE je pulzna elektroforeza, s katero ločimo razrezanem fragmente DNA.

Profil PFGE izraža spremembe v nukleotidnem zaporedju, kromosomske vključke, izpade in preureditve (Levesque in sod., 2008). Velja za zelo diskriminatorno metodo, vendar ima tudi negativne lastnosti. Za manj uspešno metodo se je izkazala pri povezovanju manjšega števila sevov in pri preučevanju naključnih primerov glede na izvor (Hedberg in sod., 2001).

V Sloveniji se je v sklopu projekta »Konkurenčnost Slovenije 2006-2013« izvajala raziskava za načrtovanje preventivnih ukrepov in nadzor okužb s kampilobaktri. Za tipizacijo *C. jejuni* so uporabljali metodo PFGE. Želeli so ugotoviti lastnosti 540 sevov, izoliranih iz ljudi, živali in živil živalskega izvora. Rezultati opravljene preiskave so potrdili veliko gensko pestrost. Ugotovljeno je bilo, da prihaja do genskih prenosov med sevi (Ocepek, 2010). Prva raziskava slovenskih izolatov kampilobaktrov iz živali in bolnikov pa je bila na osnovi rezultatov tipizacije z metodo PFGE objavljeno v letu 2006. Raziskava je bila izvedena na 127 sevih, ki so imeli različne izvore. Sevi so bili izolirani iz piščančjega mesa, humanih kliničnih vzorcev in iz brisov kloake živih živali na farmi piščancev. Določeno je bilo 80 različnih profilov PFGE. Na podlagi teh rezultatov so potrdili veliko genetsko raznolikost sevov, visok delež *C. coli* iz perutnine, veliko raznolikost sevov celo iz istega vzorca mesa in prenos *C. coli* in *C. jejuni* iz farm preko živali in mesa na ljudi (Zorman in sod., 2006)

Ribotipizacija

Za razlikovanje med bakterijskimi sevi lahko uporabljamo razlike v številu genov, ki kodirajo rRNA in njihovo genetsko variabilnost. Več kopij genskih lokusov 5S, 16S in 23S RNA je lokaliziranih na različnih delih kromosoma *Campylobacter* spp. Ti geni so dobro ohranjeni oziroma je raznolikost znotraj njih izjemno majhna.

Pri ribotipizaciji je potrebna najprej izolacija DNA, nato rezanje DNA z restriksijskimi encimi, nato gelska elektroforeza ter hibridizacija (Wassenaar in Newell, 2000). Ribotipizacija ima splošno pomanjkljivost, da obstaja omejeno število kopij rRNA v bakterijski vrsti. Omenjena pomanjkljivost zmanjša sposobnost razlikovanja te metode za *C. jejuni* v primerjavi z drugimi tipizacijskimi metodami, kot so PFGE, RAPD-PCR, *fla*-RFLP.

2.3.2.2 Tipizacija na podlagi naključnih pomnožkov PCR

Druga skupina metod temelji na verižni reakciji s polimerazo (PCR) za pomnoževanje naključnih genskih zaporedij. Sem se uvrščata dve metodi – polimorfizem dolžin pomnoženih delov (AFLP) in naključno pomnoževanje polimorfne DNA (RAPD-PCR). Metoda AFLP temelji na določanju polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov, ki jih pomnožimo z reakcijo PCR in omogoča detekcijo velikega števila DNA fragmentov. Pri tej metodi je zajet celoten genom. Genomsko DNA razrežemo z različnimi restrikcijskimi endonukleazami, čemur sledi ligacija adapterjev na leplive konce razrezanih fragmentov. Sledi selektivna pomnožitev PCR. Adapterji predstavljajo tarčno mesto za oligonukleotidne začetnike z dvema selektivnima bazama na 3' koncu. PCR pomnožke se na koncu loči z gelsko elektroforezo (Vos in sod., 1995). Metoda AFLP omogoča dobro razlikovanje med *C. jejuni* in *C. coli* (Duum in sod., 2001).

Druga metoda, RAPD-PCR s predhodno obratno transkripcijo temelji na dveh ločenih encimskih aktivnostih za izolacijo in pomnoževanje mRNA. S pomočjo reverzne transkriptaze nastane cDNA, ki je komplementarna mRNA. Nato se s pomočjo encima *Taq* DNA polimeraze pomnožimo cDNA. Ta metoda je zelo občutljiva in poteče z majhno količino vzorca (Bustin in sod., 2005). Pri hkratni verižni reakciji s polimerazo se lahko pomnoži dvoje ali več tarčnih nukleotidnih zaporedij z uporabo multipleksnih začetnih oligonukleotidov (Eberle in Kiess, 2012).

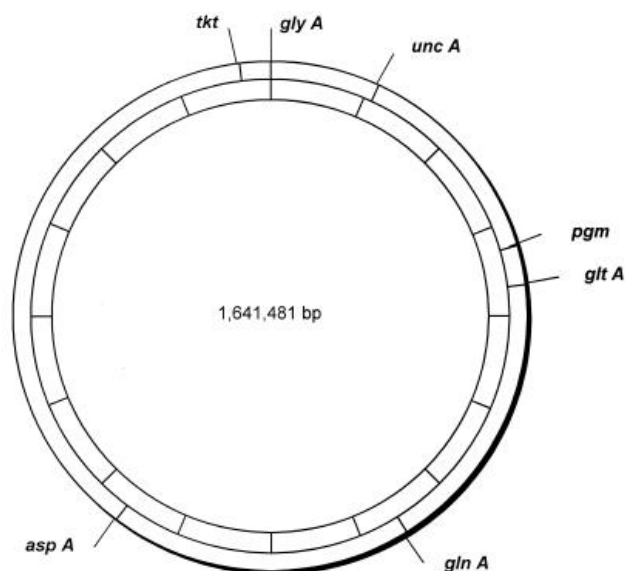
2.3.2.3 MLST

V tretjo skupino spada tipizacijska metoda na osnovi analize multilokusnih zaporedij (MLST). Ta metoda se od prej omenjenih metod razlikuje v tem, da uporablja nukleotidne spremembe zaporedij določenih genov, namesto velikosti fragmentov DNA za določanje genske sorodnosti (Foley in sod., 2009).

Metoda MLST se je razvila po načelih metode multilokusne encimske metode (MEE) (Maiden in sod., 1998). Razlikuje se v tem, da se pri metodi MLST direktno določijo nukleotidna zaporedja alelov za sedem do enajst hišnih genov. Pri metodi MEE se aleli določijo posredno preko elektroforetske mobilnosti. S kombinacijo alelov pri MLST dobimo določen profil, ki je enakovreden elektromorfu pri metodi MEE (Eberle in Kiess., 2012). Maiden s sod. (1998) so postavili osnovno shemo metode MLST za 107 sevov *Neisseria meningitidis*. Dingle s sod. (2001) je kot začetnik te metode uporabil metodo MLST za genotipizacijo *C. jejuni*. Miller (2005) je oblikoval razširjeno metodo MLST za *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* in *C. upsaliensis*.

MLST je genotipizacijska metoda, ki temelji na točkastih spremembah zaporedij nukleotidov (SNP-Single Nucleotide Polymorph) hišnih genov (Levesque in sod., 2011). Z metodo določimo nukleotidno zaporedje sedmih hišnih genov *aspA* (aspartaza A), *glnA* (glutamin sintetaza), *gltA* (citrata sintaza), *glyA* (serin hidroksimetil transferaza), *pgm* (fosfoglukomutaza), *tkt* (transketolaza) in *uncA* (ATP sintetaza). Ta zaporedja so ključna,

zato ker se pojavljajo v vseh sevih znotraj iste vrste in niso podvrženi selektivnim pritiskom, ki ponavadi povzročajo hitre spremembe nukleotidnih zaporedj. Kljub temu, da imajo hišni geni nizko stopnjo variabilnosti, so dovolj variabilni v smislu razlikovanja sevov.



Slika 1: Lokacije genskih lokusov na kromosomu, referenčnega seva *C. jejuni* NCTC 11168 (Dingle in sod., 2001).

Pomembna so variabilna zaporedja hišnih genov, ki se pojavljajo zaradi mutacij ali rekombinacij in prav ta zaporedja se uporabljajo za molekularno tipizacijo in določitev sorodnosti bakterij. Pri metodi MLST spremljamo nukleotidna zaporedja več genov. Prednosti metode MLST se kažejo v relativno hitrih rezultatih, dobri ponovljivosti in nedvoumnosti, uporabi standardne nomenklature, rezultati se lahko dodajajo v spletne baze podatkov, lahko se jih enostavno elektronsko izmenjuje znotraj laboratorija in med laboratoriji (Foley in sod., 2009). Ker za izvedbo ne potrebuje živih mikroorganizmov, ampak pomnožke PCR, je tudi zmanjšan prenos kultur med laboratoriji in posledično kontaminacije (Dingle in sod., 2001). Kljub večkratnemu izvajanju metode MLST v različnih laboratorijih ta metoda zagotavlja minimalne eksperimentalne razlike. Razlog je prav v tem, da metoda temelji na določanju nukleotidnega zaporedja (Griekspoor in sod., 2009). Prav tako se prednost uporabe metode MLST kaže v visoki moči razlikovanja med sevi in enostavnosti pri interpretaciji rezultatov (Dingle in sod., 2001). Uporablja se lahko tudi za mešane kulture, genske izmenjave in rekombinacije med *Campylobacter* spp. (Miller in sod., 2005).

Na svetovnem spletu je bila za številne bakterijske vrste narejena tako imenovana baza podatkov MLST (www.mlst.net) za hitro in olajšano izmenjavo rezultatov, ki jih dobimo pri analizi MLST. Uporabnik te baze lahko uporabi in primerja nukleotidna zaporedja s svojimi nukleotidnimi zaporedji. Podatkovno bazo MLST se lahko dopolni z nukleotidnimi

zaporedji, katera so nova oziroma še niso imele določenega alelnega tipa (Enright in Spratt., 1999).

2.3.2.4 Tipizacija MLST za *C. jejuni*

Pred kratkim razvit sistem MLST za *C. jejuni* kaže na to, da je ta vrsta gensko raznolika, z majhno klonsko populacijo, zaznamovano s pogostimi genskimi horizontalnimi prenosi znotraj vrste in med vrstami (Dingle in sod., 2001; Djordjevic in sod., 2007).

Klonski kompleks je definiran kot skupina, v katero spadajo sevi s sekvenčnimi tipi, ki imajo identične alele v štirih ali več lokusih (Dingle in sod., 2001). Razlika v enem baznem paru pri enem od sedmih alelov pri dveh izolatih povzroči, da imata izolata vsaki svoj sekvenčni tip (Behringer in sod., 2010).

Podatkovna baza MLST, dostopna na internetu (Jolley, 2012), prikazuje, da je klonski kompleks CC-21 največji kompleks *C. jejuni* in obsega približno 30 % vseh sekvenčnih tipov in 37 % vseh izolatov. Drugi najpogostejši klonski kompleks je CC-45, obsega približno 195 posameznih sekvenčnih tipov. V oba klonska kompleksa spadajo tisti izolati *C. jejuni*, ki povzročajo črevesne bolezni pri ljudeh in izhajajo iz različnih virov prehranjevalne verige (Habib in sod., 2010).

Odgovor na vprašanje, zakaj se metoda MLST ne uporablja rutinsko v veterinarskih in kliničnih laboratorijih, se najbrž skriva v tem, da je predraga za izvajanje, zahteva ustrezno opremo in strokovno znanje ter izkušnje, ki so potrebne za vrednotenje rezultatov (Djordjevic in sod., 2007).

Aleli vseh sekvenciranih genov se obravnavajo kot skupina in se jim dodeli določeni alelni tip. Rezultate MLST je mogoče analizirati z različnimi tehnikami. Ena pogostejših je BURSTOV-algoritem (Foley in sod., 2009). Ta posamezen lokus uvrsti v alelni tip določenega gena z določeno številko, nato iz kombinacije posameznih alelnih tipov te uvrsti v posamezne sekvenčne tipe (ST). Sekvenčne tipe nato razdeli v klonske komplekse (CC).

Pri preučevanju genetske povezanosti 266 izolatov živalskega in humanega izvora so Manning in sod. (2003) analizirali nukleotidna zaporedja običajnih hišnih genov, ki se ponavadi uporabljajo pri analizi MLST. V drugem poskusu so poleg običajnih genskih lokusov analizirali še gene *Cj1585c*, *pgi*, *ilvD*, *mdh*, *adk*. Rezultati so pokazali, da se je največ izolatov (42 %) prvega poskusa uvrstilo v ST-21 kompleks in največ izolatov drugega poskusa v ST-1 kompleks (63 %). Vsi izolati ST-21 kompleksa iz prvega poskusa so se uvrstili v ST-1 kompleks drugega poskusa.

Metoda MLST je zelo primerna za raziskovanje gostiteljev *C. jejuni*. Klonski kompleksi, v katere so najpogosteje uvrščeni humani izolati, so kompleks CC-21, kompleks CC-45 in kompleks CC-61 (Dingle in sod., 2002). Klonska kompleksa CC-21 in CC-45 se

najpogosteje pojavljata tudi pri sevih, izoliranih iz piščanca, goveda, vode, prosto živečih živali v naravi. CC-61 je pa tesno povezan z govejimi izolati (Colles in sod., 2003).

Nukleotidna zaporedja hišnih genov dokazujejo, da imajo horizontalni prenosi vpliv na strukturo populacije in razvoj bakterij rodu *Campylobacter* (Dingle in sod., 2001). Rezultati analize MLST (Djordjevic in sod., 2007), ki je bila opravljena na 171 izolatih humanega izvora, dokazujejo zelo veliko gensko raznolikost, ki je posledica pogostih rekombinacij znotraj vrste in rekombinacij med vrstami z majhno klonsko populacijo. Ugotovljeno je tudi bilo, da je klonski kompleks epidemiološko pomembna enota za dolgoročne in kratkoročne raziskave epidemij, ki jih povzroča *C. jejuni* (Djordjevic in sod., 2007).

Leta 2010 je bila na Kitajskem opravljena prva študija na 93 sevih *C. jejuni*, izoliranih iz ljudi in piščancev. Od teh je bilo 56 humanih, 7 humanih s Guillain-Barre sindromom in 30 izolatov piščančjega fecesa. Šestinpedeset izolatov se je razvrstilo v 14 klonskih kompleksov, 37 pa je ostalo nevrščenih. Najpogostejši sekvenčni tip je bil ST-21 z 11 izolati, sledil mu je ST-353 kompleks z 10 izolati in nato še ST-443 klonski kompleks s 6 izolati (Zhang in sod., 2010).

Za študijo 33 sevov *C. jejuni*, izoliranih iz psov, so Parsons in sod. (2009) uporabili dve tipizacijski metodi, PFGE in MLST. Izolate so dobili iz psov, ki so obiskali veterinarsko ambulanto in iz različnih legel psov. V ST-45 sekvenčni tip se je uvrstilo 45 izolatov, v ST-21 4 izolati, v ST-508 4 izolati in v ST-403 3 izolati. Izolatu s sekvenčnim tipom ST-2772, niso mogli določiti klonskega kompleksa. Rezultati obeh tipizacijskih metod so pokazale na skoraj enake rezultate, razlikujejo se le v enem primeru. Ugotovljeno je bilo, da so klonski kompleksi pasjih izolatov enaki klonskim kompleksom humanih izolatov. Kljub temu ni povsem jasno ali lahko to pomeni, da so imeli ljudje in psi skupni vir okužbe ali se je okužba prenašala iz človeka na psa ali pa iz psa na človeka (Parsons in sod., 2009).

Preizkušena je bila nova metoda visoko resolucijskega taljenja (HMR), ki ima potencial za dopolnitev metod, ki temeljijo na nukleotidnih zaporedjih. Ta metoda lahko razlikuje med spremembami posameznih baz. Uporablja se kot metoda za odkrivanje zamenjav, vključevanj ali izpadov nukleotidnih baz. Levesque in sod. (2011) so primerjali rezultate analize MLST 47 izolatov *C. jejuni* iz različnih virov in analize istih 47 izolatov z metodo HMR. Ugotovili so, da so bili rezultati analize HMR konsistentni z rezultati MLST. Rezultate so dobili hitreje in z nižjimi stroški. Pri tej metodi se z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času pomnoži del DNA. Ko je del DNA pomnožen, se natančno segreva DNA od 50 °C do 95 °C. Pri določeni temperaturi pride do prekinitve dvojnih in trojnih vodikovih vezi in do razklenitve DNA, kar odcepi fluorescenčno barvilo, ki je vezano v dvovijačno DNA. Metoda ima visoko občutljivost, zato sprememba enega nukleotida pomeni spremembo temperature taljanja. Za preverjanje pomnoženih delov

DNA ni potrebna gelska elektroforeza in tudi sekvence izolatov niso potrebne, saj so nukleotidno zaporedje pridobili iz analize MLST.

2.4 PRIMERJAVA METOD IN RAZISKA VE

V večjem številu študij o tipizaciji *Campylobacter* spp. z metodama PFGE in MLST je imela metoda PFGE večjo moč razlikovanja od MLST. Metodi MLST pa pripisujejo večjo učinkovitost za razumevanje celotne genetske strukture populacije bakterij rodu *Campylobacter*. Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij je na splošno sprejeta kot najbolj primerna metoda za populacijsko genetsko analizo *C. jejuni* (de Haan in sod., 2010b).

Za študij polimorfizma posameznih nukleotidov in označevanje bakterijskih sevov se uporablja analiza SNP, predvsem za molekularno subtipizacijo po Gramu negativnih bakterij. S preučevanjem tovrstnega polimorfizma se lahko ugotavlja sorodstvena razmerja med izolati. Zaradi genskih prenosov in mutacij lahko pride na določenih delih DNA do nukleotidnih sprememb in posledično pride do kodiranja drugačne aminokislina. Metoda za detekcijo SNP poteče tako, da se DNA inkubira z oligonukleotidnimi začetniki, nato peteče hibridizacija in hibridizacijski signal pokaže ali je določeni lokus polimorf. Če se izkaže, da je polimorf se določi nukleotidno zaporedje in pozicija v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do zamenjave nukleotida (Zhang in sod., 2006). Za izolate bakterij iz rodu *Campylobacter* so naredili tipizacijo s polimorfom enega nukleotida na specifičnih lokusih hišnih genov (*aspA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*). Ugotovili so, da če je analiza SNP kombinirana s sekvenciranjem kratke variabilne regije gena *flaA*, je diskriminatorni indeks podoben kot pri analizi MLST (Foley in sod., 2009).

V Grenadi so izvedli tipizacijo 56 izolatov *Campylobacter* iz slepega črevesa piščancev. Uporabili so mnogokratni PCR, *flaA*-RFLP, PFGE, MLST in kombinacijo *flaA*-RFLP, PFGE in MLST. Rezultate so vrednotili s Simpsonovim indeksom diverzitete (Miller in sod., 2009). Simpsonov indeks predstavlja verjetnost, da imata dva posamezna izolata, vzeta iz naključne populacije določene skupine, drugačen klonski kompleks. Izračuna se po enačbi:

$$D = \frac{\sum n(n-1)}{N(N-1)} \quad \dots (1)$$

Oznaka n je število izolatov z določenim klonskim kompleksom in N število vseh izolatov, tudi tistih, ki nimajo določenega klonskega kompleksa. Vrednosti so med 0 in 1. Vrednost 0 pomeni, da ni diverzitete. Vrednost 1 predstavlja neskončno diverzitetu (Kwan in sod., 2008).

Pri tipizacijski metodi *flaA*-RFLP za 14 izolatov je bila vrednost Simpsonovega indeksa 0,8741, pri MLST za 12 izolatov 0,8636, PFGE za 19 izolatov 0,9061. Pri kombinaciji

vseh treh metod za 42 izolatov je bil najvišji in je znašal 0,9857. Med izolati je prevladoval *C. coli*, sledil mu je *C. jejuni* (Miller in sod., 2009).

Prva raziskava genske povezanosti in raznolikosti pri enem izmed možnih virov okužbe je bila izvedena z metodo MLST, na 297 izolatih iz govejega fecesa iz leta 2003. Raziskava je potekala v istem geografskem območju v Veliki Britaniji na petih kmetijah v Cheshire v letu 2003. S pomočjo uporabe metode MLST so dokazali povezave med sevi *C. jejuni* izoliranih iz živine in ljudi. Pojavile so se tri največje klonske linije, kompleks CC-61 (24,2 %), CC-21 (23,6 %) in CC-42 (20,5 %). Preučili so tudi prevalenco, ki je bila najnižja na začetku leta, postopoma se je povečevala od marca do maja in dosegla vrh v juniju (50,8 %), nato je prišlo v naslednjem mesecu do padca na 26,4 % in ponovnega viška v novembru (43,9 %) (Kwan in sod., 2008).

Študija, v katero so vključili 19 izoliranih sevov iz piščančjega mesa *C. jejuni*, je prikazala vpliv toplotnih, oksidativnih, kislih stresnih pogojev ter stresnih pogojev zamrzovanja na preživetje. Ugotovljeno je bilo, da izolati, uvrščeni v CC-21, bolje preživijo toplotni in hladni stres od izolatov, uvrščenih v CC-45. Za oksidativni stres in stres zamrzovanja velja obratno (Habib in sod., 2010).

V raziskavi, ki jo je opravil Dingle s sod. (2001), je bila narejena tipizacija 194 izolatov *C. jejuni*. Klonski kompleks z največjim številom pripadajočih izolatov je bil kompleks CC-21. Vanj se je uvrstilo 56 izolatov, od tega jih je bilo 27 humanih, 14 prašičjih, 7 izoliranih iz peska, 3 goveji in 3 iz mleka. Drugi največji klonski kompleks je bil CC-45. Če primerjamo to raziskavo še z raziskavo, ki je potekala na Švedskem (Griekspoor in sod., 2009) in z raziskavo iz Finske (de Haan, 2010a), ugotovimo, da se je v vseh treh raziskavah pojavljal klonski kompleks CC-21 kot največji z največjim številom izolatov. V raziskavi iz Finske sta bila vključena 102 izolata, izolirana iz goveda. V kompleks CC-21 se je uvrstilo 22 izolatov. Drugi največji klonski kompleks je bil CC-45 s sedmimi izolati. Na Švedskem je potekala tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij 99 piščančjih izolatov, od katerih se jih je 28 uvrstilo v kompleks CC-21, v kompleks CC-45 pa 21 izolatov. Tudi v tem primeru je bil kompleks CC-45 drugi največji kompleks (Dingle in sod., 2001; de Haan in sod., 2010b; Griekspoor in sod., 2009). Za države Evrope velja, da se klonska kompleksa CC-21 in CC-45 pojavljata največkrat in sta tudi največja (Korczak in sod., 2009).

V študiji, ki jo je opravil Sails in sod. (2003), so uporabljali kombinacijo metode MLST, skupaj s sekvenciranjem kratke variabilne regije gena *flaA*. Preučevali so 47 izolatov *C. jejuni* iz 12 izbruhov kampilobakterioz. To kombinacijo so uporabili za preučevanje izbruhov bolezni pri ljudeh in za preučevanje genske raznolikosti *C. jejuni*. Ker prihaja v kratki variabilni regiji (SVR) do znotrajgenskih in medgenskih rekombinacij, je lahko tipizacija s *flaA* brez kombinacije z analizo MLST neprimerna za raziskovanje epidemije. V 10 od 12 primerov izbruha je prišlo do pravilne tipizacije. Dokazano je tudi bilo, da je

kombinacija obeh metod uporabnejša v smislu razlikovanja sevov od metode PFGE (Sails in sod., 2003).

V objavljeni študiji, ki je potekala na Islandiji (Magnússon in sod., 2011), so za tipizacijo 584 izolatov iz različnih virov, uporabili metode MLST, PFGE in sekvenciranj kratke variabilne regije gena *flaA*. Glavni cilj je bil identifikacija izolatov *C. jejuni* iz različnih živali, okolja in živilskih proizvodov in primerjava izolatov z izolati, ki so bili izolirani iz okuženih ljudi za identifikacijo poti prenosa. Eden od namenov je bil tudi pridobiti boljši vpogled v populacijo *Campylobacter* spp. v Islandiji. Izolati so bili zbrani od maja 1999 do avgusta 2002. Od 314 humanih kliničnih izolatov pridobljenih iz bolnikov, ki niso potovali, je bilo 275 izolatov domačih ljudi in 39 bolnikov, ki so bili na mednarodnih potovanjih. Poleg tega je bilo 270 izolatov, ki izvirajo iz ptic, 140 iz piščancev, 14 iz rac, 2 iz gosi, 3 iz purana, 66 iz goveda, 15 iz ovc, 6 iz prašičev, 1 iz psa, 22 iz okolja-6 iz tal in 6 iz rek. Rezultati analize MLST so prikazali uvrščenost vseh humanih izolatov in 87% piščančjih izolatov v klonske komplekse CC-45, CC-21, CC-48, CC-206. Ostali piščančji izolati so se uvrstili v klonske komplekse CC-61, CC-677 in CC-1287. Izolati iz okolja so bili uvrščeni v klonske komplekse CC-682, CC-1287, CC-177, CC-215 in ni bilo nobenih povezav s humanimi in piščančjimi izolati, medtem ko so med humanimi in piščančjimi izolati vidne povezave pri petih od devetih klonskih kompleksov.

Z metodo PFGE so določili pri 52 izolatih 13 profilov PFGE, z metodo MLST se je 21 izolatov od 52 uvrstilo v CC-21. Z metodo *fla*-SVR pa so med 50 izolati določili 18 profilov. Diskriminatorni indeks se je gibal med 0,875 za MLST do 0,909 za *fla*-SVR sekvenciranje in 0,886 za PFGE. Pri metodi MLST z vključitvijo alela *fla*-SVR kot osmega lokusa se je diskriminatorni indeks povečal na 0,953 (Magnússon in sod., 2011).

V Oxfordshire v Veliki Britaniji so z analizo MLST tipizirali 620 izolatov, od tega jih je bilo 584 humanih. Izolati so bili izolirani od septembra 2003 do septembra 2004. MLST je potekal na desetih lokusih. Zraven običajnih hišnih genov so vključili še gene *porA*, *flaA* in *flaB*. S tem so povečali diskriminatorni indeks iz 0,975 na 0,992 (Dingle in sod., 2008).

V študiji iz Nove Zelandije so tipizirali 261 izolatov iz piščančjega mesa, goveda, prašičev, rac, ovac, vode in ljudi z metodama, PFGE in MLST. Pri tipizaciji MLST je bilo odkritih 32 novih alelov (9 *aspA*, 5 *glnA*, 2 *gltA*, 4 *glyA*, 7 *pgm*, 2 *tkt* in 3 *unca*) in 44 sekvenčnih tipov. Pri primerjavi MLST in PFGE so ugotovili, da se makrorestrikcijski profili ujemajo s klonskimi kompleksi, ne pa tudi s sekvenčnimi tipi (McTavish in sod., 2009).

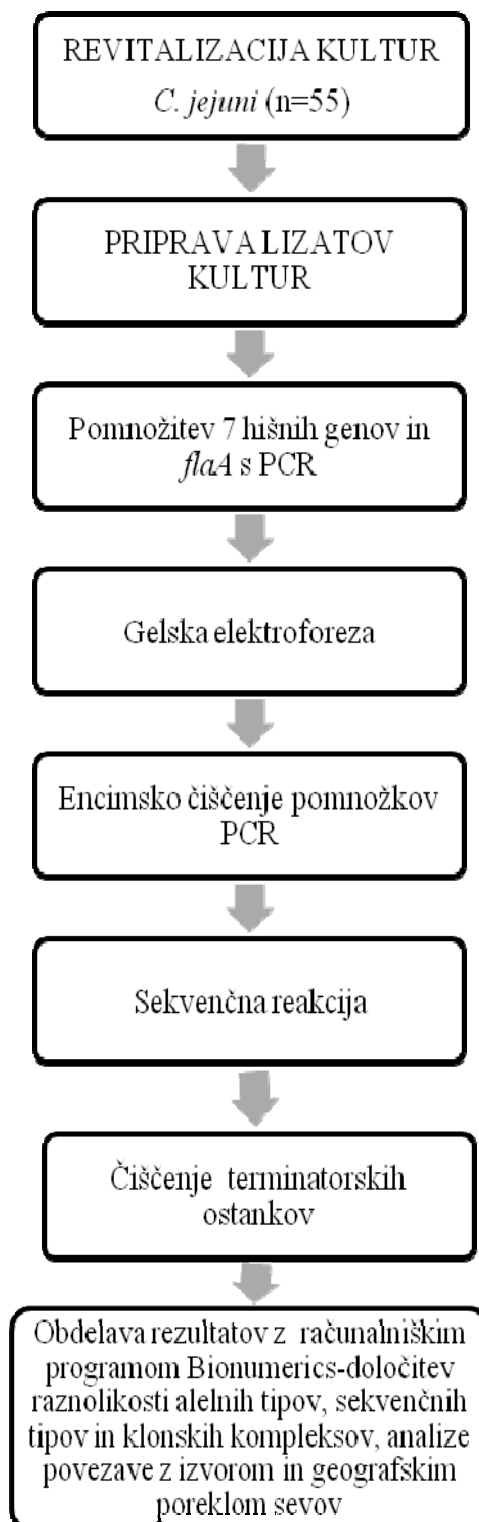
2.5 DOLOČANJE IZVORA SEVOV *Campylobacter jejuni*

Težko je določiti vire prenosa okužb s *C. jejuni* iz rezervoarja na ljudi, predvsem zaradi visoke stopnje genetske raznolikosti, pogostosti rekombinacij med sevi *C. jejuni* in zaradi široke distribucije. Za identifikacijo poti prenosa, je potrebna zanesljiva metoda za natančno diferenciacijo sevov (Magnússon in sod., 2011).

Povezava med izvorom in klonskim kompleksom, ki se določi z analizo MLST, lahko pomeni, da so izolati iz enega klonskega kompleksa prilagojeni posamezni niši zaradi selektivnega pritiska (Dingle in sod., 2002).

V študiji Zautnerja in sod. (2011) so uporabili genetske označevalce za pomoč pri sledenju izvora epidemije. Zanimalo jih je, če obstaja povezava med genotipi in izvori izolatov. Preučevali so 266 sevov *C. jejuni*, izoliranih iz ljudi, piščancev, goveda in purana. Uporabljali so metodo MLST skupaj z genetskimi markerji *ansB*, *dmsA*, *GGT*, *cj1585c*, *cj1176-1367/71* in dvogenski marker *tlp7* (*cj0951c* in *cj0952c*). Rezultati so pokazali povezave med genetskimi markerji in klonskimi kompleksi MLST. *AnsB*, *dmsA* in *GGT* so bili v povezavi s klonskimi kompleksi CC-22, CC-42, CC-45, CC-283, iz piščančjih izolatov. *Cj1585c* in *cj1176-1367/71* in dvogenski marker *tlp7* so bili povezani s kompleksi CC-21, CC-61 in CC-53 govejih izolatov (Zautner in sod., 2011).

3 MATERIALI IN METODE



Slika 2: Shema eksperimentalnega dela.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Mikroorganizmi

Za tipizacijo *Campylobacter jejuni* smo uporabili izolate iz različnih virov in različnih lokacij. Sevi so bili izolirani iz piščančjega in puranjega mesa, vode ter puranjega, govejega, piščančjega in človeškega fecesa. Sevi so del zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete, prvotno pa so bili pridobljeni iz Zavoda za zdravstveno varstvo Maribor, Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani in Kantonalnega Laboratorija za javno zdravstvo Zenica, Bosna in Hercegovina.

Sevi so bili trajno shranjeni pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v zaščitnem gojišču BHI z dodatkom glicerola in defibrinirane konjske krvi.

3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Selektivni krvni agar Columbia

Za revitalizacijo zamrznjenih kultur smo uporabili selektivni krvni agar Columbia, ki je sestavljen iz:

- osnovnega medija (Oxoid, CM331),
- dodatka za rast (Oxoid, SR0232E),
- dodatka za selektivnost (Oxoid, SR0069E),
- sterilne defibrinirane konjske krvi (Oxoid, SR0048C) in
- destilirane vode.

Preglednica 1: Sestava osnovnega medija krvnega agarja Columbia.

Sestavina	Količina (g/l)
Pepton	23,0
Škrob	1,0
Natrijev klorid	5,0
Agar	10,0

Preglednica 2: Sestavine dodatka za rast (Oxoid, SR023E).

Sestavina	Količina (g/l)
Natrijev prituvat	250,0
Natrijev metabisulfat	250,0
Železov sulfat	250,0

Preglednica 3: Sestavine dodatka za selektivnost (Oxoid, SR069).

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

V 500 ml destilirane vode smo vmešali 19,5 g osnovnega gojišča Columbia krvni agar. Gojišče smo nato sterilizirali 20 minut pri $121\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po končani sterilizaciji smo gojišče

ohladili na 50 °C in šele nato dodali eno ampulo dodatka za selektivnost Oxoid, SR0069E, eno ampulo dodatka za rast Oxoid SR0232R in 25 ml defibrirane konjske krvi Oxoid SR0048C. Gojišče z vsemi potrebnimi dodatki smo v brezprašni komori razlili v petrijeve plošče.

Gojišče za zamrzovanje (BHI)

Za shranjevanje izolatov *C. jejuni* na -80 °C smo uporabili gojišče BHI, ki je sestavljeno iz:

- osnovnega medija Brain Heart Infusion (Oxoid CM0375),
- sterilne defibrirane konjske krvi (Oxoid, SR048C),
- glicerola (Merck, 356350) in
- destilirane vode.

Preglednica 4: Sestavine osnovnega medija Brain Heart Infusion.

Sestavina	Količina (g/l)
Trdne telečjega možganskega izvlečka	12,5
Trdne govejega srčnega izvlečka	5,0
Proteozni pepton	10,0
Natrijev klorid	5,0
Glukoza	2,0
Dinatrijev fosfat	2,5
Agar	10,0

Preglednica 5: Sestavine gojišča za zamrzovanje.

Sestavine	Količina (ml)
Gojišče BHI	0,6
Defibrirana konjska kri	0,2
Glicerol	0,2

Gojišče smo pripravili tako, da smo v 1000 ml vode vmešali 47 g osnovnega gojišča BHI. Gojišče smo sterilizirali 20 minut pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo, smo v posamezno krio epruveto aseptično odpipetirali 0,6 ml gojišča BHI, 0,2 ml defibrirane konjske krvi in 0,2 ml glicerola.

3.1.3 Reagenti

Reagenti za PCR

Mešanica za PCR je bila sestavljena iz:

- pufra PCR,
- dNTP,
- polimeraza *Taq* (5U/μl),
- šestnajst začetnih oligonukleotidov
- bidestilirane vode za PCR.

Preglednica 6: Sestava mešanice PCR

Sestavina	Proizvajalec	Začetna koncentracija	Končna koncentracija	Za 1 vzorec (µl)
puffer PCR	Promega, ZDA	5,0 x	1,0 x	6,0
MgCl ₂	Promega, ZDA	25 mM	2,0 mM	2,4
dNTP	Sigma, ZDA	2.5 mM	0,2 mM	2,4
bidestilirana voda	Qiagen, 129115			16,6
5U/µl <i>Taq</i> polimeraze	Promega, ZDA	5U/ µl	0,5 U/µl	0,25

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi v založni koncentraciji 100 µM (Sigma).

Oligonukleotid	Ime oligonukleotida	Sekvence (5'-3')	Velikost (bp)
aspA	asp-F_A9 asp-R_A10	AGTACTAATGATGCTTATCC ATTTTCATCAATTTGTTCTTTGC	899
glnA	glnA-F_A1 glnA-R_A2	TAGGAACCTGGCATCATATTACC TTGGACGAGCTTCTACTGGC	1262
gltA	gltA-F_A1 gltA-R_A2	GGGCTTGACTTCTACAGCTACTTG CCAAATAAAGTTGTCTTGGACGG	1012
glyA	glyA-F_A1 glyA-R_A2	GAGTTAGAGCGTCAATGTGAAGG AAACCTCTGGCAGTAAGGGC	816
pgm	pgm-F_A7 pgm-R_A8	TACTAATAATATCTTAGTAGG CACAAACATTTTCATTTCTTTTC	1150
tkt	tkt-F_A3 tkt-R_A6	GCAAACCTCAGGACACCCAGG AAAGCATTGTTAATGGCTGC	1102
uncA	uncA-F_A7 unc-R_A8	ATGGACTTAAGAATATTATGGC ATAAATTCATCTTCAAATTCC	1120
flaA	flaA_Cje-F flaA_Cje-R	TAATACTTTAGGTCAAGCTATATC CCAAGWCCTGTTCCWACTGAAG	471

Za pripravo oligonukleotidov v založni koncentraciji 100 µM, smo k 90 µl bidestilirane vode dodali 10 µl začetnega oligonukleotida.

Reagenti za gelsko elektroforezo

Agarozni gel:

Agarozni gel, ki smo ga uporabljali za gelsko elektroforezo, je bil 1,5 %. Pripravili smo ga iz 2,7 g agaroze za rutinsko uporabo (Sigma Aldrich) in 180 ml 1x TAE pufra.

Puffer TAE:

Preglednica 8: Sestava 50 x pufra TAE.

Sestavina	Količina
Tris baza	121 g
Ocetna kislina	28,55 ml
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	18,6 g
dH ₂ O	do 500 ml

Tris bazo, očetno kislino, Na₂EDTA x 2H₂O smo raztopili s pomočjo magnetnega mešala v 400 ml destilirane vode. Z očetno kislino smo uravnali pH na 8,1 in šele nato dolili destilirano vodo do 500 ml. Puffer smo sterilizirali 20 minut pri 121 °C.

Priprava 1 x pufer TAE :

V steklenico smo nalili 20 ml 50 x TAE pufera, ki smo si ga predhodno pripravili in destilirano vodo do oznake enega litra.

Preglednica 9: Sestava 1 x pufer TAE.

Sestavina	Količina
50 x pufer TAE	20 ml
dH ₂ O	980 ml

Raztopina etidijevega bromida:

Uporabljali smo raztopino etidijevega bromida s koncentracijo 0,5 µg/ml.

Molekulski označevalec dolžin pomnožkov DNK-100 baznih parov

Preglednica 10: Sestava molekulskega označevalca dolžin pomnožkov-100 baznih parov.

Sestava	Količina
Nanašalni pufer	10 µl
Voda za PCR	35 µl
100 bp DNK lestvica	10 µl

V mikrocentrifugirki smo zmešali nanašalni pufer, vodo za PCR in 100 bp DNK-lestvico ter s pomočjo vrtinčnika vsebino mikrocentrifugirke dobro premešali.

Reagenti za encimsko čiščenje pomnožkov PCR

- Alkalna fosfataza (Fermentas),
- 10 x SAP-defosforilacijski pufer (Fermentas),
- Eksonukleaza I (New England Biolabs).

Preglednica 11: Sestava mešanice ExoISAP za čiščenje pomnožkov PCR.

Sestavina	Količina (µl)
Shrimp alkalna fosfataza	150
10 x SAP-defosforilacijski pufer	30
Eksonukleaza I	7,5

Mešanico ExoISAP za čiščenje pomnožkov PCR smo pripravili v mikrocentrifugirki iz 150 µl Shrimp alkalne fosfataze, 30 µl 10 x SAP-defosforilacijskega pufera in 7,5 µl eksonukleaze. Mikrocentrifugirko smo na kratko centrifugirali.

Reagenti mešanice za sekvenciranje

- Polimeraza BigDye v3.1 (AB-Applied Biosystems),
- 5 x BigDye pufer za sekvenciranje (AB-Applied Biosystems),

- Bidestilirana voda,
- Začetni oligonukleotidi.

Preglednica 12: Sestava mešanice za sekvenciranje za 1 reakcijo.

Sestavina	Proizvajalec	Za 1 vzorec (µl)
BigDye v 3.1	AB-Applied Biosystems, ZDA	1,0
5x BigDye pufer za sekvenciranje	AB-Applied Biosystems, ZDA	2,0
Bidestilirana H ₂ O	Sigma, ZDA	5,2
Vsota		8,2

Mešanico za sekvenciranje smo pripravili za 96 reakcij v mikrocentrifugirki iz 200 µl 5 x BigDye pufera za sekvenciranje in 520 µl bidestilirane vode ter na koncu dodali 100 µl polimeraze BigDye 3.1.

Preglednica 13: Začetni oligonukleotidi za sekvenciranje.

Oligonukleotid	Ime oligonukleotida	Sekvence (5'-3')	Velikost (bp)
aspA	aspA_Cjc-L (1)	CAACTKCAAGATGCWGTACC	594
	aspA_Cjc-R (2)	ATCWGCTAAAGTATRCATTGC	
glnA	GlnA_Cjc-L (7)	ACWGATATGATAGGAACTTGGC	712
	GlnA_Cjc-R (8)	GYTTTGGCATAAAAAGTKGCAG	
gltA	gltA_Cjc-L (9)	TATCCTATAGARTGGCTTGC	567
	gltA_Cjc-R (10)	AGCGCWCCAATACCTGCTG	
glyA	glyA_Cjc-R(11)	AGGTTCTCAAGCTAATCAAGG	701
	glyA_Cjc-L (12)	CATCTTTTCCRCTAAAYTCACG	
pgm	Pgm_Cjc-L (5)	GCTTATAAGGTAGCWCKACTG	685
	Pgm_Cjc-R (6)	AATTTTCHGTTCCAGAATAGCG	
tkt	Tkt_Cjc-L (13)	AAAYCCMACTTGGCTAAACCG	606
	Tkt_Cjc-R (14)	TGACTKCCTTCAAGCTCTCC	
uncA	uncA_Cjc-R (3)	CAAAGCAAAGYACAGTGGC	623
	uncA_Cjc-L (4)	CTACTTGCCTCATCYAAATCAC	
flaA	flaA_Cjc-L (15)	TAATACTTTAGGTCAAGCTATATC	471
	flaA_Cjc-R (17)	CCAAGWCCTGTTCCWACTGAAG	

Reagenti za končno čiščenje pomnožkov

- X Terminator™ Solution (AB-Applied Biosystems),
- SAM™ Solution (AB-Applied Biosystems).

Preglednica 14: Sestava mešanice za končno čiščenje pomnožkov za eno reakcijo.

Sestavina	Količina (µl)
SAM™ Solution	45
X Terminator Solution	10

V mikrocentrifugirki smo si pripravili mešanico za 96 reakcij oziroma za celotno mikrotitrsko ploščico, sestavljeno iz 4410 µl raztopine SAM™ Solution in 980 µl raztopine XT.

3.1.4 Laboratorijska oprema in materiali

Laboratorijski material:

- Halja;
- Rokavice;
- Avtomatske pipete (Gilson, Eppendorf);
- Multikanalna avtomatska pipeta (Eppendorf);
- Nastavki za avtomatske pipete (Gilson, Eppendorf);
- Petrijeve plošče;
- Mikrotitrne plošče;
- Plastične cepilne zanke (Labortechnika, Golias);
- 1,5 mililitrske centrifugirke (Sarstedt);
- Krioopravete (Plastibrand);
- Laboratorijske steklenice (Duran);
- Merilni valj;
- Stojala za mikrocentrifugirke;
- Vrečke za mikroaerofilno atmosfero (Biomérieux);

Laboratorijska oprema:

- Plinski gorilnik;
- Brezprašna komora (PIO, SMBC 122AV);
- Brezprašna komora za pripravo mešanice za PCR (Holten LaminAir);
- Naprava za PCR (Applied Biosystem 270 Thermal Cycler.; Bio Rad – iCycler);
- Tehnica (Mettler Toledo, PB1502-S);
- Digestorij;
- Avtoklav (Sutjeska, SU 30);
- Centrifuga (Eppendorf, MiniSpin plus);
- Vodna kopel (Kambič, WB-30);
- Inkubator (Kambič, 42 °C);
- Anaerobni lonci (Oxoid, Ago 25A);
- Hladilnik (Gorenje, Bosch, Zanussi);
- Zamrzovalnik –80 °C (Heto Ultra Freeze);
- Mikrovalovna pečica (Sanyo);
- Banjice za elektroforezo (Bio Rad);
- Generator za elektroforezo (Bio Rad);
- Fotoaparati za fotografiranje obarvanega agaroznega gela (Canon);
- Komora za fotografiranje obarvanega agaroznega gela (BioRad);
- Magnetno mešalo;
- Muha za magnetno mešalo;
- Vrtinčnik (Yellowline, TTS2);

- Programska oprema: MS Excel, QuantityOne(BioRad), GelCompar II, (Applied Maths), Sequencing scanner, BioNumerics v. 6.1 (Applied Maths));
- Sekvenator AB Applied Biosystem 3130xl Genetic Analyzer;

3.2 METODE DELA

3.2.1 Revitalizacija kultur

Revitalizacija kultur je potekala v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo na Biotehniški fakulteti. Kulture so bile shranjene v gojišču za zamrzovanje pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

S cepilno zanko smo iz krioepruvetke prenesli kulturo na selektivni krvni agar Columbia in jo aseptično nacepili. Inkubacija plošč je potekala 24 ur v anaerobnem loncu v mikroaerofilni atmosferi (5 % O_2 , 10 % CO_2 , 85 % N_2) v inkubatorju pri $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mikroaerofilne pogoje smo zagotovili z vrečkami za vzpostavitev anaerobne oziroma mikroaerofilne atmosfere (Oxoid).

3.2.2 Priprava lizatov – PREPMAN PrepMan Ultra® (Applied Biosystems)

Lizate kultur smo pripravljali z reagentom PrepMan® (Applied Biosystems) po navodilih proizvajalca. V 2 mililitrsko mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100 μl sterilne bidestilirane vode. Nato smo s cepilno zanko aseptično dodali nekaj kolonij 24 ur stare kulture, ki je zrasla na selektivnem krvnem agarju Columbia in jih resuspendirali z mešanjem na vrtinčniku 30 sekund. Nato smo vsebino centrifugirali 5 minut pri 13.000 obratov/minuto. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in v mikrocentrifugirko dodali 100 μl reagenta PrepMan Ultra®. Suspenzijo smo mešali na vrtinčniku 30 s. Mikrocentrifugirko smo inkubirali v vodni kopeli pri $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 minut. Nato smo jo 2 minuti hladili na sobni temperaturi. Naslednji korak je bil ponovna triminutna centrifugacija pri 13.000 obratov/minuto. Po centrifugiranju smo prenesli supernatant v novo sterilno mikrocentrifugirko z volumnom 0,5 ml.

3.2.3 Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij - analiza MLST

3.2.3.1 Verižna reakcija s polimerazo - PCR

Pripravili smo oligonukleotidne začetnike po navodilih proizvajalca (Sigma) in mešanico za PCR iz PCR-pufra (Promega, ZDA), MgCl_2 (Promega ZDA), vode PCR in Taq polimeraze (Promega, ZDA).

Oligonukleotidne začetnike, mešanico PCR in DNA (lizati kultur) smo nanесли v luknjice na mikrotitrski ploščici.

Preglednica 15: Sestava in količina, potrebna za izvedbo PCR za 1 reakcijo.

Reagenti	Količina (μ l/1 vzorec)
DNA	0,5
Oligonukletidni začetniki	2
Mešanica PCR	27,5
Vsota	30

Sevi	1. izolat	2. izolat	3. izolat	4. izolat	5. izolat	6. izolat	7. izolat	8. izolat	9. izolat	10. izolat	11. izolat	12. izolat
A	fla	fla	fla	fla	fla	fla	fla	fla	fla	fla	fla	fla
B	asp	asp	asp	asp	asp	asp	asp	asp	asp	asp	asp	asp
C	pgm	pgm	pgm	pgm	pgm	pgm	pgm	pgm	pgm	pgm	pgm	pgm
D	tkt	tkt	tkt	tkt	tkt	tkt	tkt	tkt	tkt	tkt	tkt	tkt
E	gln	gln	gln	gln	gln	gln	gln	gln	gln	gln	gln	gln
F	glt	glt	glt	glt	glt	glt	glt	glt	glt	glt	glt	glt
G	unc	unc	unc	unc	unc	unc	unc	unc	unc	unc	unc	unc
H	gly	gly	gly	gly	gly	gly	gly	gly	gly	gly	gly	gly

Slika 3: Shema mikrotitrne ploščice za PCR.

Mikrotitrsko ploščico smo prenesli v napravo za PCR in nastavili program za pomnoževanje.

Stopnja začetne denaturacije je tekla 9 minut pri 96 °C. Srednje reakcije so stekle 30 x po programu 30-sekundne denaturacije pri 94 °C, 30-sekundne vezave začetnih oligonukleotidov pri 52 °C in 60-sekundnega podaljševanja pri 72 °C. Končno podaljševanje je potekalo 7 minut pri 72 °C. Zadnja stopnja programa je bilo ohlajanje na 4 °C.

3.2.3.2 Gelska elektroforeza

Velikosti pomnožkov PCR smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo v 1,5 % gelu, v katerega smo nanašali PCR-pomnožke, ki smo jih predhodno razredčili z mešanico vode za PCR in nanašalnega pufra. Elektroforeza je potekala 30 minut pri 180 V.

Po končani elektroforezi smo gel prenesli v raztopino etidijevega bromida, ki se je vgradil v baze dvojne vijačnice DNK in nato pod svetlobo UV spektra fluorescira. Iz prepotovane razdalje smo s pomočjo molekulskega označevalca dolžin pomnožkov DNK-100 bp ocenili velikosti PCR-pomnožkov.

3.2.3.3 Čiščenje pomnožkov PCR z encimi

Pomnožke PCR smo na koncu encimsko očistili z ExoSAP-IT in s tem odstranili odvečne oligonukleotidne začetnike in dNTPje. Encimsko čiščenje smo izvedli v mikrotitrski ploščici. V vsako luknjo smo vnesli 2,0 μ l ExoSAP mešanice in 6 μ l PCR-pomnožka.

Sledila je toplotna inkubacija po protokolu proizvajalca sestavljenega iz treh korakov. Prvi korak traja 45 minut, ko poteče razgradnja enoverižne verige DNK. Drugi korak je inaktivacija encimov pri 80 °C in traja 20 minut. Zadnji korak je ohlajanje na 4 °C.

3.2.3.4 Določanje nukleotidnega zaporedja

Sekvenciranje je potekalo v laboratoriju za sekvenciranje na Statens Serum Institutu v Kopenhagnu na Danskem v okviru projekta »Biotracer«, kjer sta kot partnerja sodelovala Biotehniška fakulteta in omenjeni inštitut.

Pripravljene smo imeli oligonukletotidne začetnike s koncentracijo 5 µM. Naredili smo sekvenčno mešanico iz 5 x BigDye pufru za sekvenciranje, polimeraze BigDye v 3.1 in bidestilirane vode. Za vsako sekvenčno reakcijo v posamezni jamici mikrotitrne ploščice smo dodali 8,2 µl mešanice za sekvenciranje, 0,8 µl začetnih oligonukleotidov in 1,0 µl pomnožka PCR.

Reakcija je potekala v napravi za PCR po programu: začetna denaturacija je trajala 10 s na 96 °C, naleganje oligonukleotidnih začetnikov 5 s na 50 °C in podaljševanje verige 1 minuto na 60 °C. Cikel smo ponovili 25-krat. Zadnji korak je bil, ohlajanje na 4 °C.

Preglednica 16: Sestava in količina sekvenčne mešanice, potrebne za 1 sekvenčno reakcijo.

Reagenti	Količina (µl/1 vzorec)
DNK (EXO-SAP PCR pomnožek)	0,75
Oligonukletidni začetniki	0,8
Mešanica za sekvenciranje	8,2
Vsota	9,75

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	flaA-L	flaA-R	flaA-L	flaA-R	flaA-L	flaA-R	flaA-L	flaA-R	flaA-L	flaA-R	flaA-L	flaA-R
B	aspA-L	aspA-R	aspA-L	aspA-R	aspA-L	aspA-R	aspA-L	aspA-R	aspA-L	aspA-R	aspA-L	aspA-R
C	pgm-L	pgm-R	pgm-L	pgm-R	pgm-L	pgm-R	pgm-L	pgm-R	pgm-L	pgm-R	pgm-L	pgm-R
D	tkt-L	tkt-R	tkt-L	tkt-R	tkt-L	tkt-R	tkt-L	tkt-R	tkt-L	tkt-R	tkt-L	tkt-R
E	glnA-L	glnA-R	glnA-L	glnA-R	glnA-L	glnA-R	glnA-L	glnA-R	glnA-L	glnA-R	glnA-L	glnA-R
F	gltA-L	gltA-R	gltA-L	gltA-R	gltA-L	gltA-R	gltA-L	gltA-R	gltA-L	gltA-R	gltA-L	gltA-R
G	uncA-L	uncA-R	uncA-L	uncA-R	uncA-L	uncA-R	uncA-L	uncA-R	uncA-L	uncA-R	uncA-L	uncA-R
H	glyA-L	glyA-R	glyA-L	glyA-R	glyA-L	glyA-R	glyA-L	glyA-R	glyA-L	glyA-R	glyA-L	glyA-R

Slika 4: Shema mikrotitrne ploščice za sekvenciranje.



Slika 5: Naprava za PCR, AB Applied Biosystems 270 Thermal Cycler.

3.2.3.5 Končno čiščenje pomnožkov pred sekvenciranjem

Uporabili smo raztopino XTerminator™ Solution (AB-Applied Biosystems), ki odstranjuje soli in SAM™ Solution (AB-Applied Biosystems), ki stabilizira reakcije po čiščenju in izboljša delovanje prve raztopine. Napolnjeno mikrotitrsko ploščo smo dali na mešalnik za 30 min in nato v centrifugo za 2 minuti na 1800 obratov/minuto.

3.2.3.6 Avtomatska kapilarna elektroforeza

Nukleotidno zaporedje smo določili z avtomatsko kapilarno elektroforezo (ABI3130XL). Kapilarna elektroforeza poteka po principu elektrokinetike. Metoda ima visoko ločljivost, saj omogoča razlikovanje med fragmenti DNA, ki se razlikujejo v dolžini enega baznega para. Produkta PCR injiciramo v kapilaro, ki je napolnjena s polimerom. DNA, ki je negativno nabita, potuje po kapilari zaradi električnega polja proti anodi, in sicer krajši fragmenti potujejo hitreje od daljših. Fragmente nato detektiramo s pomočjo fluorescence, kajti začetni oligonukleotidi so označeni s fluorokromi (Fourney, 2002).



Slika 6: Sekvenator AB Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzer.

3.2.3.7 Obdelava podatkov z računalniškim programom Bionumerics® - analiza MLST

Po končanem sekvenciranju smo dobljene sekvence analizirali z računalniškim programom Bionumerics 6.6 (Applied-Maths). Na podlagi sekvenc je program najprej določil alelne tipe, glede na podatkovno bazo. Povezave v podatkovno bazo najdemo na medmrežju (Jolley, 2012). Alelni tip je program določil vsakemu hišnemu genu za vsak sev posebej. Nato je na podlagi teh dodeljenih alelnih tipov program določil sekvenčni tip seva in klonski kompleks za vsaki sev. Z vnaprej določenimi ukazi je računalniški program avtomatsko določil ST in CC.

Nato smo z metodo UPMGA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) izrisali dendrogram glede na izvor in dendrogram glede na lokacijo. Za hišni gen *flaA* smo posebej izrisali dendrogram, saj ta gen ni vključen v samo analizo MLST.

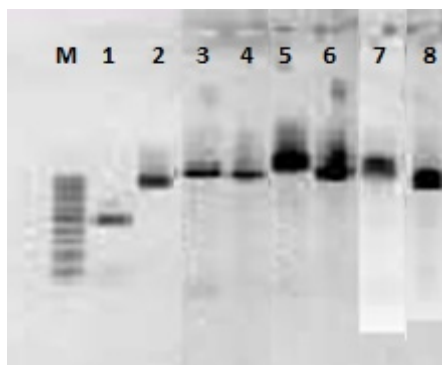
4 REZULTATI

Eksperimentalno delo je potekalo v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo in v Genskem laboratoriju Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete v času od novembra 2010 do februarja 2011 ter na Statens Serum Institutu v Kopengahnu februarja 2010. Obdelava podatkov je potekala do julija 2011.

4.1 POMNOŽEVANJE MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ HIŠNIH GENOV *Campylobacter jejuni* Z METODO PCR

Z verižno reakcijo s polimerazo smo pomnoževali hišne gene *aspA* (aspartaza A), *glnA* (glutamin sintetaza), *gltA* (citrata sintaza), *glyA* (serin hidroksimetil transferaza), *pgm* (fosfoglukomutaza), *tkt* (transketolaza), *uncA* (ATP sintetaza) in *flaA* (flagelin) 55 sevov vrste *Campylobacter jejuni*.

Pomnoževanje je potekalo z osmimi oligonukleotidnimi začetniki. Velikosti pomnožkov so bile za *flaA* 417 bp, *aspA* 899 bp, *glnA* 1262 bp, *glyA* 816 bp, *pgm* 1150 bp, *tkt* 1102 bp in *unc* 1120 bp.



Slika 7: Primer agaroznega gela s pomnožki PCR. 1: *flaA*, 2: *aspA*, 3: *pgm*, 4: *tkt*, 5: *glnA*, 6: *gltA*, 7: *uncA*, 8: *glyA* (sev 57357) M: molekularni označevalec pomnožkov DNA (100bp).

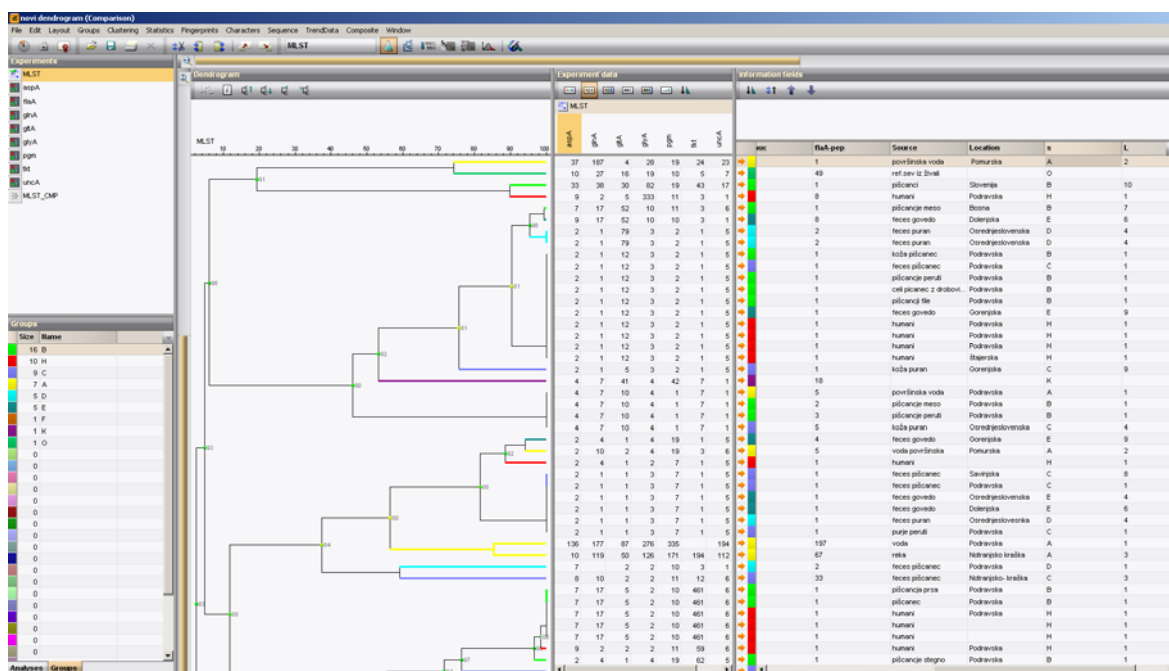
Slika 7 prikazuje velikosti fragmentov sedmih hišnih genov seva 57357. Na pozicijskem mestu M je nanešen molekularni označevalec velikosti 100 baznih parov. Na mestih od 1 do 8 so produkti PCR gena *flaA* in sedmih hišnih genov.

4.2 TIPIZACIJA *Campylobacter jejuni* NA OSNOVI MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ

Z metodo MLST smo dobili sekvence hišnih genov *aspA*, *glnA*, *glnA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *unCA* in *flaA*. V to raziskavo smo vključili 55 sevov *C. jejuni*, izoliranih iz fecesa piščanca (6 sevov), purana (4 sevi), goveda (5 sevov), ljudi (10 sevov), seve, izolirane iz piščančjega (18 sevov) in puranjega mesa (4 sevi), ter seve, izolirane iz vode (7 sevov). Sevi so izvirali iz različnih geografskih lokacij Slovenije ter Bosne in Hercegovine.

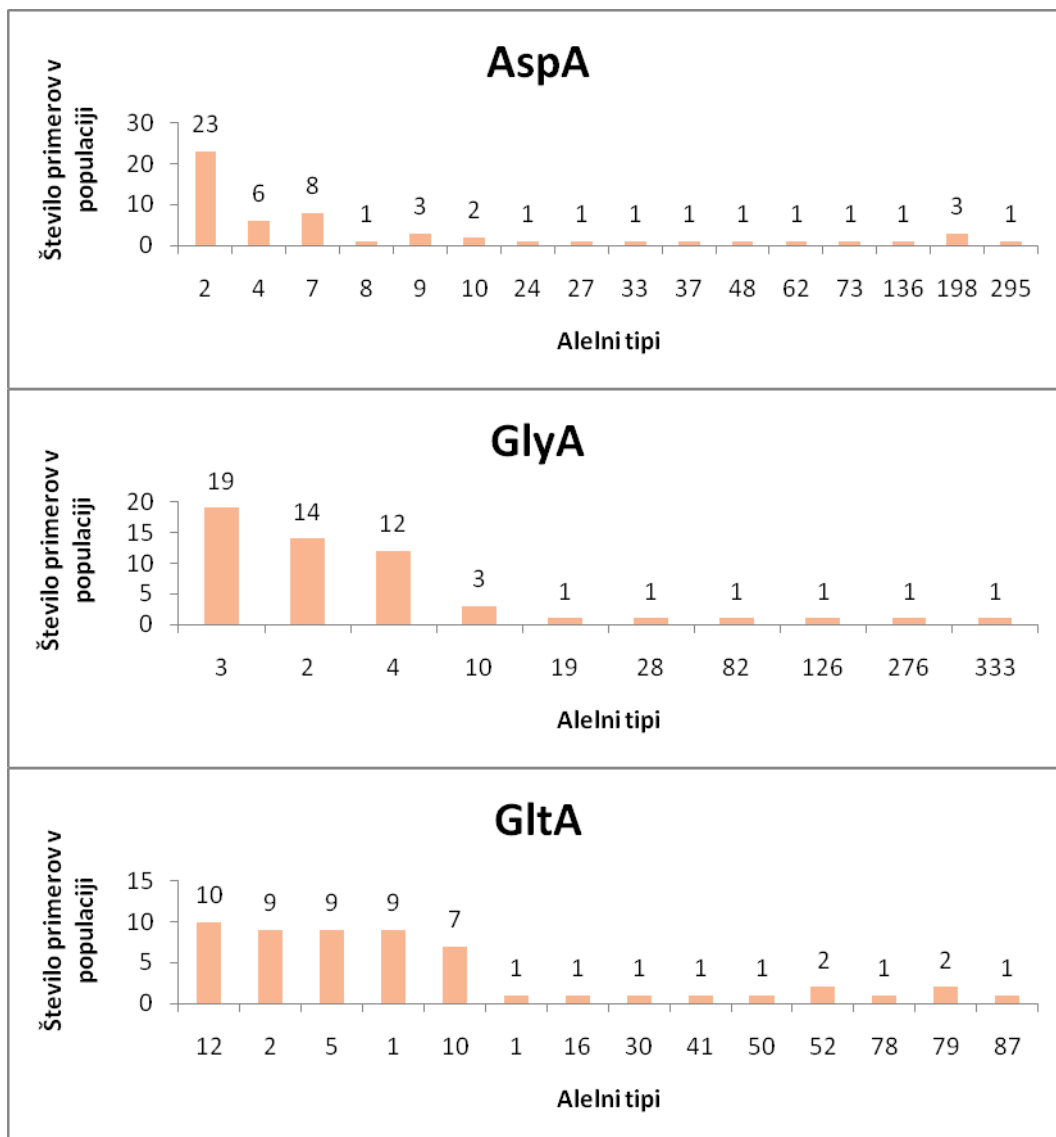
4.3 DOLOČITEV SEKVENČNIH TIPOV

Sekvenčni tip smo določili s pomočjo računalniškega programa BioNumerics®, ki se je z prenestavljenim ukaznim nizom povezal z podatkovno zbirko MLST (Jolley, 2012) in primerjal naše zaporedje gena z zaporedji tega gena v podatkovni zbirki. Glede na identiteto je alel določenega hišnega gena uvrstil v alelni tip. Alelni tip je označen s številko in se navezuje na nukleotidno zaporedje hišnega gena iz podatkovne baze. Vsako spremenjeno nukleotidno zaporedje ima drugačno številko. Številke imajo naraščajoči vrstni red, glede na čas odkritja spremenjenega zaporedja. Vsakemu izolatu je program nato določil alelni vzorec, ki je kombinacija sedmih alelnih tipov. Izolati, ki imajo identični alelni vzorec, imajo enak sekvenčni tip (ST).

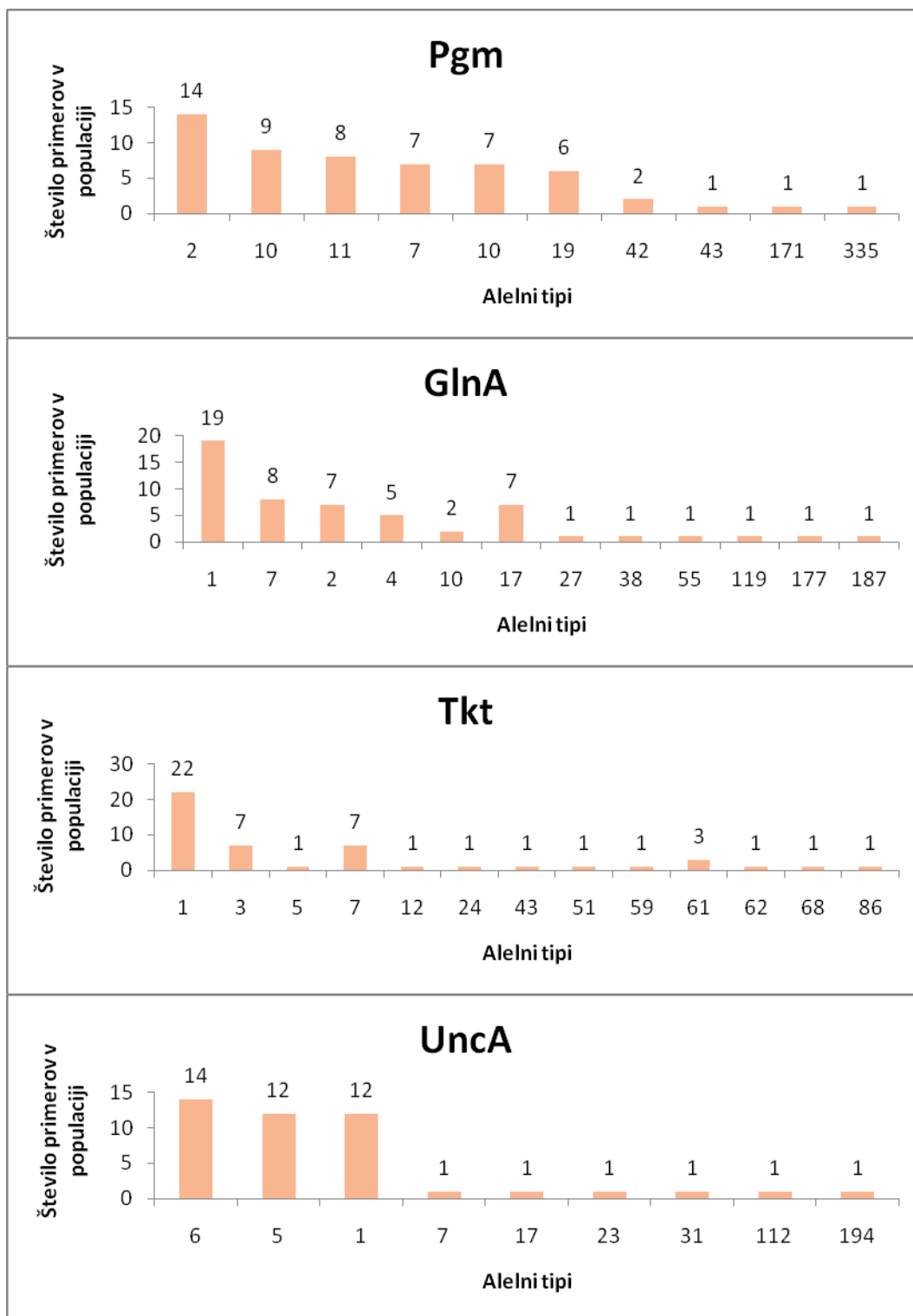


Slika 8: Ukazno okno v programu Bionumerics®. Prikazano je, da so podatki obdelani z metodo MLST, ki vključuje sedem hišnih genov. Vključena je možnost izrisovanja dendrograma sorodnosti glede na izvor.

4.3.1 Določitev alelnih tipov



Slika 9: Pogostost alelnih tipov, lokusov *aspA*, *glyA*, in *gltA* v populaciji 55 analiziranih sevov *C. jejuni*.

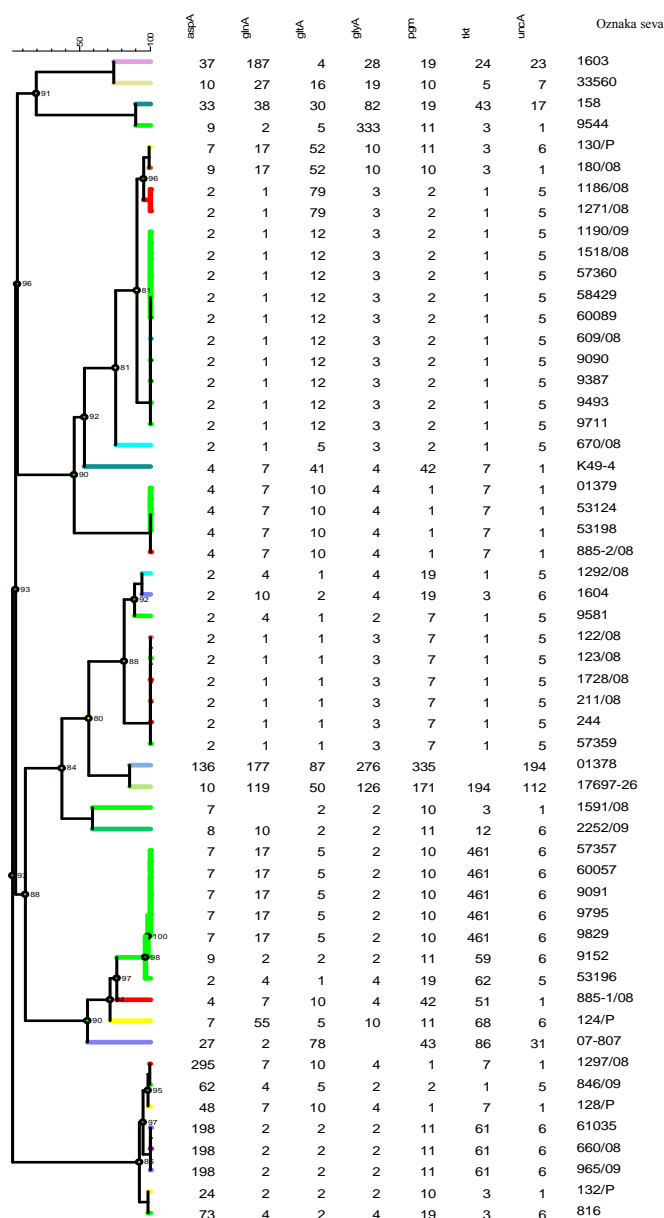


Slika 10: Pogostost alelnih tipov, lokusov *pgm*, *glnA*, *tkt* in *uncA* v populaciji 55 analiziranih sevov *C. jejuni*.

Sliki 9 in 10 prikazujeta pogostosti alelnih tipov v populaciji 55 analiziranih sevov *C. jejuni*. Pri genu *aspA* je določenih 16 alelnih tipov, pri *glyA* 10, pri *gltA* 14, pri *pgm* 10, *glnA* 12, pri *tkt* 13 in *uncA* 9 alelnih tipov. Skupno je določenih 45 različnih alelnih tipov

za sedem hišnih genov, ki se združijo v 32 alelnih vzorcev. Alelni vzorec je kombinacija sedmih alelnih tipov.

Največkrat se je pojavil alelni vzorec: *aspA_2glnA_1gltA_12glyA_3pgm_2tkt_1uncA_5*, in sicer desetkrat. Najbolj ohranjen in najmanj variabilen se je izkazal gen *uncA*, za katerega smo ugotovili da ima devet različnih alelnih tipov, ostali so jih imeli deset ali več. Glede na število alelnih tipov, bi lahko rekli, da je gen *aspA* najbolj raznolik. Če pa primerjamo *aspA* z genom *gltA*, ugotovimo, da ni velike razlike v številu različnih alelnih tipih (16-14), je pa večja zastopanost sevov z različnimi alelnimi tipi pri *gltA*. Raznolikost je torej pri *gltA* vseeno večja.



Slika 11: Dendrogram sorodnosti 55 sevov *C. jejuni*, z izpisanimi alelnimi tipi posameznih genov oz. alelnimi vzorci.

4.3.2 Določitev sekvenčnih tipov (ST)

Najpogostejši sekvenčni tip v naši analizi je bil ST-50, ki se je pojavil desetkrat, sledil mu je ST-104, ki se je pojavil šestkrat. Ostali sekvenčni tipi so bili: ST-5205, ki se je pojavil, petkrat, ST-45 trikrat, ST-2863 in ST-822 dvakrat. ST-5207, ST-403, ST-5208, ST-3611, ST-2036, ST-881, ST-19, ST-230, ST-918, ST-1044, ST-48, ST-1367, ST-354, ST-4899, ST-475, ST-583, ST-3504, ST-5206, ST-572, ST-11, ST-464, ST-657 so se pojavili le enkrat. Število vseh določenih sekvenčnih tipov je bilo 28. Pri sevih 01378, 1591/08 in 07-807 določitev sekvenčnih tipov ni bila možna.

Preglednica 17: Najpogostejši alelni vzorci z ustreznim sekvenčnim tipom.

Alelni vzorec	Ustrezni ST	Število izolatov
2-1-79-3-2-1-5	822	2
2-1-12-3-2-1-5	50	10
4-7-10-4-1-7-1	45	4
2-1-1-3-7-1-5	104	6
7-17-5-2-10-461-6	5205	5
198-2-2-2-11-61-6	2863	3

Preglednica 18 prikazuje najpogostejše alelne vzorce, ki so se pojavljali pri 55 analiziranih sevih bakterij *C. jejuni*.

4.4 DOLOČITEV KLONSKIH KOMPLEKSOV

Določili smo 11 različnih klonskih kompleksov (CC). CC predstavlja izolate, ki se razlikujejo v več kot dveh genskih lokusih (Dingle in sod., 2001). Najpogostejši je bil klonski kompleks CC-21, v katerega se je uvrstilo 19 sevov. Sekvenčni tipi v tem kompleksu pa so ST-50, ST-104, ST-822 in ST-19. Drugi najpogostejši je bil klonski kompleks CC-45, v katerega se je uvrstilo deset sevov ssekvenčnimi tipi ST-24, ST-230, ST-5286, ST-585 in ST-5205. V klonski kompleks CC-354 se je uvrstilo pet sevov in sicer sevi sekvenčnih tipov ST-4899, ST-2863, v kompleks CC-353 pa štiri sevi sekvenčnih tipov ST-2036 in ST-5205 ter v kompleks CC-48 trije sevi s sekvenčnimi tipi ST-918, ST-48 in ST-475. Klonski kompleksi s po enim sevom so bili: CC-403, CC-828, CC-607, CC-658, CC-446 in kompleks CC-206.

4.5 ANALIZA KRATKE VARIABILNE REGIJE GENA *flaA*

V analizo MLST ni bilo vključeno nukleotidno zaporedje regij gena *flaA*. Naredili smo dodatno analizo, ki je temeljila na nukleotidnem zaporedju kratke variabilne regije gena *flaA*.

Tako kot smo pri analizi MLST določili alelne tipe, smo jih tudi pri analizi *flaA* in to alelni tip nukleotidnega zaporedja (*flaA-nuc*) in tip amino-kislinskega zaporedja (*flaA-pep*). Letih je bilo skupaj 24. Najobsežnejši je bil t. i. alelni tip *flaA-nuc* 36 s pripadajočimi 9 sevi, ki so sodlili v CC-21. Sledil mu je t. i. alelni tip *flaA-nuc* 278 z 8 izolati, ki so propadali s klonskim kompleksom CC-353, CC-48 in CC-21. V t. i. alelni tip *flaA-nuc* 265 se je uvrstilo 7 sevov in vsi so bili CC-21. Sledil je t. i. alelni tip *flaA-nuc* 54 z 4 izolati s CC-21 in t. i. alelni tip *flaA-nuc* 34 s 3 izolati in CC-354. Nato so sledili še t. i. alelni tip *flaA-nuc* z dvema sevoma: 222 (CC-446, CC-354), 161 (CC-45) in 5 (CC-658). Ostali t. i. alelni tip *flaA-nuc*, ki so vključevali samo 1 izolat, so bili 1285 (nima določenega CC), 1123 (CC-48), 105 (CC-354), 121 (CC-206), 32 (CC-48), 156 (CC-156), 67 (nima določenega CC), 817 (CC-607), 964 (CC-828), 21 (CC-45), 1550 (nima določenega CC), 1549 (nima določenega CC), 636 (nima določenega CC), 92 (CC-45), 239 (CC-45).

Preglednica 19: Nukleotidna zaporedja regij *flaA-nuc* in uvrstitev v alelne tipe *flaA-nuc*.

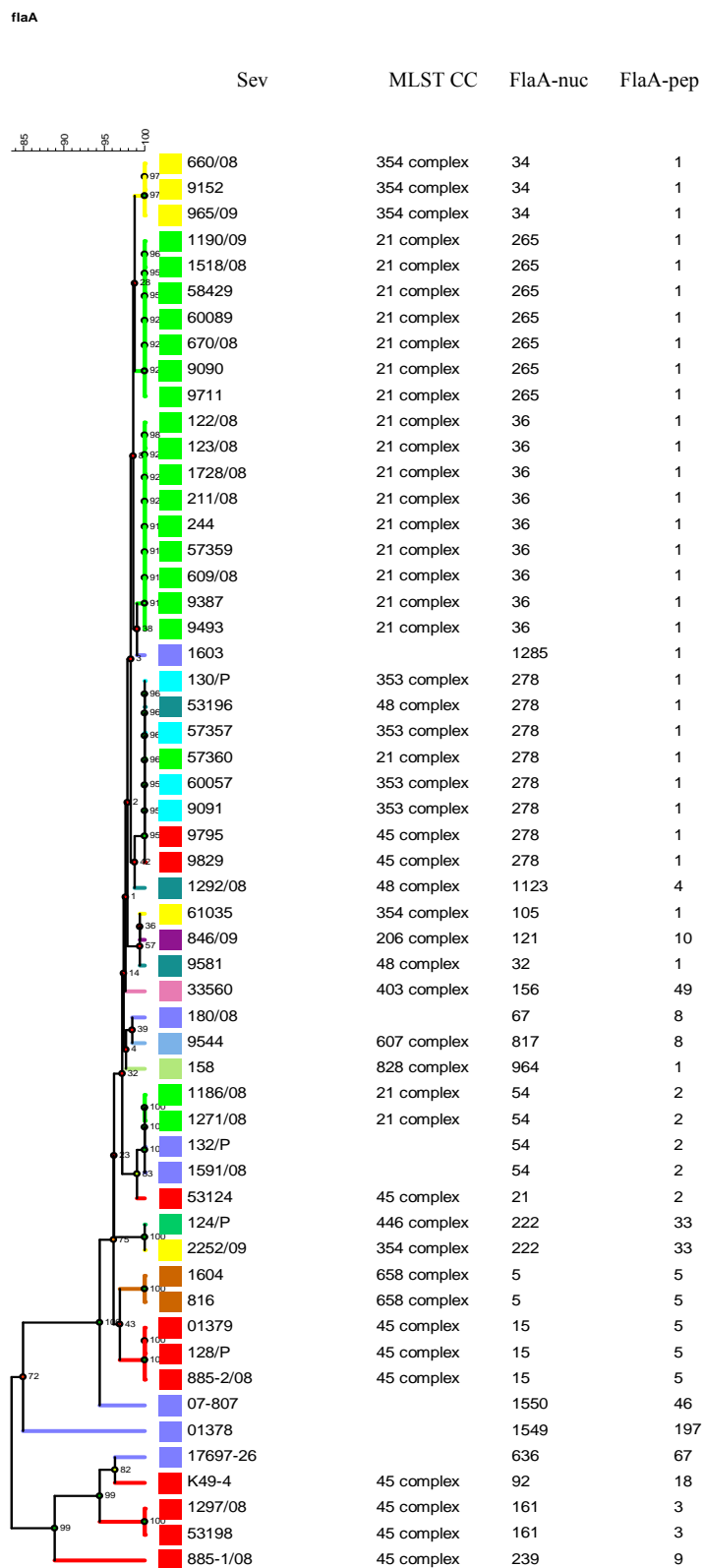
Nukleotidno zaporedje izolata <i>flaA-nuc</i>	Alelni tip <i>flaA-nuc</i>
660/08 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagaagtttaaaacaagaacatgcttcaagcagatatcaaccgttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaatactactcatttaacggtaagcaactttaaagtggaaatftatcaatcaagaattcaaatcggcgcaagtcaaatcaactgtaaaagctaccatagga gcaactcaatcttctaagataggtttatcttctaagataggtttaacacgcttgaacaggaggagaagaattcatctagtggcgaagtgaacttactcttaaaaactacaacgggtatagatga ttttcagttt	34
1190/09 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagaagtttaaaacaagaacatgcttcaagcagatatcaaccgttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaatactactcatttaacggtaagcaactttaaagtggaaatftatcaatcaagaattcaaatcggcgcaagtcaaatcaactgtaaaagctaccatagga gcaactcaatcttctaagataggtttatcttctaagataggtttaacacgcttgaacaggaggagaagaattcatctagtggcgaagtgaacttactcttaaaaactacaacgggtatagatgatt ttcagttt	265
1603 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagaagtttaaaacaagaacatgcttcaagcagatatcaaccgttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaatactactcatttaacggtaagcaactttaaagtggaaatftatcaatcaagaattcaaatcggcgcaagtcaaatcaactgtaaaagctaccatagga caactcaatcttctaagataggtttatcttctaagataggtttaacacgcttgaacaggaggagaagaattcatctagtggcgaagtgaacttactcttaaaaactacaacgggtatagatgatt tcagttt	1285
130/P aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagaagtttaaaacaagaacatgcttcaagcagatatcaaccgttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaatactactcatttaacggtaagcaactttaaagtggaaatftatcaatcaagaattcaaatcggcgcaagtcaaatcaactgtaaaagctaccatagga caactcaatcttctaagataggtttatcttctaagataggtttaacacgcttgaacaggaggagaagaattcatctagtggcgaagtgaacttactcttaaaaactacaacgggtatagatgatt tcagttt	278
1292/08 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagaagtttaaaacaagaacatgcttcaagcagatatcaaccgttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaatactactcatttaacggtaagcaactttaaagtggaaatftatcaatcaagaattcaaatcggcgcaagtcaaatcaactgtaaaagctaccatagga gcaactcaatcttctaagataggtttatcttctaagataggtttaacacgcttgaacaggaggagaagaattcatctagtggcgaagtgaacttactcttaaaaactacaacgggtatagatgatt tttcagttt	
9581 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagaagtttaaaacaagaacatgcttcaagcagatatcaaccgttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaatactactcatttaacggtaagcaactttaaagtggaaatftatcaatcaagaattcaaatcggcgcaagtcaaatcaactgtaaaagctaccatagga caactcaatcttctaagataggtttatcttctaagataggtttaacacgcttgaacaggaggagaagaattcatctagtggcgaagtgaacttactcttaaaaactacaacgggtatagatga ttttcagttt	32
33560 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagaagtttaaaacaagaacatgcttcaagcagatatcaaccgttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaatactactcatttaacggtaagcaactttaaagtggaaatftatcaatcaagaattcaaatcggcgcaagtcaaatcaactgtaaaagctaccatagga caactcaatcttctaagataggtttatcttctaagataggtttaacacgcttgaacaggaggagaagaattcatctagtggcgaagtgaacttactcttaaaaactacaacgggtatagatga ttttcagttt	156
180/08 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagaagtttaaaacaagaacatgcttcaagcagatatcaaccgttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaatactactcatttaacggtaagcaactttaaagtggaaatftatcaatcaagaattcaaatcggcgcaagtcaaatcaactgtaaaagctaccatagga caactcaatcttctaagataggtttatcttctaagataggtttaacacgcttgaacaggaggagaagaattcatctagtggcgaagtgaacttactcttaaaaactacaacgggtatagatga ttttcagttt	67
9544 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagaagtttaaaacaagaacatgcttcaagcagatatcaaccgttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaatactactcatttaacggtaagcaactttaaagtggaaatftatcaatcaagaattcaaatcggcgcaagtcaaatcaactgtaaaagctaccatagga caactcaatcttctaagataggtttatcttctaagataggtttaacacgcttgaacaggaggagaagaattcatctagtggcgaagtgaacttactcttaaaaactacaacgggtatagatga ttttcagttt	817
158 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagaagtttaaaacaagaacatgcttcaagcagatatcaaccgttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaatactactcatttaacggtaagcaactttaaagtggaaatftatcaatcaagaattcaaatcggcgcaagtcaaatcaactgtaaaagctaccatagga caaccgaacttctaagataggtttatcttctaagataggtttaacacgcttgaacaggaggagaagaattcatctagtggcgaagtgaacttactcttaaaaactacaacgggtatagatga ttttcagttt	964

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 19: Nukleotidna zaporedja regij *flaA*-nuc in uvrstitev v alelne tipe *flaA*-nuc.

Nukleotidno zaporedje izolata <i>flaA</i> -nuc	Alelni tip <i>flaA</i> -nuc
1186/08 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagtttaaaacaagaactatgcttcaagcagatatcaaccgtttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaactactctcatttaacggtaaacacttttaagtggaaattttatcaatcaagaatttcaaatcgggcaagttcaaatcaactataaaagctactataggag caaccagcttcttaagataggttcttcttaagataggttaacacgcttgaacaggaggagaatttcatctagtggcgaagtgaatttactcttaaaaattacaatggtatagatga ttttcagttt	54
124/P aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagtttaaaacaagaactatgcttcaagcagatatcaaccgtttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaactactctcatttaacggtaaacacttttaagtggaaattttatcaatcaagaatttcaaatcgggcaagttcaaatcaactataaaagctactataggag caactcagcttcttaagataggttcttcttaagataggttaacacgcttgaacaggaggagaatttcatctagtggcgaagtgaatttactcttaaaaattacaatggtatagatga ttttcagttt	222
1604 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagtttaaaacaagaactatgcttcaagcagatatcaaccgtttgatgga agaacttgacaatatcgcaaaactactctcatttaacggtaaacacttttaagtggaaattttatcaatcaagaatttcaaatcgggcaagttcaaatcaactataaaagctactataggag caactcaatcttcttaagataggttcttcttaagataggttaacacgcttgaacaggaggagaatttcatctagtggcgaagtgaatttactcttaaaaattacaatggtatagatga ttttcagttt	5
01379 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagtttaaaacaagaactatgcttcaagcagatatcaaccgtttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaactactctcatttaacggtaaacacttttaagtggaaattttatcaatcaagaatttcaaatcgggcaagttcaaatcaactataaaagctactataggag aactcaatcttcttaagataggttcttcttaagataggttaacacgcttgaacaggaggagaatttcatctagtggcgaagtgaatttactcttaaaaattacaatggtatagatga ttttcagttt	15
07-807 aaggcaactcaagcggctcaagatggacaagtttaaaacaagaactatgcttcaagcagatatcaaccgtttaatgga agaacttgacaatatcgcaaaactactctcatttaacggtaaacacttttaagtggaaattttatcaatcaagaatttcaaatcgggcaagttcaaatcaactataaaagctactataggag caaccagcttcttaagataggttcttcttaagataggttaacacgcttgaacaggaggagaatttcatctagtggcgaagtgaatttactcttaaaaattacaatggtatagatga ttttcagttt	1550
01378 aaagcggctcaagcggctcaagatggacaagtttaaaacaagaactatgcttcaagcagatatcaaccgtttgatgga agaacttgacaatatcgcaaaactactctcatttaacggtaaacacttttaagtggaaattttatcaatcaagaatttcaaatcgggcaagttcaaatcaactataaaagctactataggag cgaactcagcttcttaagataggttcttcttaagataggttaacacgcttgaacaggaggagaatttcatctagtggcgaagtgaatttactcttaaaaattacaatggtatagatga ttttcagttt	1549
17697-26 aaggcttctcaagcttctcaagatggcaagtttaaaacaagaactatgcttcaagcagatatcaaccatcatgga ggaacttgacaatatcgcaaaactactctcatttaacggtaaacacttttaagtggaaattttatcaatcaagaatttcaaatcgggcaagttcaaatcaactataaaagctaccataggag caaccagcttcttaagataggttcttcttaagataggttaacacgcttgaacaggaggagaatttcatctagtggcgaagtgaatttactcttaaaaattacaatggtatagatga ttttcagttt	636
K49-4 aaagcaactcaagcggctcaagatggcaagtttaaaacaagaactatgcttcaagcagatatcaaccatcatgga agaacttgacaatatcgcaaaactactctcatttaacggtaaacacttttaagtggaaattttatcaatcaagaatttcaaatcgggcaagttcaaatcaactataaaagctaccataggag gcaaccagcttcttaagataggttcttcttaagataggttaacacgcttgaacaggaggagaatttcatctagtggcgaagtgaatttactcttaaaaattacaatggtatagatga ttttcagttt	92
53198 aaagcaactcaatctgctcaagatggcaagtttaaaacaagaactatgcttcaagcagatatataaaactcatgga agaacttgacaatatcgcaaaactactctcatttaacggtaaacacttttaagtggaaattttatcaatcaagaatttcaaatcgggcaagttcaaatcaactataaaagctactataggag aaccagcttcttaagataggttcttcttaagataggttaacacgcttgaacaggaggagaatttcatctagtggcgaagtgaatttactcttaaaaattacaatggtatagatga ttttcagttt	161
885-1/08 aaagctactcaaacagctcaagatggacaagtttaaaacaagaactatgcttcaagcagatatataaaatfaatgga agaacttgacaatatcgcaaaactactctcatttaacggtaaacacttttaagtggaaattttatcaatcaagaatttcaaatcgggcaagttcaaatcaactataaaagctactataggag tactcaatcttcttaagataggttcttcttaagataggttaacacgcttgaacaggaggagaatttcatctagtggcgaagtgaatttactcttaaaaattacaatggtatagatga ttttcagttt	239

Preglednica 19 prikazuje nukleotidna zaporedja tistih izolatov, ki imajo določene različne alelne tipe. Z rdečo barvo so označeni spremenjeni nukleotidi v nukleotidnem zaporedju, na podlagi katerih so bili izolati razvrščeni v različne alelne tipe *flaA*-nuc.



Slika 12: Dendrogram, ki prikazuje sorodnost sevov glede na klonske komplekse ter sekvence flaA-nuc ter flaA-pep. Različne barve pomenijo različne klonske komplekse.

4.6 PREGLED SEKVENČNIH TIPOV IN KLONSKIH KOMPLEKSOV HIŠNIH GENOV IN REGIJ *flaA*

Preglednica 20: Rezultati analize sevov z metodo MLST sedmih hišnih genov in dveh regij *flaA*.

Sev	MLST ST	MLST CC	<i>flaA</i> -nuc	<i>flaA</i> -pep	tip
1603	5207	/	1285	1	
01379	45	45	15	5	1
1604	1044	658	5	5	2
01378	/	/	1549	197	
17697-26	1367	/	636	67	3
07-807	/	/	1550	46	
816	657	658	5	5	4
158	5308	828	964	1	5
130/P	2036	353	278	1	6
1190/09	50	21	265	1	7
57360	50	21	278	1	8
58429	50	21	265	1	7
60089	50	21	265	1	7
53124	45	45	21	2	9
53198	45	45	161	3	10
57357	5205	353	278	1	11
60057	5205	353	278	1	11
53196	475	48	278	1	12
124/P	3504	446	222	33	13
846/09	572	206	121	10	14
128/P	11	45	15	5	15
61035	2863	354	105	1	16
K49/4	230	45	92	18	17
965/09	2863	354	34	1	18
132/P	464	/	54	2	19
1518/08	50	21	265	1	7
122/08	104	21	36	1	20
123/08	104	21	36	1	20
2252/09	354	354	222	33	21
660/08	2863	354	34	1	22
1591/08	/	/	54	2	
1186/08	822	21	54	2	23
1271/08	822	21	54	2	23
244	104	21	36	1	20
1297/08	5206	45	161	3	24
180/P	881	/	67	8	
609/08	50	21	36	1	25
1292	918	48	1123	4	26
1728/08	104	21	36	1	20
211/08	104	21	36	1	20
670/08	19	21	265	1	27
57359	104	21	36	1	20
885-2/08	45	45	15	5	1
885-1/08	583	45	239	9	28
9544	3611	607	817	8	29
9090	50	21	265	1	7

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 20: Preglednica 20: Rezultati analize sevov z metodo MLST sedmih hišnih genov in dveh regij *flaA*.

Sev	MLST ST	MLST CC	flaA-nuc	flaA-pep	tip
9387	50	21	36	1	25
9493	50	21	36	1	25
9711	50	21	265	1	7
9581	48	48	32	1	30
9091	5205	353	278	1	11
9795	5205	45	278	1	31
9829	5205	45	278	1	31
9152	4899	354	34	1	32
33560	403	403	156	49	33

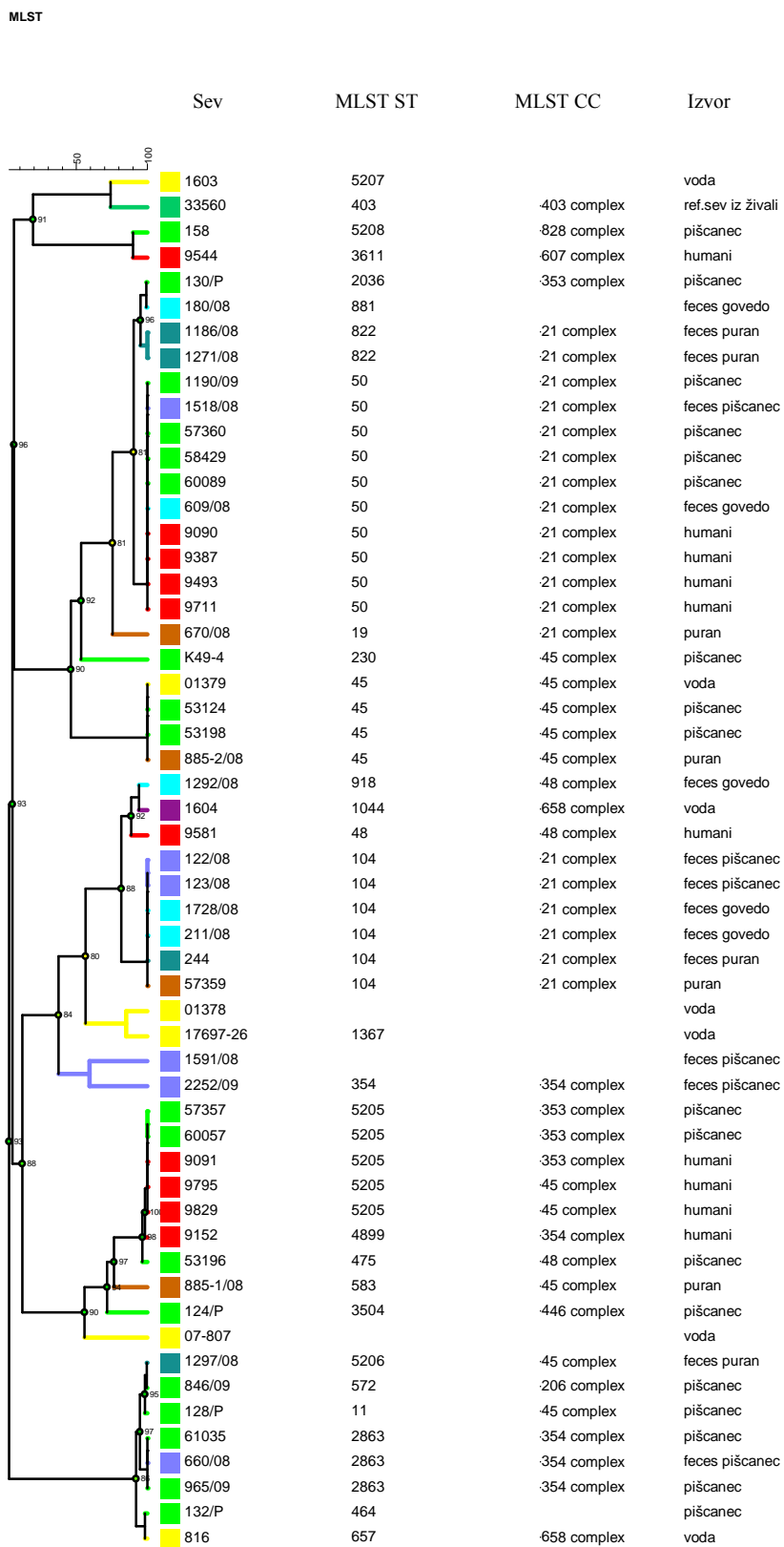
Analiza dodatnih dveh sekvenc *fla-nuc* in *fla-pep* gena *flaA*, ki ima visoko zmožnost razlikovanja med sevi je povečala sposobnost razlikovanja znotraj CC, saj se je na primer v CC-45, CC- 21 in CC-48 uvrstilo od 3 do 6 izolatov z različnimi alelnimi tipi sekvenc *flaA-nuc* in *flaA-pep*.

Iz alelnih profilov sedmih hišnih genov in variabilne regije *flaA* smo s pomočjo programa Bionumerics® skupno določili 33 različnih sekvenčnih tipov za 48 sevov bakterij *C. jejuni*, ki smo jim določili sekvence v vseh analiziranih regijah, kar odraža izjemno raznolikost analiziranih sevov.

4.7 ANALIZA LOKUSOV HIŠNIH GENOV IN REGIJ *flaA* GLEDE NA IZVOR SEVOV

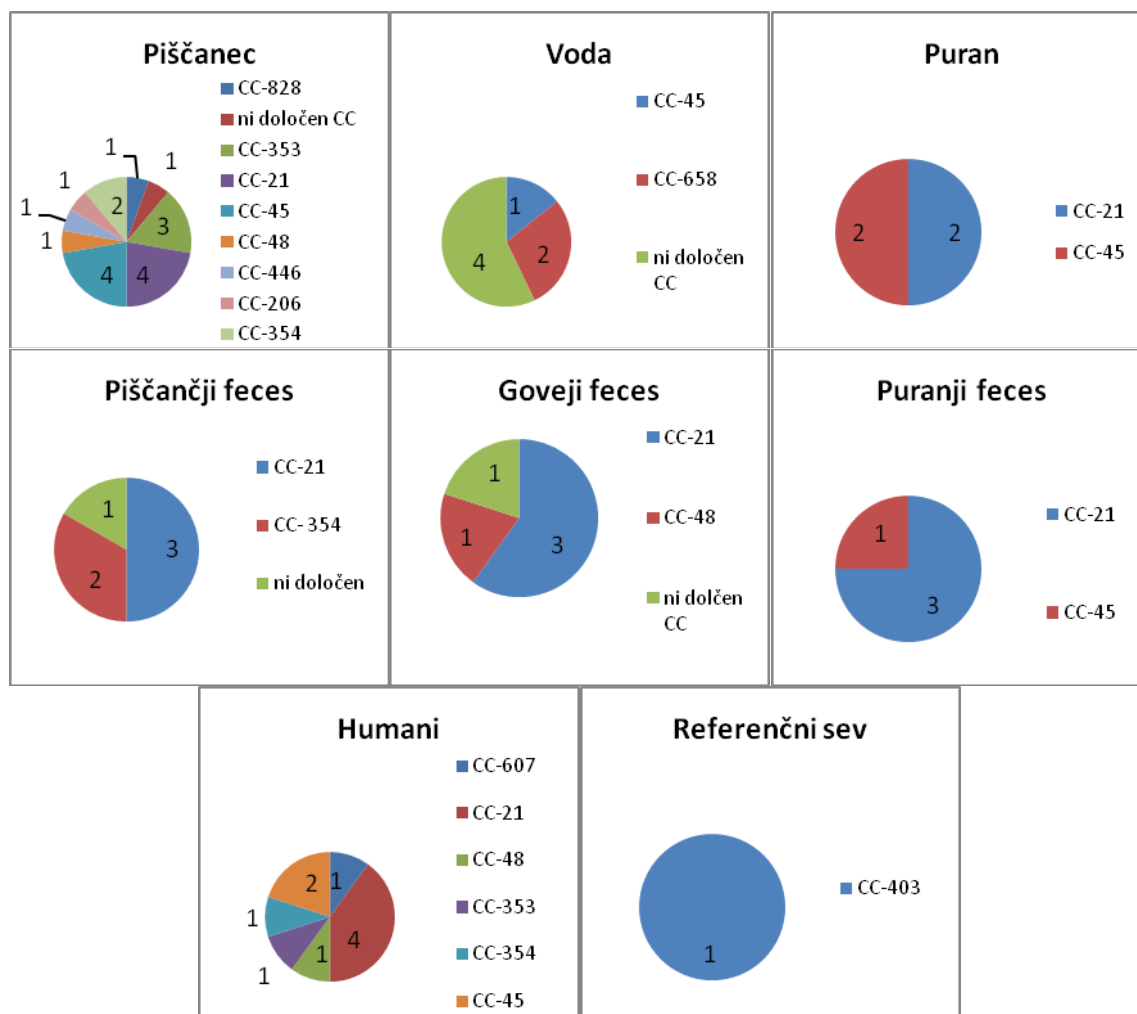
Sevi *Campylobacter jejuni*, ki smo jih preučevali, so bili različnega izvora. Sedem jih je bilo izoliranih iz površinskih voda, osemnajst jih je izviralo iz piščanca, štirje iz purana, pet iz govejega fecesa, štirje iz puranjega fecesa in šest iz piščančjega fecesa, deset jih je bilo humanega izvora. Dodan je bil referenčni sev.

Dendrogram na sliki 13 ki smo ga narisali s programom BioNumerics® z metodo izrisovanja dreves UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), prikazuje povezanost sevov glede na izvor.



Slika 13: Dendrogram humanih, živalskih in iz vode izoliranih sevov, z oznako sekvenčnega tipa, klonskega kompleksa in izvora.

Iz dendrograma, ki prikazuje povezanost sevov glede na izvor (Slika 13), je jasno razvidno, da imajo sevi kljub enakemu izvoru različne sekvenčne tipe in prav tako so uvrščeni v različne klonske komplekse. Po drugi strani pa so bili zelo podobni ali celo enaki sevi pridobljeni iz različnih tipov vzorcev.



Slika 14: Shematski prikaz raznolikosti klonskih kompleksov sevov istega izvora.

Največja skupina je bila skupina 18 sevov iz piščancev z največjim številom različnih klonskih kompleksov, le-teh je bilo 8. V klonski kompleks CC-21 in CC-45 so se uvrstili 4 izolati, v CC-828 in CC-353 pa po trije izolati. Ostali, ki so bili še prisotni, so bili klonski kompleksi CC-48, CC-446, CC-206, CC-354.

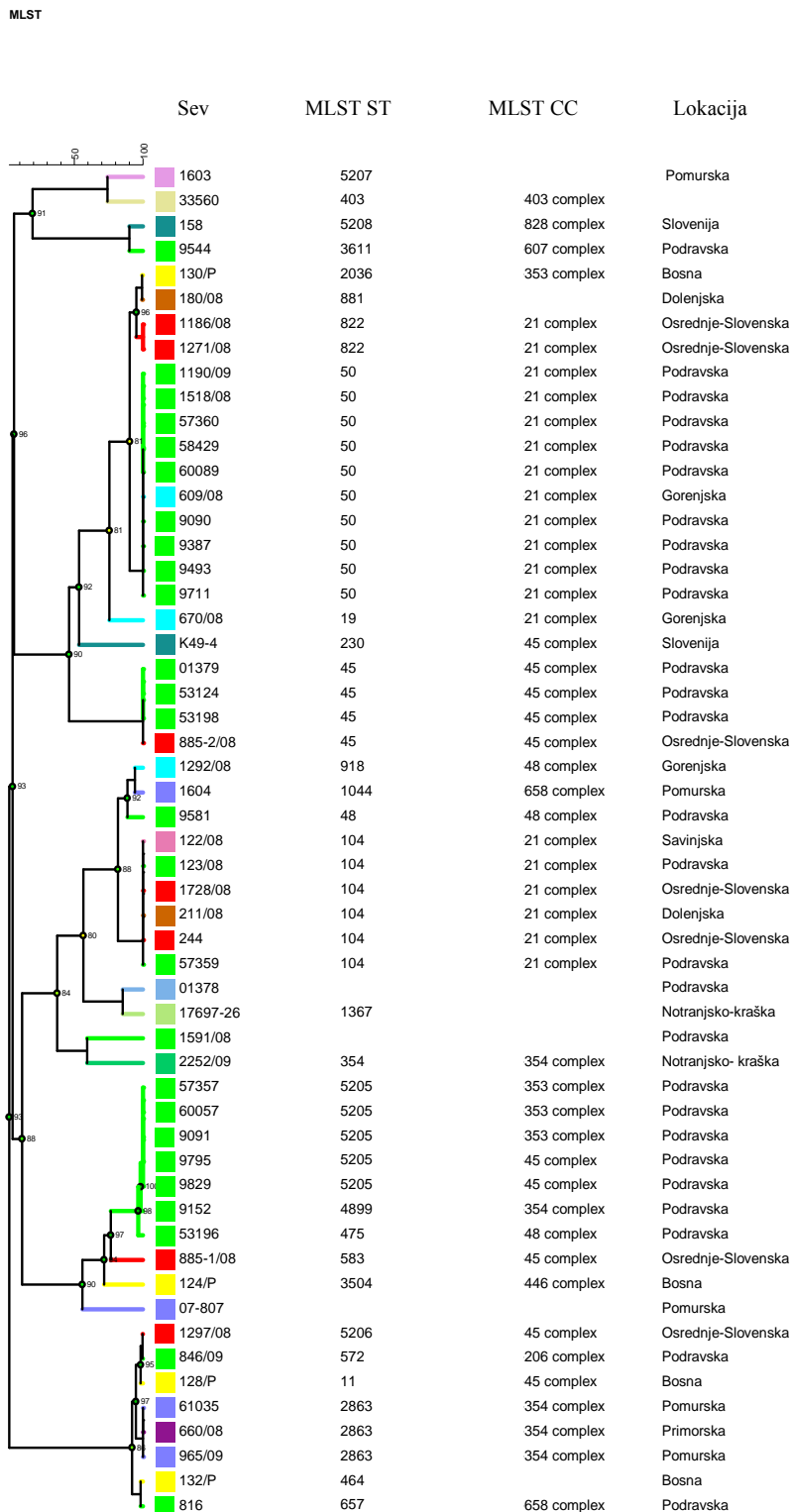
Druga večja skupina so bili humani izolati, ki so vključevali 6 različnih klonskih kompleksov. Štirje izolati od 10 so se uvrstili v klonski kompleks CC-21, 2 v klonski kompleks CC-45. Ostali pa po en izolat v klonski kompleks CC-607, CC-353, CC-48, CC-354.

Sedem izolatov, izoliranih iz vode, se je uvrstilo v 2 klonska kompleksa CC-45 in CC-658. Štirim sevom iz vode klonskega kompleksa nismo mogli določiti. Pet izolatov iz puranov smo uvrstili v klonske komplekse CC-21, CC-45 in CC-354.

Trije izolati puranjega, piščančjega in govejega fecesa so se uvrstili v klonski kompleks CC-21. Klonski kompleks CC-48 se je pojavil tudi pri izolatu iz govejega fecesa, CC-45 pa pri izolatih iz puranjem fecesu in CC-354 pri izolatu iz piščančjega fecesa.

Pri sevih različnega izvora pa so se pojavili enaki klonski kompleksi, tako se je na primer CC-21 pojavil pri sevih vseh omenjenih izvorov, razen vode.

4.8 ANALIZA SEKVENC GLEDE NA GEOGRAFSKO POREKLO SEVOV



Slika 1: Dendrogram humanih in živalskih sevov ter sevov, izoliranih iz vode, z oznako ST, CC in regije izolacije.

Iz podravske regije je bilo največ izolatov, to je 28. Izolati iz te regije pripadajo 8 različnim klonskim kompleksom. Največji kompleks je klonski kompleks CC-21 z izolati iz piščanca, piščančjega fecesa, purana in humanimi izolati. V ostalih regijah, z manjšim številom izolatov, se pojavljajo klonski kompleksi CC-45, CC-354, CC-48, CC-658, CC-453. Izolati iz Bosne in Hercegovine so si bili glede na klonske komplekse vsi različni in so pripadali kompleksom CC-354, CC-446, CC-45, enemu izolatu pa nismo mogli definirati klonskega kompleksa.

5 RAZPRAVA

5.1 ANALIZA LOKUSOV HIŠNIH GENOV GLEDE NA IZVOR SEVOV

Z genotipizacijsko metodo MLST za *C. jejuni* je bilo leta 2009 dokazano, da v državah Evrope veljata za največja in najpogostejšega klonska kompleksa, kompleksa CC-21 in CC-45 (Korczak in sod., 2009).

Tako kot so Dingle s sod. (2001) dobili največje število klonskih kompleksov tipa CC-21, tako je tudi pri nas prevladoval CC-21, predvsem med humanimi izolati (4 od 10). Kot drugo največjo klonsko skupino so potrdili CC-45, kar prav tako potrjujejo naši rezultati, ki kažejo na to, da je tudi pri nas druga največja klonska skupina CC-45. Da sta ti dve skupini res največji in najobsežnejši v Evropi so potrdili tudi na Švedskem in Finskem (de Haan in sod.2011; Griekspoor in sod., 2009).

Ugotovitvi Collesa s sod. (2003), da se kompleksa CC-21 in CC-45 navezujeta na izolate piščanca, goveda in vode, se lahko pridružimo tudi mi, saj enako velja za nekaj naših izolatov. Ne moremo pa potrditi njihove ugotovitve, da se kompleks CC-61 navezuje na govedo. Iz slike 13 je razvidno, da smo med petimi izolati iz govejega fecesa potrdili dva različna klonska kompleksa, in sicer CC-21 in CC-48.

Naša pričakovanja so bila, da bodo tisti izolati, ki imajo enak izvor, imeli enak ali zelo soroden klonski kompleks. V večini primerov se to pričakovanje ni potrdilo, pač pa je bila za izolate istega izvora značilna velika raznolikost, kar je očitno predvsem za piščančje in humane izolate. Ti dve skupini humanih in piščančjih izolatov vključujeta večje število sevov in zato je lahko takšna analiza sploh možna, kajti na skupini sevov z majhnim številom sevov ne moremo narediti takšne analize, saj je za natančno analizo potrebno veliko število sevov.

5.1.1 Izolati iz vode

V analizo MLST za sedem hišnih genov, je bilo vključenih šest sevov, ki so bili izolirani iz površinskih vod iz podravske, pomurske in notransko-kraške regije. Izolata iz pomurske regije z oznakama 07-807 in 1603 nimata določenih klonskih kompleksov analize MLST v celoti. Izolat 1603 ima določen ST-5207, nima pa določenega klonskega kompleksa, izolat 07-807 pa nima določenega niti sekvenčnega tipa, niti klonskega kompleksa. Pri štirih izolatih ni bilo možno določiti CC, kar kaže na to, da še ni zadostnega števila izolatov, ki bi imeli enake alele v štirih ali več lokusih in da bi lahko spadali v skupni CC. Področje površinskih voda je najverjetnje manj raziskano in je zato tudi podatkovna baza osiromašena podatkov izolatov iz vode. Colles sod. (2003) je ugotovil, da se izolati iz vode najpogosteje navezujejo na CC-45 in CC-21. V naši študiji le en izolat pripada CC-45 in en CC-658, torej smo določili le dva sekvenčna tipa, ST-45 in ST-1044, *C. jejuni* iz vode. V

podatkovno bazo MLST smo vnesli novo kombinacijo nukleotidnih zaporedij vseh sedmih hišnih genov in *flaA* gena izolata z oznako 1603.

5.1.2 Izolati iz piščančjega in puranjega mesa

Pri izolatih iz piščančjega mesa se najpogosteje pojavljajo genotipi CC-21, CC-45 in CC-354. Pojavil se je nov ST-5205 iz klonske skupine CC-353, in sicer pri dveh izolatih z oznakama 57357 in 60057. Enajst izolatov od osemnajstih ima genotip prej omenjenih CC, kar je več kot 50 %. Podobne rezultate je dobil Korczak in sod. (2009) pri tipizaciji 99 piščancev na Švedskem, ko je več kot 50 % izolatov pripadalo genotipu iz CC-21 in CC-45.

Iz puranjega mesa smo imeli štiri izolate. Dva pripadata CC-45 in dva CC-21. Za izolata 57357 in 60057 iz piščančjega mesa smo dopolnili podatkovno bazo z novimi sekvenčnimi podatki.

5.1.3 Izolati iz piščančjega, puranjega in govejega fecesa

V CC-21 so se uvrstili 3 izolati piščančjega fecesa, 3 iz puranjega fecesa in 3 iz govejega fecesa. CC-21 je v naši raziskavi klonski kompleks z največjim številom izolatov iz fecesa. Sledi mu CC-354 z dvema izolatoma iz piščančjega fecesa. Pri izolatu iz goveja fecesa z oznako 180/08 in piščančjemu izolatu 1591/08 ni določenega CC. Pri izolatu 1297/08 se je prvič pojavil alel za hišni gen *asp*, dodelila se mu je zaporedna številka odkritja 295. Pri izolatih 9091 in 9795 sta se pojavila še tudi neodkrita alela za gen *tkt*. Sedaj imata oznako s številko 461, kar nam pove, da je bila sekvenca odkrita 461. po vrsti.

5.1.4 Humani izolati

Pri humanih izolatih z oznakami 9090, 9387, 9493, 9711, izoliranih iz podravske regije, je iz slike 13 razvidna precejšnja genotipska povezanost z izolati piščančjega mesa in govejega, piščančjega in puranjega fecesa. Vsi imajo določen isti ST-50 in CC-21. Izolata 9090 in 9711 imata isti nukleotidno zaporedje z oznako *flaA*-nuc in izolata 9387 in 9493 *flaA*-nuc 36. Iz tega bi lahko sklepali, da gre za manjši epidemiološki izbruh, vendar zaradi premajhnega števila analiziranih sevov to lahko le predvidevamo. Pojavila so se poročila, da imajo kampilobaktri sposobnost za okužbo zaporednih generacij ali z neposrednim vertikalnim prenosom s kokoši na piščance preko jajc ali pa s horizontalnim prenosom znotraj valilnice (Nesbit in sod., 2002; Petersen in sod., 2001). Podoben dejavnik za kolonizacijo s kampilobaktri je lahko kontaminirana voda za pitje (Newell, 2002). Lahko je bil prisoten kateri od teh dejavnikov pri piščančjih sevih 9090, 9387, 9493 in 9711 in je prišlo do kolonizacije. Pri dveh sevih, 53124 in 53198, izoliranih iz piščanca

v podravski regiji in dveh humanih sevih 9795 in 9895, bi lahko sklepali, da gre za isti sev *C. jejuni*, saj imajo vsi štirje sevi določen enak klonski kompleks CC-45 in isti sekvenčni tip *flaA* regij.

5.2 ANALIZA KRATKE VARIABILNE REGIJE GENA *flaA*

Poleg tipizacije MLST sedmih hišnih genov smo naredili še tipizacijo kratke variabilne regije gena *flaA*, za dodatno diskriminatorno moč, ki smo jo s tem tudi povečali. Pri študiji Mellmann s sod. (2004), so ugotovili na podlagi dveh tipizacijskih metod MLST in tipizaciji *flaA*, da je bil diskriminatorni indeks pri tipizaciji regije *flaA* (0,920), višji od diskriminatornega indeksa metode MLST (0,886).

Kratka variabilna regija gena *flaA* velja za zelo variabilno regijo in je uporabna za razlikovanje med vrstami *Campylobacter* spp. in za razlikovanje tesno povezanih sevov *C. jejuni*. Dokazane so bile genske rekombinacije znotraj genoma, ki pa lahko privedejo do drugačne tipizacije izolatov iz istega okolja (Meinersmann in sod., 2005).

V naši raziskavi smo določili 24 alelnih tipov, ki smo jih določili iz nukleotidnega zaporedja *flaA*. Različno nukleotidno zaporedje *flaA*-nuc se je pojavljalo tudi v enakih klonskih kompleksih. Zaporedje 278 se je pojavilo štirikrat v CC-353, enkrat v CC-48, enkrat v CC-21 in dvakrat v CC-45. Zanimivi rezultati so vidni iz slike 13 pri izolatih 57357, 60057, 9091. Izolat 9091 je humani, ostala dva sta bila izolirana iz piščanca. Vsi trije izolati tako humani kot piščančji so iz podravsk regije. Gre za izolate z istimi alelni tipi, sekvenčnimi tipi, klonskimi kompleksi in enakimi nukleotidnimi zaporedji kratke variabilne regije *flaA* gena. Z zelo veliko verjetnostjo lahko sklepamo, da gre za isti klon *C. jejuni*.

6 SKLEPI

Z eksperimentalnim delom in analizo dobljenih sekvenc s programom Bionumerics® smo ugotovili naslednje:

- Sevi z enakim izvorom niso imeli enakih alelov hišnih genov *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA* in analiziranih regij *flaA*. Pripadali so različnim sekvenčnim tipom in so bili uvrščeni v različne klonske komplekse.
- Na osnovi sekvenc sedmih hišnih genov smo najpogosteje (pri 19 izolatih od 55 analiziranih) potrdili klonski kompleks CC-21, ki je tudi sicer znan kot najpogostejši v evropskih državah. Odkrili smo ga pri vseh tipih izolatov, razen iz vode.
- Iz alelnih profilov sedmih hišnih genov in dveh regij *flaA* smo skupno določili 33 različnih sekvenčnih tipov za 48 sevov bakterij *C. jejuni*, ki smo jim uspeli določiti sekvence v vseh analiziranih regijah, kar odraža izjemno raznolikost analiziranih sevov.
- Pojavili so se novi aleli hišnih genov in regij *flaA*, ki jih še ni v podatkovni bazi MLST. Domnevo smo potrdili z novimi vpisi v podatkovno zbirko, predvsem za analizirane seve iz površinskih vod.

7 POVZETEK

Kampilobaktri vrste *C. jejuni* so patogene bakterije, ki povzročajo črevesne okužbe ljudi, najpogosteje preko kontaminirane hrane, predvsem piščančjega mesa. Naravni rezervoar teh bakterij je zelo razširjen v naravi, to je črevesje perutnine, goveda in prašičev. Običajno zdravljenje ni potrebno, vendar okužbe lahko vodijo tudi do resnejših bolezenskih stanj, kot je krvava driska in sistemske okužbe s trajnimi posledicami. V hujših primerih je potrebno zdravljenje z antibiotiki, vendar je le-to zdravljenje že omejeno zaradi pogoste odpornosti kampilobakterov proti različnim antibiotikom, ki se uporabljajo v humani in veterinarski medicini.

Tipizacija je pomembna molekularna tehnika, s katero lahko sledimo izvore in poti bakterijskih okužb, vključno z bakterijami vrste *C. jejuni*. Obstaja več tipizacijskih metod, med najnovejše pa prištevamo tudi tipizacijo na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST). Pri kampilobaktirih temelji na analizi nukleotidnega zaporedja hišnih genov *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt* in *uncA*. Prednosti MLST pred ostalimi metodami so v tem, da je metoda visoko specifična in ponovljiva. Izmenjava in primerjava rezultatov med laboratoriji je relativno enostavna zaradi mednarodno dosegljive podatkovne zbirke in standardne nomenklature.

V naši raziskavi smo opravili tipizacijo na osnovi multilokusnih zaporedij (MLST) za 55 izolatov *C. jejuni*, ki so bili pridobljeni iz različnih virov. Sedem sevov je izviralo iz površinskih vod, 18 iz piščančjega mesa, 6 iz piščančjega fecesa, 4 iz puranjega fecesa, 5 iz govejega fecesa, 4 iz puranov in 10 iz humanih kliničnih vzorcev, poleg tega smo analizirali še referenčni sev *C. jejuni*. Namen analize je bil ugotoviti morebitno povezavo med izvorom izolatov in ugotovljenimi sekvenčnimi tipi oz. klonskimi kompleksi. Sevi z enakim izvorom naj bi imeli pogosteje enake alele za hišne gene *aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA* in gen *flaA* in s tem isti sekvenčni tip oz. klonski kompleks. Z analizo MLST pa je bilo ugotovljeno, da sevi z enakim izvorom niso imeli enakih alelov hišnih genov. Pripadali so različnim sekvenčnim tipom in so bili uvrščeni v različne klonske komplekse. Najpogosteje (pri 19 izolatih od 55 analiziranih) smo potrdili klonski kompleks CC-21, ki je tudi sicer znan kot najpogostejši v evropskih državah. Odkrili smo ga pri vseh tipih izolatov, razen iz vode. Iz alelnih profilov sedmih hišnih genov in dveh regij *flaA* smo skupno določili 33 različnih sekvenčnih tipov za 48 sevov bakterij *C. jejuni*, ki smo jim uspeli določiti sekvence v vseh analiziranih regijah, kar odraža izjemno raznolikost analiziranih sevov. Pričakovali smo, da se bodo pojavili novi aleli hišnih genov in regij *flaA*, ki jih še ni v podatkovni bazi MLST. Domnevo smo potrdili z novimi vpisi v podatkovno zbirko, predvsem za analizirane seve iz površinskih vod (novi aleli *asp* za sev 1297/08 in *tkt* za seva 9091 in 9795, za seve 57357, 60057 in 1603 pa smo podatkovno bazo dopolnili za vseh sedem hišnih genov in *flaA* gen.

8 VIRI

- Aktas Z., Day M., Kayacan C.B., Diren S., Threlfall E.J. 2007. Molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by plasmid analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Antimicrobiology*, 30: 541-545.
- Andlovic A. 2002. Patogene bakterije-kampilobakterji. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 217-220.
- Arbeit R.D. 1995. Manual of clinical microbiology. V: Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganisms. 7th ed. Murray P. (ed.). Washington, ASM Press: 190-208.
- Bardoň J., Kolář M., Karpíšková R., Hricová K. 2011. Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in broilers at retail in their Czech Republic and their antibiotic resistance. *Food Control*, 22: 328 – 332.
- Behringer M., Miller W.G., Oyarzabal O.A. 2010. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by flaA-RFLP, MLST, PFGE and RER-PCR. *Journal of Microbial Methods*, 84: 194-201.
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34: 597-601.
- CDC. 2010. Morbidity and mortality weekly report. 16. april 2010. Atlanta, CDC - Centers for Diseases Control and Prevention: 418 – 421.
<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm5914.pdf> (januar, 2012)
- Champion O.L., Gaunt M.W., Gundogdu O., Elmi A., Witney A.A., Hinds J., Dorrell N., Wren B.W. 2005. Comparative phylogenomics of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals genetic markers predictive of infection source. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 44: 16043-16048.
- Colles F.M., Jones M.K., Harding R.M., Maiden M.C. 2003. Genetic diversity of *Campylobacter jejuni* isolates from farm animals and the farm environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7409-7413.
- Čadež N., Štorman A. 2004. Metodologija mikrobiološke analitike s poudarkom na novjših mikrobioloških metodah. V: Varnost živil. 22. Bitenčevi živilski dnevi, Radenci, 18. in 19. marec 2004. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81-92.
- De Haan C., Kivistö R.I., Hakkinen M., Corander J., Hänninen M. L. 2010a. Multilocus sequence types of Finnish bovine *Campylobacter jejuni* isolates and their attribution to human infections. *BMC Microbiology*, 10: 200, doi: 10.1186/1471-2180-10-200: 9 str.
- De Haan C., Kivistö R.I., Hakkinen M. 2010b. Association of *Campylobacter jejuni* Cj0859c Gene (*fspA*) variants with different *C. jejuni* multilocus sequence types. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 6942-6943.
- Dingle K.E., Colles F.M., Wareing D.R., Ure R., Fox A.J., Bolton F.E., Bootsma H.J., Willems R.J., Urwin R., Maiden M.C. 2001. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 14-23.
- Dingle K.E., Colles F.M., Ure R., Wagenaar J.A., Duim B., Bolton F.J., Fox A.J., Wareing D.R., Maiden M.C. 2002. Molecular characterization of *Campylobacter jejuni*

- clones: a basis for epidemiologic investigation. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 949-955.
- Dingle K.E., McCarthy N.D., Cody A.J., Peto T.E.A., Maiden C.J. 2008. Extended sequence typing of *Campylobacter* spp., United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 10: 1620-1622.
- Djordjevic S.P., Unicomb L.E., Adamson P.J. Micken L., Rios R. 2007. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing are reliably predicted by restriction fragment length polymorphism analyses of the *flaA* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 1: 102-108.
- Duim B., Vandamme P.A., Rigtter A., Laeven S., Dijkstra J. R., Wagenaar J. A. 2001. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. *Microbiology*, 147: 2729-2737.
- Eberle K.N., Kiess A.S. 2012. Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. *Poultry Science*, 91: 255- 264.
- EFSA. 2009. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union 2007. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 109 – 133.
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/223r.pdf> (december, 2011)
- EFSA. 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2008, Part B: *Campylobacter*. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 3 str.
<http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/1503.pdf> (januar, 2012)
- EFSA. 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. Parma, EFSA-European Food Safety Authority: 442 str.
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf> (junij, 2012)
- Enright M.C., Spratt B.G. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology*, 7: 482-487.
- Fitzgerald C., Stanly K., Andrew S., Jones K. 2001. Use of pulsed-field gel electrophoresis and flagellin typing in identifying clonal groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in farm and clinical trials. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1429-1436.
- Foley S.L., Lynne A.M., Navak R. 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, 9: 430-440.
- Fourney R.M. 2002. Forensic reality and the practical experience of DNA typing update. Ottawa, National DNA Data Bank, Forensic Laboratory Services: 27 str.
<http://www.isrcl.org/Papers/Fourney.pdf> (januar, 2012)
- Griekspoor P., Engvall E.O., Olsen B., Waldenström J. 2009. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* from broilers. *Veterinary Microbiology*, 140: 180-185.
- Grimont F., Grimont P.A., 1986. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie*, 137B: 165-175.
- Guerry P. 2007. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology*, 15: 456-471.

- Habib I., Uyttendaele M., De Zutter L. 2010. Survival of poultry-derived *Campylobacter jejuni* of multilocus sequence type clonal complexes 21 and 45 under freeze, chill, oxidative, acid and heat stresses. *Food Microbiology*, 27: 829-834.
- Hedberg C.W., Smith K.E., Besser J. M. 2001. Limitations of pulsed-field gel electrophoresis for the routine surveillance of *Campylobacter* infectious. *Journal of Infectious Diseases*, 184: 242-244.
- Horrocks S.M., Anderson R.C., Nisbet D.J., Ricke S.C. 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Food Microbiology*, 15:18-25.
- Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117: 237-257.
- IVZ. 2009. Letno (2008) poročilo oddelka za MM (bakteriologija). Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 10 str.
http://www.ivz.si/Mp.aspx?nn=Print&pi=5&_5_id=975&_5_PageIndex=0&_5_groupId=-2&_5_newsCategory=IVZ%20kategorija&_5_action>ShowNewsFull (avgust, 2011)
- IVZ. 2010. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2009. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 47 – 48.
http://www.ivz.si/nalezljive_bolezni_aktualno?pi=5&_5_FileName=2491.pdf&_5_MediaId=2491&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (februar, 2012)
- Kado C.I., Liu S.T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*, 145: 1365-1373.
- Kapperund G., Espeland G., Wahl E., Walde A., Herikstad H., Gustavsen S., Tveit I., Natas O., Bevanger L. 2003. Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway. *American Journal of Epidemiology*, 158, 3: 234-242.
- Klančnik A., Botteldoorn N., Herman L., Smole Možina S. 2006. Survival and stress induced expression of *groEL* and *rpoD* of *Campylobacter jejuni* from different growth phases. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 200-207.
- Korczak B.M., Zurfluh M., Emler S., Kuhn-Oertli J., Kuhnert P. 2009. Multiplex strategy for multilocus sequence typing, fla typing, and genetic determination of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates collected in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 7: 1996-2007.
- Kwan S.L.P., Birtles A., Bolton F.J., French N.P., Robinson S.E., Newbold L.S., Upton N.M., Fox A.J. 2008. Longitudinal study of the molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in cattle on dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 12: 3662-3633.
- Levesque S., Frost E., Arbeit R.D., Michaud S. 2008. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* isolates from humans, chickens, raw milk, and environmental water in Quebec, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 10: 3404-3411.
- Levesque S.H., Michaud S., Arbeit R.D., Eric H.F. 2011. High-resolution melting system to perform multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni*: Sequence typing of *Campylobacter jejuni*. *Plos One*, 6,1: e161617, doi:10.1371/journal.pone.0016167: 9 str.

- Linton D., Karlyshev A.V., Wren B.W. 2001. Deciphering *Campylobacter jejuni* cell surface interactions from the genome sequence. *Current Opinion in Microbiology*, 4: 35-40.
- Lior H., Woodward D.L., Edgar J.A., Laroche L.J., Gill P. 1982. Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heatlabile antigenic factors. *Journal of Clinical Microbiology*, 15:761–768.
- Maiden M.C.J., Bygraves A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 3140-3245.
- Magnússon S.H., Guðmundsdóttir R., Reynisson E., Rúnarsson A.R., Harðardóttir H., Gunnarson E. 2011. Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates from human, food, veterinary and environmental sources in Iceland using PFGE, MLST and fla-SVR sequencing. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 4: 971–981.
- Manning G., Dowson C.G., Bagnall M.C., Ahmed I.H., West M., Newell D.G. 2003. Multilocus sequence typing for comparison of veterinary and human isolates of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 11: 6370-6379.
- Mayer L.W. 1988. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology*, 1: 228-243.
- Mackay I.M. 2007. Real-time PCR in microbiology: From diagnosis to characterization. Norfolk, Caister Academic Press: 40 str.
- McTavish S.M., Pope C.E., Nicol C., Campbell D., French N., Carter P.E. 2009. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni*, and the correlation between clonal complex and pulsed-field gel electrophoresis macrorestriction profile. *FEMS Microbiology Letters*, 298, 2: 149-156.
- Meinersmann R.J., Phillips W.R., Hiatt L.K., Fedorka-Cray P. 2005. Differentiation of *Campylobacter* populations as demonstrated by flagellin short variable region sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 6368-6374.
- Mellman A., Mosters J., Bartelt E., Roggentin P., Ammon A., Friedrich A.W., Karch H., Harmsen D. 2004. Sequence-based typing of *flaB* in more stable screening tool than typing of *flaA* for monitoring of *Campylobacter* populations. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 4840-4842.
- Miller V.S., Miller W. G., Behringer M., Hariharan H., Matthew V., Oyarzabal O.A. 2009. DNA identification and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from faecal samples of chickens in Grenada. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 1041-1049.
- Miller W.G., On S.L. W., Wang G., Fontanoz S., Lastovica S.J., Mandrell R.E. 2005. Extended multilocus sequence typing system for *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. helveticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 2315-2329.
- Nachamkin I., Bohachik K., Patton C.M. 1993. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 6: 1531-1536.
- Nachamkin I., Blaser J.M. 2000. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, ASM Press: 472 str.

- Nesbit E.G., Gibbs P., Dreesen D.W., Lee M.D. 2002. Epidemiological features of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry broiler houses and surrounding environments as determined by use of molecular strain typing. *American Journal of Veterinary Research*, 62: 190-194.
- Newell D.G. 2002. The ecology of *Campylobacter jejuni* in avian and human hosts and the environment. *International Journal of Infections Diseases*, 6, Suppl. 3: S16-S21.
- Nielsen E.M., Engberg J., Fussing V., Petersen L., Brogren, C.H., On S.L. 2000. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3800–3810.
- Ocepek M. 2010. Zaključno poročilo o rezultatih opravljenega raziskovalnega dela na projektu v okviru ciljnega raziskovalnega programa (crp) "Konkurenčnost Slovenije 2006-2013. Ljubljana, ARRS - Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije: 15 str.
- Olsen J.E., Brown D.J., Skov M. N., Christensen J.P. 1993. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis: Applications in investigations of salmonellosis among livestock. *Veterinary Quarterly*, 15: 125–135.
- Olson K.E., Ethelberg S, van Pelt W, Tauxe R.V. 2008. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations. V: *Campylobacter 3rd*. Nachamkin I., Szymanski C.M. Blaser M.J. (eds.). Washington, ASM Press: 163-189.
- Park F. S. 2002. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 177 – 188.
- Parsons B.N., Cody A.J., Porter C.J., Stavisky J., Smith J.L., Williams N.J., Leatherbarrow A.H.J, Hart C.A., Gaskell R.M., Dingle K.E., Dawson S. 2009. Prevalence of *Campylobacter* spp. in a cross-sectional study of dogs attending veterinary practices in the UK and risk indicators associated with shedding. *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 11: 3466-3471.
- Penner J.L., Hennessy N. 1980. Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heatstable antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 12:732–737.
- Petersen L., Nielsen E.M., On S.L.W. 2001. Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. *Veterinary Microbiology*, 82: 141-154.
- Sails A.D., Swaminathan B., Fields P.I. 2003. Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 10: 4733–4739.
- Shi F., Chen Y.Y., Wassenaar T.M., Woods W.H., Coloe P.J., Fry B.N. 2002. Development and application of a new scheme for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 5: 1791-1797.
- Vos P., Rogers R, Bleeker M., Reijans M., Van De Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman M., Kuiper M., Zabeaz M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleus Acids Research*, 23: 4407-4414.
- Wassenaar T.M., Newell D.G. 2000. Genotyping of *Campylobacter* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1: 1-9.
- Wiedmann M. 2002. Subtyping of bacterial food-borne pathogens. *Nutrition Reviews*, 60: 201-208.

- Wolfs T.F., Duim B., Geelen S.P., Rigter A., Thomson-Carter F., Fler A., Wagenaar J.A., 2002. Neonatal sepsis by *Campylobacter jejuni*: genetically proven transmission from a household puppy. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 97-99.
- Zautner A.E., Herrmann S., Corso J., Tareen Malik A., Alter T., Gross U. 2011. Epidemiological association of different *Campylobacter jejuni* groups with metabolism-associated genetic markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 7: 2359-2365.
- Zhang M., Gu Y., He L., Ran L., Xia S., Han X., Li H., Zhou H., Cui Z., Zhang J. 2010. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from north China. *Journal of Medical Microbiology*, 59: 1171-1177.
- Zhang W., Qi W., Albert T.J., Motiwala A.S., Alland D., Hyytia-Trees E.K., Ribot E.M., Fields P.I., Whittam T.S., Swaminathan B. 2006. Probing genomic diversity and evolution of *Escherichia coli* O157 by single nucleotide polymorphisms. *Genome Research*, 16: 757-767.
- Zorman T., Heyndrickx M., Uzunović-Kamberovič S., Smole Možina S. 2006. Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. *International Journal of Food Microbiology*, 110: 24-33.

ZAHVALA

Prof. dr. Sonji Smole Možina se zahvaljujem za mentorstvo in za strokovno vodenje pri nastanku diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi somentorici doc. dr. Neži Čadež, da me je vpeljala v raziskovalni svet in me naučila sprejemati vzpone in padce v raziskovalnem svetu.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Darji Žgur Bertok za hiter in strokoven pregled in končno podobo diplomske naloge.

Največja zahvala gre mojim staršem, sestri in Martinu, ki so me skozi študijska leta spodbujali in stali ob strani tako ob dobrih kot slabih študijskih pripetljajih.

Nenazadnje bi se zahvalila vsem prijateljicam in prijateljem za vso spodbudo in čarobne besede, ko sem le-te najbolj potrebovala.