



**Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ во Скопје**  
**Факултет за ветеринарна медицина - Скопје**  
**Школа за докторски студии**  
**Безбедност на Храна**



**Љупчо Ангеловски**

**ТИПИЗАЦИЈА НА *SAMPYLOBACTER* spp. ВО ЛАНЕЦОТ НА ХРАНА**

**Докторска дисертација**

**Ментор: Проф. д-р Павле Секуловски**

**Скопје, 2021**

Универзитет „Свети Кирил и Методиј“ во Скопје  
Факултет за ветеринарна медицина - Скопје

Љупчо Ангеловски

**ТИПИЗАЦИЈА НА *CAMPYLOBACTER* spp. ВО ЛАНЕЦОТ НА ХРАНА**

**Клучни зборови:** *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, пилешко месо, гени на резистенција, гени на вируленција, сезонска преваленца

**TYPING OF *CAMPYLOBACTER* spp. IN THE FOOD CHAIN**

**Key words:** *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, chicken meat, resistance genes, virulence genes, seasonal prevalence

Докторска дисертација

Скопје, 2021

Лабораториските истражувања во оваа докторска дисертација во целост беа изработени во Лабораторијата за микробиологија на храна и добиточна храна и во Лабораторијата за молекуларна микробиологија при Институтот за храна на Факултет за ветеринарна медицина - Скопје.

**Ментор:** Проф. д-р Павле Секуловски

**Датум на одбрана:** 09.2021 година

**Членови на Комисија за одбрана:**

Проф. д-р Деан Јанкулоски, претседател

Проф. д-р Павле Секуловски, член

Проф. д-р Зехра Хајрулаи Муслиу, член

Проф. д-р Искра Цветковиќ, член

Проф. д-р Радмила Чрчева Николовска, член

## **Благодарност**

На мојот ментор и професор, проф. д-р Павле Секуловски му изразувам огромна благодарност за искрената соработка, несебичната помош и безрезервната поддршка во текот на целокупното мое стручно и научно усовршување.

На проф. д-р Деан Јанкулоски му благодарам за поддршката, стручните совети и насоки при изработката на докторската дисертација.

На проф. д-р Зехра Хајрулаи Муслиу и благодарам за советите од почетокот на моите докторки студии, па се до одбраната на дисертацијата.

На проф. д-р Радмила Чрчева Николовска и проф. д-р Искра Цветковиќ им благодарам за сите корисни и стручни совети и предлози при изработката на финалната верзија на дисертацијата.

На проф. д-р Игор Џацовски, проф. д-р Кирил Крстевски, д-р Катерина Благоевска и м-р Загорка Попова им благодарам за искрената соработка и стручните совети при изработката на дисертацијата.

На проф. д-р Елена Трајковска Докиќ и благодарам за професионалната поддршка и обезбедените хумани изолати.

На сите колеги од Факултетот за ветеринарна медицина, особено на колегите од Лабораторијата за микробиологија на храна, за нивната помош и залагање при изработката на оваа дисертација.

Огромна благодарност до Факултетот за ветеринарна медицина - Скопје што ми овозможи да го реализирам ова истражување.

Најголема благодарност им должам на моето семејство и пријателите за огромната поддршка и разбирањето, трпението и безусловната поддршка во текот на изработката на докторската дисертација.

## ТИПИЗАЦИЈА НА *CAMPYLOBACTER* spp. ВО ЛАНЕЦОТ НА ХРАНА

### ИЗВАДОК

*Campylobacter* spp. моментално е најчестиот предизвикувач на акутни гастроентеритиси кај луѓето во Европа. Во најголем дел инфекцијата со *Campylobacter* spp. кај луѓето потекнува од контаминирано пилешко месо и производи од пилешко месо. При инфекција кај луѓето со термотолерантни кампилобактерии, надокнадувањето на течности и електролити е основна симптоматска терапија кај повеќето пациенти, бидејќи луѓето најчесто оздравуваат без примена на антимикуробна терапија. Исходот на болеста зависи од имунолошкиот статус на пациентот и вирулентните карактеристики на кампилобактериите. Затоа, во клиничките случаи каде пациентот има висока температура и крвав пролив или кога се работи за новороденчиња, деца, трудници и лица со ослабен имунитет неопходна е антибиотска терапија. Во последните декади антимикуробната резистенција е се поприсутен феномен кај *Campylobacter* spp. и кај другите патогени микроорганизми присутни во храната.

За целите на ова истражување вкупно се тестирани 283 примероци со потекло од живина. Од фазата на примерно производство т.е. одлгедување на бројлерите се земени 64 примероци на брисеви од клоака. Од фазата на колење се земени вкупно 166 примероци на цекуми и од фазата пред продажба т.е. пред дистрибуција до потрошувачите се земени 53 примероци на брисеви од трупови.

За изолација и конфирмација на *Campylobacter* spp. се користеше методата опишана во ISO стандардот 10272-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. -- Part 1: Detection method.

Добиените изолати на *Campylobacter* spp. поточно термотолерантните кампилобактерии беа потврдени и со тестирање со PCR метода за идентификација на кампилобактериите. Потврдените изолати на *C. jejuni* и *C. coli* во понатамошниот дел од истражувањето беа анализирани со PCR метода за детекција на гените на антимикуробна резистенција (*CmeB*, *Bla<sub>OXA-61</sub>*, *tet(O)*, *aph-3-1* и *aadE*). За да се добие увид во вирулентните карактеристики на најчестиот претставник на овој вид (*C. jejuni*), неговите изолати беа

тестирани со помош на PCR методата за присуство на гените на вируленција (*flaA*, *cadF*, *racR*, *virB11*, *dnaJ*, *ciaB*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* и *wlaN*).

*Campylobacter* spp. беше изолиран од 169 мостри или процентуално од 59,7% од вкупно земените мостри. Најголем процент на изолирани камполибактерии е забележан во фармата и тој изнесува 73,4%. Од производната фаза - кланица процентот на изолирани соеви кај примероците на цекуми изнесуваше 61,4%, додека во фазата ладилник забележан е најнизок процент (37,7%) на идентификувани *Campylobacter* видови.

Во направеното истражување за присуство на гените на резистенција генот *Bla<sub>oxa-61</sub>* беше присутен во 25%, додека гените *tet(O)* и *CmeB* беа потврдени во 19,4% од изолатите на *C. jejuni*. Кај изолатите на *C. coli* генот *CmeB* беше потврден кај 94,3%, додека *tet(O)* генот го носеа 40% од изолатите.

Од аспект на вирулентните карактеристики, гените *cadF* и *ciaB* беа утврдени кај сите изолати на *C. jejuni*. Гените *cdtA* и *cdtB* беа детектирани кај 52,7% од испитуваните изолати, додека пониска преваленца беше потврдена за гените *flaA* (50%) и *cdtC* (47,2%).

На основа на наодите на ова истражување може да се заклучи дека е присутна колонизацијата на живината со кампилобактерии и дека пилешкото месо претставува причина за појава на алиментарни гастроинтестинални заболувања кај луѓето. Затоа, во интерес на јавното здравје е да се применат сите расположливи стратегии за намалување на процентот на колонизирани единки на фармата и контаминирани трупови на кланица.

**Клучни зборови:** *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, пилешко месо, гени на резистенција, гени на вируленција, сезонска преваленца.

## TYPING OF *CAMPYLOBACTER* spp. IN THE FOOD CHAIN

### ABSTRACT

*Campylobacter* spp. is currently the most common cause of acute gastroenteritis in humans in Europe. The majority of *Campylobacter* spp. infections in humans comes from contaminated chicken meat and chicken products. In the case of an infection with thermotolerant campylobacters, the replacement of fluids and electrolytes is the basic symptomatic therapy in most patients, and the infection is most often cured without the use of antimicrobial therapy. The outcome of the disease depends on the patient's immune status and the virulence characteristics of the campylobacteria. Therefore, in clinical cases where the patient has a high fever and bloody diarrhea or in cases including newborns, children, pregnant women and immunocompromised individuals, antibiotic therapy is necessary. In recent decades, antimicrobial resistance has become a phenomenon in *Campylobacter* spp. and other pathogenic microorganisms present in food.

For the purposes of this study, a total of 283 different poultry samples were tested. From the stage of primary production i.e. broiler farm, 64 samples of cloacal swabs were taken. A total of 166 caecum samples were taken from the slaughtering phase and from the pre-sale phase, i.e. before distribution to the consumers, 53 specimens of carcass swabs were taken.

The method described in ISO standard 10272-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method was used for isolation and confirmation of *Campylobacter* spp.

The obtained isolates of *Campylobacter* spp., also called “thermotolerant campylobacteria” were also confirmed by PCR testing method for the identification of campylobacteria. The confirmed isolates of *C. jejuni* and *C. coli* in the further part of the study were analyzed by PCR method for detection of antimicrobial resistance genes (*CmeB*, *Bla<sub>OXA-61</sub>*, *tet(O)*, *aph-3-1* and *aadE*). In order to gain insight into the virulence characteristics of the most common representative of this species (*C. jejuni*), its isolates were tested using the PCR method for the presence of virulence genes (*flaA*, *cadF*, *racR*, *virB11*, *dnaJ*, *ciaB*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* and *wlaN*).

*Campylobacter* spp. was isolated from 169 samples (59.7%) of the total samples taken. The highest percentage of isolated campylobacteria was recorded at the farm and it was 73.4%. From the next phase - slaughterhouse, the percentage of isolated strains in the caecum samples

was 61.4%, while in the cold storage phase the lowest percentage (37.7%) of identified *Campylobacter* species was recorded.

In the study part aimed for detection of presence of resistance genes, the  $\text{Bla}_{\text{OXA-61}}$  gene was present in 25%, while the *tet(O)* and *CmeB* genes were confirmed in 19.4% of *C. jejuni* isolates. In *C. coli* isolates the gene *CmeB* was confirmed in 94.3%, while the *tet(O)* gene was detected in 40% of the isolates.

From the aspect of virulence characteristics, the *cadF* and *ciaB* genes were detected in all of the isolates of *C. jejuni*. The *cdtA* and *cdtB* genes were detected in 52.7% of the tested isolates, while a lower prevalence was confirmed for the *flaA* (50%) and *cdtC* (47.2%) genes.

Based on the findings of this study, it can be concluded that the colonization of poultry with campylobacteria is present and that chicken meat is a cause of alimentary gastrointestinal diseases in humans. Therefore, it is in the public health interest to implement all available strategies to reduce the percentage of colonized chicken and contaminated slaughterhouse carcasses.

**Key words:** *Campylobacter* spp., *Campylobacter jejuni*, chicken meat, resistance genes, virulence genes, seasonal prevalence

## ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

Кратенка	Значење на кратенката
°C	Степен по Целзиус
µm	Микрометри
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
bp	Базен пар – base pair
CDC	Center for disease control
CDT	Cytolethal distending toxin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA/ ДНК	Дезоксирибонуклеинска киселина
EC	European Commission
EFSA	European Food Safety Authority
et al.	Соработници
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and drug administration
FRLS	фенилаланин – аргинин - леуцин – серин
GBS	Guillain-Barré синдром
H <sub>2</sub> S	Водород сулфид
IL-8	интерлеукин-8
ISO	International Organization for Standardization
kD	Кило далтон
KF	Цефалотин
log	логаритам
mCCDA	modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate agar
McF	Степени по McFarland
MIC	Minimal inhibitory concentration
ml	Милилитар
MLST	Multi locus sequence typing
mm	Милиметри
MOMP	Major outer membrane porin
NA	Налидиксична киселина
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
QRDR	Quinolone resistance-determining region
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphisms
RNA/ РНК	Рибонуклеинска киселина
RPP	Ribosomal protection protein
spp.	Species (вид)
ST	Sequence type
subsp.	Подвид
TBE	Tris- Borate-EDTA
TE	Tris-EDTA-Mg <sup>2+</sup>

TSI	Triple sugar iron
UK	United Kingdom
USDA	United States Department of Agriculture
VBNC	Viable non culturable <i>Campylobacter</i>
WHO	World Health Organization
ЕУ	Европска Унија
САД	Соединетите Американски Држави
СЗО	Светска здравствена организација
сл.	Слично
ФВМС	Факултет за ветеринарна медицина Скопје

## СОДРЖИНА

1. ВОВЕД.....	1
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА.....	3
2.1. Историјат.....	3
2.2. Таксономија и класификација.....	4
2.3. Морфологија и биохемиски карактеристики.....	5
3. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА.....	9
3.1. Извори на инфекција.....	11
3.2. Живината како примарен извор на инфекција.....	12
3.3. Домашните животни како резервоар на кампилобактериите.....	14
3.4. Клинички манифестации на болеста кај луѓето.....	15
3.5. Механизам на патогенеза и фактори на вируленција.....	15
3.6. Сезонски варијации на кампилобактериозата.....	23
4. ИЗОЛАЦИЈА, КОНФИРМАЦИЈА И ТИПИЗАЦИЈА НА <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP.....	24
4.1. Изолација и конфирмација на <i>Campylobacter</i> spp.....	24
4.2. Типизација на <i>Campylobacter</i> spp.....	24
4.2.1 Фенотипски методи.....	25
4.2.2. Генотипски методи.....	26
4.3. Антимикробна осетливост на <i>Campylobacter</i> spp.....	28
4.3.1. Методи за утврдување на антимикробната осетливост.....	33
5. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО.....	36
6. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	38
6.1. Земање на мостри.....	38
6.2. Изолација и примарна идентификација (идентификација на родот) на изолираните соеви бактерии.....	39
6.2.1. Медиуми за култивирање.....	39
6.2.2. Селективно збогатување.....	41
6.2.3. Примарна изолација.....	42
6.2.4. Добивање на чисти култури.....	43

6.2.5. Примарна идентификација на родот на изолираните соеви.....	43
6.2.6. Складирање на изолираните соеви.....	44
6.3. Идентификација на видот.....	45
6.3.1. Идентификација на видот со диференцијални биохемиски тестови.....	45
6.4. Детекција и идентификација на изолатите на <i>Campylobacter</i> spp. со PCR метода.....	50
6.5. PCR метода за детекција на гени на вируленција кај изолати на <i>Campylobacter jejuni</i> .....	53
6.6. PCR метода за детекција на гени на резистенција кај изолати на <i>Campylobacter jejuni</i> и <i>Campylobacter coli</i> .....	55
7. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	57
7.1. Застапеност на кампилобактериите во фазите на производство на свежо пилешко месо.....	57
7.2. Сезонска застапеност на <i>Campylobacter</i> spp.....	65
7.3. Воведување и евалуација на PCR метода за детекција и идентификација на најчестите претставници на <i>Campylobacter</i> spp.....	67
7.4. Воведување и евалуација на PCR метода за детекција на гените носители на антиминокробната резистенција кај изолатите на <i>C. jejuni</i> и <i>C. coli</i> .....	68
7.4.1. Детекција и застапеност на генот <i>StxB</i> кај <i>C. jejuni</i> и <i>C. coli</i> .....	69
7.4.2. Детекција и застапеност на генот <i>Bla<sub>OXA-61</sub></i> кај <i>C. jejuni</i> и <i>C. coli</i> .....	70
7.4.3. Детекција и застапеност на генот <i>tet(O)</i> кај <i>C. jejuni</i> и <i>C. coli</i> .....	70
7.4.4. Детекција и застапеност на генот <i>aph-3-1</i> кај <i>C. jejuni</i> и <i>C. coli</i> .....	71
7.4.5. Детекција и застапеност на генот <i>aadE</i> кај <i>C. jejuni</i> и <i>C. coli</i> .....	72

7.5. Воведување и евалуација на PCR метода за детекција на гените на вируленција кај изолатите на <i>C. jejuni</i> .....	73
7.5.1. Детекција и застапеност на генот <i>flaA</i> кај <i>C. jejuni</i> .....	73
7.5.2. Детекција и застапеност на генот <i>virB11</i> кај <i>C. jejuni</i> .....	74
7.5.3. Детекција и застапеност на генот <i>cadF</i> кај <i>C. jejuni</i> .....	75
7.5.4. Детекција и застапеност на генот <i>racR</i> кај <i>C. jejuni</i> .....	76
7.5.5. Детекција и застапеност на генот <i>dnaJ</i> кај <i>C. jejuni</i> .....	77
7.5.6. Детекција и застапеност на генот <i>ciaB</i> кај <i>C. jejuni</i> .....	78
7.5.7. Детекција и застапеност на генот <i>wlaN</i> кај <i>C. jejuni</i> .....	79
7.5.8. Детекција и застапеност на гените <i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> и <i>cdtC</i> кај <i>C. jejuni</i> .....	80
7.5.9. Профили на вируленција кај <i>C. jejuni</i> .....	82
7.6. Апликација на применетите PCR методи кај хумани изолати.....	83
8. МЕРКИ И ИНТЕРВЕНЦИИ ЗА НАМАЛУВАЊЕ НА ЗАСТАПЕНОСТА НА КАМПИЛОБАКТЕРИИТЕ.....	86
9. ЗАКЛУЧОЦИ.....	89
10. ЛИТЕРАТУРА.....	91

## 1. ВОВЕД

*Campylobacter jejuni* за првпат бил детектиран во фецес во 1968 година со од страна на Butzler и Dekeyser (Butzler, 2000). Од тие рани почетоци па се до денес *Campylobacter* spp. се смета како еден од најважните причинители на гастроентеритиси кај луѓето низ целиот свет. Во еден извештај од 1997 година трошоците предизвикани од кампилобактериозата кај луѓето се проценети од 0,8-5,6 милијарди долари само во САД (Buzby, et al. 1997). Само во САД секоја година од оваа болест годишно се афектирани околу 2 милиона луѓе (Samuel, et al. 2004). Кај поголемиот дел од заболените лица со кампилобактериоза клиничката слика е проследена со крвава дијареја, стомачни грчеви и треска кои траат околу една недела. Според извештаите на CDC (Center for disease control) во САД годишно од оваа болест угинуваат просечно 124 луѓе. Кампилобактериозата исто така се поврзува со автоимуното заболување Guillain-Barré синдром, при кое се пореметува имунолошкиот систем и тој ги напаѓа нервите (најчесто периферните) при што доаѓа до парализа која може да трае неколку недели. Од оваа состојба е погоден еден од илјада заболени од кампилобактериоза (Friedman, et al., 2000). Новороденчињата и децата помали од пет години спаѓаат во најризичната категорија при инфекцијата со оваа патогена бактерија.

Случаите на кампилобактериоза се најчесто спорадични, но во литературата се среќаваат случаи на групни труења. Спорадичните случаи се поврзуваат со неправилно ракување со храната и недоволна термичка обработка на пилешко, свинско или говедско месо, контакт со домашни животни и миленици како и при вкрстена контаминација на површините. Помасовните труења се најчесто резултат на консумација на контаминирано сурово млеко или вода.

Кампилобактериозата е најчесто самолимитирачка болест, но во потешки случаи е потребна антибиотска терапија за олеснување на симптоматологијата. Најчесто користени антибиотици при инфекции со *Campylobacter* се макролидните (еритромицин, кларитромицин или азитромицин) или флуорокинолонските препарати (ципрофлоксацин, левофлоксацин, гатифлоксацин или моксифлоксацин). По направените студии е утврдена една многу интересна опсервација за *Campylobacter* во поглед на инфективната доза која може да биде многу ниска и да изнесува само 500 бактериски клетки (Robinson, 1981).

Високите трошоци надополнети со ниската инфективна доза и покажаната антимикробна резистенција на кампилобактериите ја оправдува потребата за понтамошни студии за подобро да се разберат условите за нивното преживување и присуство кај домашните животни и секако ризикот од нивната појава во ланецот на храна (од нива до трпеза).

Оваа дисертација има за цел да допринесе во неколку области, да се утврди присуството на микророганите во пилешкото месо како примарен резервоар за истите со класични микробиолошки методи, но и со користење на молекуларни методи, присуството на гени на вируленција кај изолираните кампилобактерии од што зависи тежината на клиничката слика кај заболените луѓе, но и да се утврди присуството на гени носители на антимикробната резистенција кај кампилобактериите.

## 2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

### 2.1. ИСТОРИЈАТ

*Campylobacter* за првпат бил опишан во 1880 година од страна на Theodor Escherich, кој во 1886, публикувал серија на написи во списанието *Münchener Medizinische Wochenschrift* во кое ги опишал спиралните бактерии пронајдени во дебелите црева на деца кои починале од таканаречената “*cholera infantum*”. За несреќа, овие записи публикувани на Германски јазик не биле пронајдени повеќе декади се до нивната презентација од страна на Kist на Third International Workshop одржан во Отава, Канада во 1985 година (Friedman *et al.*, 2000).

Во 1909 година, двајца ветеринари McFadyean и Stockman ја опишале поврзаноста на овој микроорганизам со епизоотските абортуси кај овци. Неколку години подоцна утврдено е дека истата бактерија тогаш нарекувана *Vibrio* може да се најде и при абортуси кај кози и крави, а во 1919 година од абортиран фетус на теле Smith and Taylor, 1919 го изолирале истиот микроаерофилен спирален микроорганизам кој поради неговата морфологија во вид на заправка го именувале како “*Vibrio fetus*” и болеста била наречена “Вибрионски абортус” (Franco, 1988).

Во 1931 година бил потврден нов *Vibrio* микроорганизам кој предизивикувал дизентерија кај телињата за време на зимскиот период и неговото предложено име било *Vibrio jejuni* (Franco, 1988). *Vibrio jejuni* бил изолиран прв пат кај човекот при појава на труење со млеко на 355 лица во САД во 1938 година (Levy, 1946). Овој настан претставува и прв јасно документиран случај за труење со бактеријата *Campylobacter* spp. Во доцните 50-ти години од минатиот век овој микроорганизам бил детектиран во примероци крв кај мали деца со проливи. Во тоа време било потврдено и дека оптималната температура за раст на овој микроорганизам е 42°C. Подоцна оваа бактерија е изолирана од луѓе кои имале акутна дијареа, и соодветно изолираните соеви биле морфолошки доста слични со бактериите кои претходно биле изолирани од живината. Документираните случаи од Dekeyser *et al.*, 1972 за *Campylobacter* spp. изолиран од фецес и крв кај жена која имала фебрилен акутен хеморагичен ентеритис и на Skirrow, 1977, од бебе со фебрилна дијареа, се меѓу првите поголеми чекори кои доведоа изолацијата на кампилобактериите, денес да биде рутинска анализа во микробиолошките лаборатории кои вршат анализа на прехранбени производи и/или во институциите кои се занимаваат со здравјето на луѓето и животните.

## 2.2. ТАКСОНОМИЈА И КЛАСИФИКАЦИЈА

*Campylobacter* spp. како нов род е формиран (документиран) во 1963 година, а неговото име доаѓа од грчките зборови *campylo* (закривена форма) и *bacter* (стапче). Бактеријата претходно именувана како *Vibrio fetus*, во 1973 година е рекласифицирана во *Campylobacter fetus*, а сродните два вида во *C. jejuni* и *C. coli* (Veron and Chatelain, 1973). Соодветната научна класификација на кампилобактер е следната:

Царство:	<i>Bacteria</i>
Оддел:	<i>Proteobacteria</i>
Класа:	<i>Epsilonproteobacteria</i>
Ред:	<i>Campylobacterales</i>
Фамилија (семејство):	<i>Campylobacteraceae</i>
Род:	<i>Campylobacter</i>



Новата фамилија *Campylobacteraceae* е предложена во 1991 год. и таа денес формира кохерентна филогенетска група во редот *Campylobacterales* и класата *Epsilonproteobacteria*, составена од родовите *Campylobacter*, *Arcobacter* и *Sulfurospirillum*, како и неклассифицираниот вид *Bacteroides ureolyticus* (Garrity et al., 2005). Во родот *Campylobacter* денес познато е дека припаѓаат 16 видови и 6 подвидови кои се прикажани во табелата 1.

Табела 1. Видови на бактерии во родот *Campylobacter*

1. <i>C. fetus</i> (подвидови: <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> и <i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> )	9. <i>C. jejuni</i> (подвидови: <i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> и <i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i> )
2. <i>C. coli</i>	10. <i>C. lanienae</i>
3. <i>C. concisus</i>	11. <i>C. lari</i>
4. <i>C. curvus</i>	12. <i>C. mucosalis</i>
5. <i>C. gracilis</i>	13. <i>C. rectus</i>
6. <i>C. helveticus</i>	14. <i>C. showae</i>
7. <i>C. hominis</i>	15. <i>C. upsaliensis</i>
8. <i>C. hyointestinalis</i> (подвидови:	16. <i>C. sputorum</i> (биовариетети <i>C. sputorum</i> bv. <i>sputorum</i> ,

<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i> и <i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>Lawsonii</i> )	<i>C. sputorum</i> bv. <i>faecalis</i> и <i>C. sputorum</i> bv. <i>paraureolyticus</i> )
---	---

Видовите *C. concisus*, *C. curvus*, *C. hominis*, *C. sputorum*, *C. rectus*, *C. showae* и *C. gracilis* се филогенетски блиски. Повеќето од нив може да се детектираат во усната празнина кај луѓето. *C. hominis* е откриен само во хуманиот дигестивен тракт, додека бактеријата од видот *C. sputorum* (со нејзини два подвида) е изолирана од дигестивниот и репродуктивниот тракт на овци и говеда (On et al., 1998).

*Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. laninae*, *C. fetus* subsp. *veneralis* и *C. fetus* subsp. *fetus* се исто така филогенетски доста слични. *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis* најчесто се наоѓа во говедскиот репродуктивен тракт и е поврзан со бовината генитална кампилобактериоза. Главни домаќини на *C. fetus* subsp. *fetus* се говедата и овците и овој подвид е поврзуван со спонтаните абортуси кај овие животни.

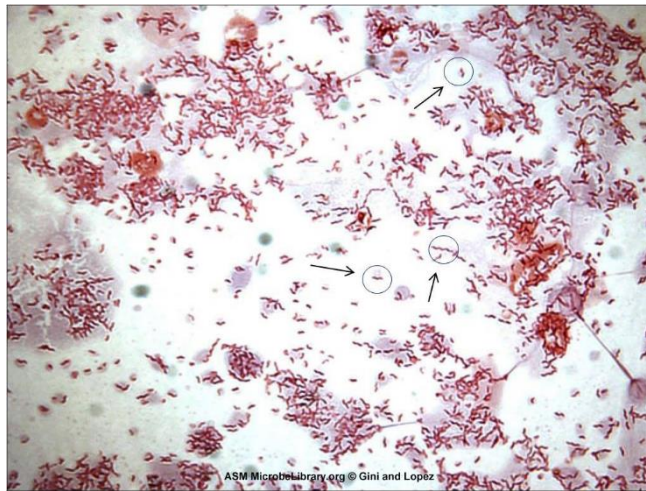
### 2.3. МОРФОЛОГИЈА И БИОХЕМИСКИ КАРАКТЕРИСТИКИ

Долго време, таксономското истражување на *Campylobacter* се засновало врз фенотипските карактеристики кои биле тешки за стандардизација. Конечно во 1963 година Sebald и Véron ги класифицирале овие микроаерофилни микроорганизми како нов род наречен *Campylobacter* (Hébert et al., 1982). Десет години подоцна издадена е првата опсежна таксономија на *Campylobacter* од страна на Véron и Chatelain при што тие ги вбројуваат *Vibrio jejuni* и *Vibrio coli* во овој род. Подоцна овие имиња се прифатени од страна на Интернационалниот комитет за системска бактериологија (Skirrow and Benjamin, 1980).

Бактериите од родот *Campylobacter* се Грам негативни, оксидаза и каталаза позитивни, не формираат спори, и не ги ферментираат или оксидираат јаглехидратите (Ursing et al., 1994). Повеќето видови ги редуцираат нитратите, но само *C. jejuni* е хипурат-позитивен. Типични биохемиски реакции во идентификација на бактериите вклучуваат редукција на фумаратот до сукцинат, продукција на индол, продукција на ацетоин. Ензимите кои ги лачат кампилобактериите како супероксид дисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатион синтетаза и глутатион редуктаза имаат огромно значење за заштита од токсичното влијание на кислородот (Crushell et al., 2004).

Бактериите се извиени во вид на буквата S или во вид на спирални стапчиња,

широки 0,2-0,8  $\mu\text{m}$  и долги 0.5-5  $\mu\text{m}$ , чиј микроскопски изглед е прикажан на сликата 2.1. Кампилобактериите се движат со помош на флагелуми и ова брзо, ротирачко движење може да се види со фазно-контрастен микроскоп. Интересно е да се спомене способноста на *Campylobacter* spp. за трансформација во топчеста форма при зголемен стрес, најчесто во контакт со кислород (Morgan and Upton, 1987). При оваа трансформација, *Campylobacter* spp. може да влезе во фазата т.н. “viable non-culturable”, стадиум каде бактериите се живи, но не можат да се потврдат со култивирање на класичните подлоги (Rollinson and Colwell, 1986).

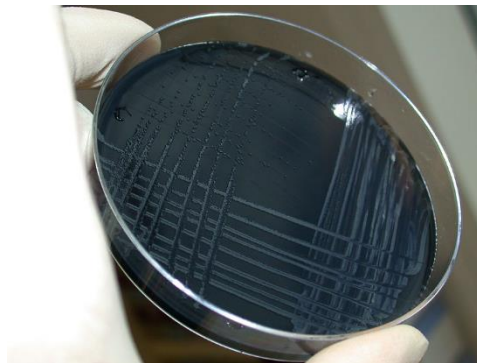


Слика 1. Микроскопски изглед на *Campylobacter jejuni*

*Campylobacter* spp. се споро растечки бактерии кои бараат посебни услови за култивирање. Најдобро растат при намалено количество на кислород од 5 - 10%, на хранливи основни подлоги со додаток на 5-10% крв. Сите кампилобактерии растат добро на 37 °C за време од 24-48 часа. Видовите *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* и *C. upsaliensis* се често спомнувани како термофилни кампилобактерии, бидејќи повеќето соеви покажуваат оптимален раст на температура од 42-43°C. Видот *C. jejuni* се состои од два подвида, *C. jejuni* subsp. *jejuni*, кој е најчест причинител на акутните ентеритиси и *C. jejuni* subsp. *doylei*, кој се поврзува со детската дијареа во земјите во развој (Fernandez et al., 1997).

Изгледот (морфологијата) на колониите (слика 2.2.) не е препорачливо да се користи за разликување на видовите на кампилобактериите. Врз развојот на колониите влијаат: бактерискиот сој, основниот медиум за култивирање, нивото на влага на површината на агарот, инкубационата температура и време. Морфологијата на колониите може да варира кај различните видови кампилобактерии:

- *C. jejuni*. Можен е раст на два вида колонии на крвен агар. Првиот вид се ниски, сплескани, сиви, fino гранулирани и полупрозирни колонии со неправилни ивици и со тенденција на ширење по потезот на засадување, роење и слевање. Вториот вид се округли (1-2 mm во дијаметар), издигнати, конвексни, мазни, сјајни, со полупрозирна ивица на колонијата и потемен, непрозирен центар.
- *C. coli*. Колониите се округли, со дијаметар од 1 до 2 mm, издигнати, конвексни, мазни и сјајни. На влажни подлоги со крвен агар, колониите се рамни (сплескани), сивкасти и развлечени по потезот на засадување.
- *C. lari*. Колониите кои овој вид ги формира после 48 часа инкубација на крвен агар се транспарентни, конвексни и со дијаметар од 1-1,5 mm. Роење обично се појавува кога површината на агарот е многу влажна.
- *C. upsaliensis*. Формира мазни, во вид на точка, сивкасти или провидни колонии со дијаметар до 2 mm. Роење се јавува при раст на влажни подлоги на крвен агар.



Слика 2. Изглед на израснатата колонија на *Campylobacter jejuni* на mCCDA

#### Viabile non culturable *Campylobacter* - VBNC фаза

Во случај на неповолни услови за раст и размножување *Campylobacter* spp. поседува способност за формирање на живи некултурабилни клетки (VBNC) како што е наведено претходно (Portner et al., 2007). Изложеноста на кислород, дехидрација, ниски температури и кисела средина може да ја иницира конверзијата на кампилобактериите во оваа форма која што им овозможува да ја повратат нормалната форма (културабилна) штом надворешните услови ќе станат поволни за раст и размножување (Chaveerach et al., 2003; Klančnik et al., 2009). Ресукцитацијата на бактериските клетки во VBNC фазата е потврдена со пасажа на истите низ ембрионирани јајца што докажува дека тие ја задржуваат својата патогеност и понатака може да претставуваат опасност по јавното

здравје (Carpellier et al., 1999). Бактериските клетки во оваа VBNC фаза не се детектираат со класичните микробиолошки методи и техники што преставува уште една опасност кога се работи за кампилобактериите и нивното присуство во храната.

### 3. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА

Во развиените земји, *Campylobacter* е најчест причинител на акутните бактериски гастроентеритиси. Забележаните значителни варијации во манифестирањето на болеста во различни земји се смета дека се резултат на разликата во инфицираноста на домашните животни, системите за производство на храна, различните начини на подготовка на храната и сл. Разликите во регистрирањето на болеста т.е предизвикувачот може да се јават и поради разлики во дијагностицирањето или системите за известување (Brieseman et al., 1990). Според класичните медицински учебници, *Campylobacter*-ните ентеритиси најчесто се опишани преку симптоми на дијареа, нелагодност, треска и абдоминална болка. Спектарот на дијареа се движи од слаби течни столица преку обилни течни проливи па се до светло крвави столица (Iain, et al., 2006). Како најчест извор на бактеријата *Campylobacter jejuni* се смета гастроинтестиналниот тракт на животните кои се користат како храна, меѓу кои се вбројува и живината - кокошките (Tribble et al., 2010). Епидемиологијата на кампилобактериозата може да се разгледува од два аспекти. Едниот е поврзан со нејзина појава при која голем број луѓе развиваат клинички симптоми, а другиот аспект вклучува одделни или еден изолиран случај. Меѓутоа, истражувањата и известувањата потврдуваат дека 17% од хоспитализираните случаи на труења со храна во развиените земји (главно од животинско потекло) припаѓаат на бактеријата *Campylobacter jejuni*, со околу 2,5 милиони случаи годишно само во САД (Friedman et al, 2000). Од нив се смета дека летално завршуваат околу 5%, а според извештајот од Центарот за превенција и контрола на болестите во САД (Center for Disease Control and Prevention) потврдени се 124 смртни случаи годишно (Mead et al., 1999). Поради болестите предизвикани од *Campylobacter*, проценето е дека годишната економска загуба во САД изнесува околу 8 милијарди долари (Buzby et al., 1997).

Во епидемиолошка студија направена во ЕУ (Takkinen et al., 2003) само за 1999 година потврдени се 134.971 случаи на инфекции со *Campylobacter* во петнаесет од 18 земји. Во 1998 година, просечниот број на пријавени случаи изнесувал 61 / 100.000 жители, додека пак во 1999 година тој изнесувал 71 / 100.000. Ова претставува зголемување во бројот на пријавени инфекции од 16%. Од пријавените случаи, 48% биле предизвикани со храна како вектор на пренесување на кампилобактериите, 15% со непастеризирано млеко и 15% преку вода (Таухе, 1992; Takkinen et al., 2003). Според

тоа, во зависност од воспоставените национални програми за здравствен надзор (National Surveillance Scheme) во земјите од Европската унија, утврдено е дека бројот на непријавени случаи е поголем. На пример, во Велика Британија на секој пријавен изолат на *Campylobacter*, 7,6 случаи остануваат непријавени (Wheeler et al., 1999). Тоа потврдува дека не може јасно да се дефинира процентот на случаи на гастроентеритис кои имаат алиментарно потекло (труење или болест предизвикано со храна) бидејќи не постојат секогаш јасни извештаи за потеклото на "гастроентеритис" случаите.

Табела 2. Пријавени случаи на кампилобактериоза во неколку земји

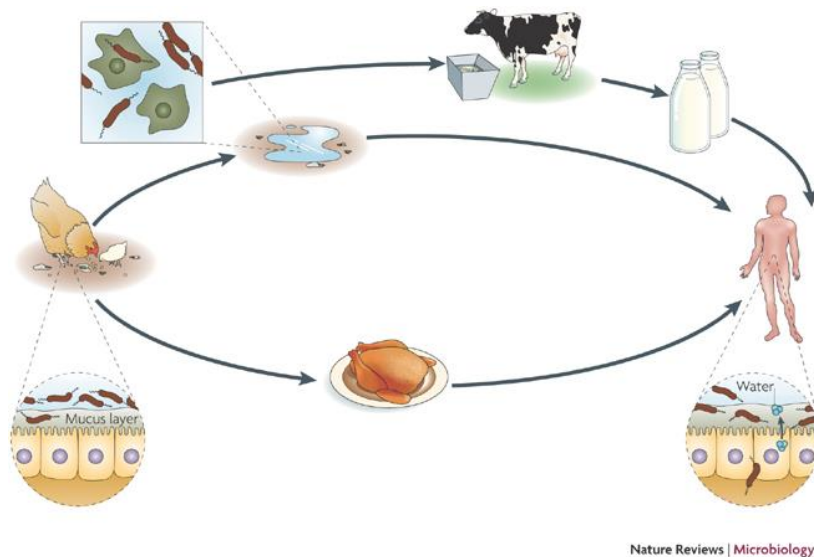
Земја	Период	Случаи на 100.000 жители	Извор
Велика Британија	2005	88.5	EFSA 2006
Германија	2005	75.3	EFSA 2006
Чешка	2005	302.7	EFSA 2006
Холандија	2005	46.2	EFSA 2006
Франција	2005	3.3	EFSA 2006
Шведска	2005	66.2	EFSA 2006
САД	2004	12.8	CDC 2006
Канада	2000	40.1	Lake et al.2007
Австралија	2003	116.5	Lake et al.2007
Нов Зеланд	2005	370.3	Lake et al.2007

Брзото откривање на *Campylobacter* spp. е од витално значење за хигиена на храната. Ниските концентрации на *Campylobacter jejuni* во храната и нивната подолготрајна постапка за изолација и идентификација како и цената на чинење на анализата доведуваат епидемиолошките студии на *C. jejuni* да бидат често и комплексни. Исто така, не сите клинички лаборатории и лаборатории кои испитуваат храна се опремени за изолирање и идентификување на *Campylobacter jejuni* со што спречувањето на појавата на труења (болести) со храна е на ниско ниво. *Campylobacter* или *Salmonella* се бактериите кои се најчестите предизвикувачи на труењата со храна во споредба со други агенси и истите согласно со препораките на СЗО мора да бидат постојано анализирани и документирани.

### 3.1. ИЗВОРИ НА ИНФЕКЦИЈА

Кампилобактериите го колонизираат гастроинтестиналниот тракт на голем број домашни и диви животни (истите се наоѓаат и во фекалиите од млечните крави, јагниња, говеда, патки и др.) и истите се главниот извор на пренесување на овие микроорганизми кај луѓето (Gorkiewicz et al., 2002; Nielsen et al., 1997). Како главен резервоар за инфекција на луѓето со ентеропатогени кампилобактерии, се посочува живината чиј гастроинтестинален тракт е најчесто колонизиран со *C. jejuni*. Освен живината, во повеќе студии е посочен и гастроинтестиналниот тракт на останатите животни кои се користат во исхраната на луѓето. Дигестивниот тракт кај различни животни може да биде колонизиран од различни кампилобактерии, со различна застапеност - кај клинички нормалните крави од 0 до 80%, а кај овците таа достигнува до 20% (Atabay and Corry, 1998).

Епидемиолошките студии идентификувале дека директниот контакт со животните, ракувањето при подготвувањето на пилешкото месо и исхраната со пилешко месо се најважни извори на кампилобактериоза кај луѓето (Austen et al., 1980; Cockerill, 1999). Останати извори на оваа инфекција можат да бидат површинските води, контаминираната вода за пиење и конзумацијата на сурово млеко. На сликата 3 е прикажана едноставна шема за начинот на пренесување на бактеријата кај луѓето.



Слика 3. Начини на пренесување на *Campylobacter* spp. (Young, 2007)

### 3.2. ЖИВИНАТА КАКО ПРИМАРЕН ИЗВОР НА ИНФЕКЦИЈА

За да се увиди колку е важно пилешкото месо како начин на пренесување на кампилобактериите, доволно е да се спомене фактот дека со појавата на кризата со диоксин во храната во 1999 година продажбата на пилешко месо беше забранета, а со тоа беше намален за 40% бројот на идентификувани случаи на кампилобактериоза во однос на претходните години. Исто така, при појавата на птичјиот грип во 2003 година во Холандија била намалена потрошувачка на пилешко месо, а со тоа бил забележан значаен пад во бројот на регистрирани случаи на кампилобактериоза (Friesema et al., 2012).

Покрај пилињата, сите видови живина (бројлери, несилки, мисирки, гуски, патки) можат да бидат носители на *Campylobacter* spp. Исто така и дивите птици се често колонизирани со овие бактерии (Cabrita et al., 1992) со што и консумацијата на нивното месо може да предизвика појава на кампилобактериоза кај луѓето. За разлика од месото, консумацијата на јајца од живината не придонесува кон појавата на хуманата кампилобактериоза, поради неможноста на *Campylobacter* spp. за вертикална трансмисија (од родител на потомство), што не е случај со бактеријата *Salmonella* spp. која се пренесува најчесто со консумација на заразени јајца (Atabay and Corry, 1998).

Еднодневните пилиња кои по правило доаѓаат од матични јата се слободни од *Campylobacter* spp, и се првиот стадиум од циклус на одгледување на бројлери во живинарските фарми. Во многу студии е опишано дека колонизацијата изостанува во првите две недели од одгледувањето на пилињата, кое се припишува на т.н. “lag” фаза. Појавата на позитивни јата на *Campylobacter* spp. варира и зависи од континентот, климатската зона и годишното време каде се одгледуваат пилињата. Од *Campylobacter* бактериите, видот *C. jejuni* се смета дека најчесто се јавува кај бројлерите, поретко *C. coli*, а најретко се среќаваат видовите *C. lari* и *C. upsaliensis* (Newell and Wagenaar, 2000). *C. upsaliensis* е детектиран и во дигестивниот тракт на патки (Ridsdale et al., 1998). Пилињата често може да бидат инфицирани со повеќе соеви на *Campylobacter* spp. (Boes et al., 2005). Овие мешавини на повеќе соеви доведуваат до ситуации на измена на ДНК, појава на соеви со нови карактеристики и зголемена разноликост на истите (Ang and Nachman, 2003). Најчесто изолиран по 6 недели одгледување на животните е *C. jejuni*, додека кај постари животни се зголемува процентот на изолати на *C. coli*.

При експерименталните инфекции во лабораториски услови утврдено е дека еднодневните пилиња и постарите животни лесно може да бидат колонизирани со

*Campylobacter* spp. користејќи ниски инфективни дози (од 10-100 бактериски клетки). Утврдено е дека по кратко време (2-3 дена) живината почнува да ги излучува бактериите со изметот, но при тоа бројот на излачени бактерии е огромен кој достигнува и повеќе од  $10^6$  клетки во еден грам измет. Важен факт е дека при овој степен на колонизација на животните тие не покажуваат никакви симптоми на заболување.

Природната колонизација со кампилобактериите најчесто се случува при 3-4 недели старост на пилињата поради изложеноста на различни стрес-фактори како на пример: промена на храна, кокцидиостатици, повеќекратни вакцинации и престанок на заштитата со мајчините антитела (Humphrey, 2004). Хоризонталната трансмисија директно од птиците клицоносители или индиректно од контаминирани живеалишта е честа и вообичаена појава. Употребата на контаминирани транспортни кошници и фаќалки при празнењето на објектите е значаен можен извор на кампилобактериите (Slader et al., 2002).

*Campylobacter* spp. се наоѓа во 30-100% од случаите како нормална флора во дигестивниот тракт на живината (O'Sullivan et al., 2000). При колењето исто така може да се утврди присуство на кампилобактериите (Hald et al., 2001), а нивото на колонизација може да изнесува од  $10^5$  до  $10^9$  колонии / g. (Berndtson et al., 1996a).

Студиите кои ја елаборираат контаминацијата со *Campylobacter* на пилешките трупови по колењето даваат многу неконзистентни податоци со преваленца која варира од 0 до 100 %. Овие варијации главно се должат на различните видови земени примероци, местото на земањето на примероците, користењето на различни серолошки методи, земјата во која е изведено тестирањето, методите на земање примероци и различните микробиолошките методи користени за нивна анализа.

Stern et al., 1995 соопштуваат за процент на контаминирани пилешки трупови со *Campylobacter* од 48-98%, додека процентот на позитивни изолати утврдени во пилешко месо во продажба според изведената студија во Велика Британија, која траела од 1995-2000 година, се движел од 47-81% (Wilson, 2002). Во испитувања спроведени во Нов Зеланд е утврдено присуство на *Campylobacter* во 27,5% од примероците пилешко месо. Сезонска варијација на преваленцата на *Campylobacter* spp. кај пилешкото месо е утврдена во Данска т.е. повисоко ниво на контаминација во летниот период (Јуни-Октомври) кое изнесувало 50-80%, и пониско во зимскиот период (Декември – Март) од 13-40% (Takkinen et al., 2003).

Контаминацијата со кампилобактериите на одделните делови од пилињата

најчесто се случува при колењето на птиците, а значаен фактор претставува и т.н. вкрстената контаминација. Всушност, потенцијален извор на кампилобактериите се и работните површини, опремата, водата, воздухот итн. Топлата вода која се користи за миење на живината може да биде значаен извор на бактериите бидејќи содржи многу фекални материи (Humphrey, 1993). Истовремено, познато е дека кампилобактериите го преживуваат миењето со врела вода (80°C), а нивната отпорност се повеќе се зголемува додека се прилепени на пилешката кожа (Humphrey, 2004). Кожата содржи најголем број на кампилобактерии кои понатака ги контаминираат останатите ткива при обработката на труповите и отстранувањето на коските. Тоа, веројатно е и главната причината зошто целите пилешки трупови поретко се контаминираат во однос на порциите пилешко месо (Takkinen et al., 2003).

### **3.3. ДОМАШНИТЕ ЖИВОТНИ КАКО РЕЗЕРВОАР НА КАМПИЛОБАКТЕРИИТЕ**

Говеда: Здравите говеда често се носители на *Campylobacter*, поточно на *C. jejuni*, во нивниот дигестивен тракт. Во литературата често се сретнува фекалната контаминација со *Campylobacter* на труповите на заклани говеда (Doyle, 1981). Главниот вектор за пренос на *Campylobacter* од говедата на луѓето е непастеризираното млеко. Контаминацијата на млекото е најчесто со фецесот на говедата за време на молзењето (Doyle, 1981; Reintjes et al., 1999).

Овци: *C. jejuni* е важен причинител на епизоотски инфективни абортуси кај овците и во повеќето стада е присутен без појава на контаминација на труповите за време на колењето на овците. Остатоците при колење како црн цигер, бубрези и срце може да претставуваат вектор за трансмисија на кампилобактериите на потрошувачите (Blaser et al., 1990; Skirrow, 1992). Во една студија од 2004 година авторите утврдиле присуство на *Campylobacter* од 17,5% на труповите од заклани овци. Од добиените изолати 64.9% биле идентификувани како *C. jejuni* и 35.1% како *C. coli* (Zweifel et al., 2004).

Свињи: *Campylobacter coli* и во помал дел *Campylobacter jejuni* вообичаено се сретнуваат кај популацијата на свињи. Утврдено е дека повеќе од половина популација на свињи ги излучува кампилобактериите преку фецесот, но исто така е утврдено дека околу 60% од свињите не покажуваат никакви симптоми на инфекција (Oosterom et al., 1983, Doyle, 1981). Во студија изведена во Чешка (Steinhauserova et al., 2001) утврдено е присуство на *Campylobacter* spp. во цревната содржина кај заклани свињи во распон од

20-40% и на површината на труповите од свињите од 10-15%. Ова наведува на заклучокот дека свинските трупови може да се контаминираат за време на колењето и преработката и некомплетната термичка обработка може да резултира со контаминација на финалните месни преработки (Doyle 1981; Blaser et al., 1990).

Кучиња и мачки: *Campylobacter* spp. е често присутен во фецесот на кучињата и мачките независно дали се здрави или со приметна дијареја. Младите животни се почесто афектирани отколку возрасните. Блискиот контакт со домашните миленици претставува ризик за инфекција, а посебно кај децата (Blaser et al., 1990; Hubbert et al., 1996).

### **3.4. КЛИНИЧКИ МАНИФЕСТАЦИИ НА БОЛЕСТА КАЈ ЛУЃЕТО**

Инфекцијата со *C. jejuni* вообичаено предизвикува ентеритидис кај кој се јавуваат следните симптоми: треска, стомачни грчеви и дијареја (со или без присуство на крв) (Coker et al., 2002; Nachamkin 2001). Пројавениот ентеритидис вообичаено трае 5-8 дена. Симптомите се проодни кај повеќето пациенти, но сепак бебињата, постарите лица и имунокомпромираните лица спаѓаат во ризичната група со појава на потешки симптоми и можен летален исход (Skirrow and Blaser, 2000).

*C. jejuni* исто така може да предизвика и инфекции надвор од гастроинтестиналниот тракт како бактериемија, бурзитис, менингитис, ендокардитис, перитонитис, абортуси, реактивен артритис, уринарна инфекција и *Guillain-Barré* синдром (Nachamkin 2001).

*Guillain-Barré* синдромот (GBS) е една од состојбите најчесто поврзувани со инфекции предизвикани од *C. jejuni*. GBS е автоимуно заболување на периферниот нервен систем кој предизвикува слабост на екстремитетите во период од неколку дена (Coker et al., 2002; Hadden and Gregson, 2001). Симптомите кои го следат ова заболување се слабост на екстремитетите и респираторната мускулатура и губиток на рефлексите. Оваа состојба најчесто трае од неколку дена до неколку недели по што мускулатурата го враќа основниот праг на контракција, додека за целосно враќање во почетната состојба се потребни неколку месеци (Hadden and Gregson, 2001).

### **3.5. МЕХАНИЗАМ НА ПАТОГЕНЕЗА И ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНЦИЈА**

Високиот титар на хуморални IgG, IgM and IgA детектиран при случаи на кампилобактериоза кај луѓето индицира дека бактериските клеточни елементи преоѓаат

од дигестивниот тракт кон епителиумот на цревата. Кај лица со чести ентеритидиси може да се јави послаб имунолошки одговор. Механизмот на патогенеза при кампилобактериозата кај луѓето ги опфаќа прикачувањето на микрорганозите на епителиумот од цревата, инвазијата на епителните клетки и продукцијата на токсини.

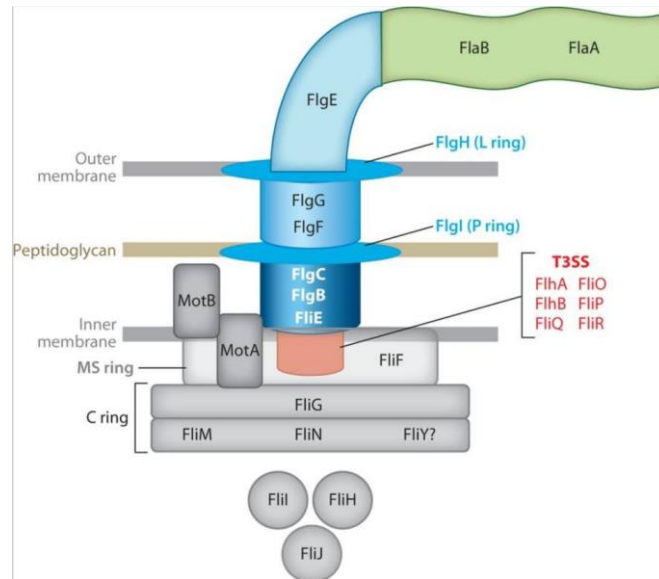
Протеините кои се дел од надворешната мембрана на патогените кампилобактерии која се прилепува на епителните клетки во цревата претставува фактор на вируленција за клетката домаќин. Не е утврдена значајна разлика во експресијата на патогените гени (цитотоксични, адхерентни, инвазивни и колонизирачки) кај кампилобактерии изолирани од различни извори (Stern and Line, 2000; Voxall, 2005). Останати патогени фактори се уште и аквизицијата на железо, инвазијата на клетката домаќин, продукцијата на токсини, секрецијата на серозна течност и нејзино истекување надвор од клеточните мембрани. Важни фактори кои влијаат на текот на болеста се општата здравствена и имунолошка состојба на домаќинот, вируленцијата на микрорганозите и факторите на опкружување од средината (Altekruse and Swerdlow, 2002).

- Подвижност (мотилитет)

За оптимално прилепување и инвадирање на клетките домаќини на кампилобактериите им е неопходна подвижноста. Оваа подвижност им овозможува на микроорганизмите пенетрација на мукусот на цревата и пронаоѓање на клеточните рецептори за полесна колонизација на цревата (Hu and Кореско, 2000; Voxall, 2005).

Микроорганизмите од родот *Campylobacter* поседуваат флагелуми за движење и карактеристичен начин (како сврдел) на движење со кој успеваат да се пробидат низ мукозниот слој на цревата. Флагелумот се состои од тело, кука (јацица) и филament. Компонентите на флагелинската нишка (*FlaA*, *FlaB*) се кислородно поврзани гликолизирани протеини. Мутацијата во главниот флагелински ген *flaA* ген резултира со скратен флагелум и доведува до губење на способноста за колонизација и кај луѓето и кај животните (Wassenaar et al., 1991). Во оваа состојба бактеријата се парализира, таа е во состојба да се прикачи (адхезира), но не може да ги инвадира цревните клетки *in vitro* (Yao et al., 1994). Контролните гени *flgE* и *fliK* (ја контролира должината на јацицата) се одговорни за функционалноста на јацицата. Телото на флагелумот се состои од: дистални и проксимални под-единици; носечките прстени (L-прстен, P-прстен, MS-прстен); C-прстен (овде се инкорпорирани протеини кои делуваат како моторни прекинувачи поврзани со хемосензорниот систем).

За да произведат функционална флагела, бактериите мора да ја координираат експресијата на над 40 флагеларни гени и производството и лачењето на потребните протеини.



Слика 4. Структура на флагелумот кај *Campylobacter jejuni*

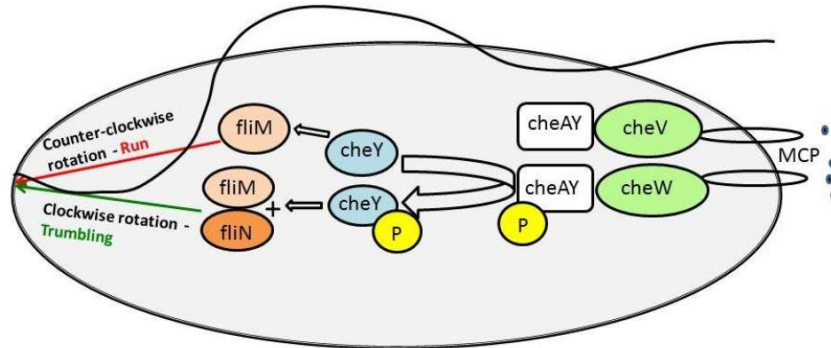
Табела 3. Фактори на мотилитет (подвижност) кај *Campylobacter* spp.

Фактор на вируленција	Кодирачки ген
FlaA, флагеларен протеин	<i>flaA</i>
FlaB, флагеларен протеин	<i>flaB</i>
FliF, базален протеин	<i>fliF</i>
FliM и FliY, флагеларни моторни протеини	<i>fliM</i> u <i>fliY</i>
FlgI, пептидогликански P-прстен	<i>flgI</i>
FlgH, L-прстен во надворешната мембрана	<i>flgH</i>
FlgE и FliK, ситни протеински компоненти	<i>flgE</i> u <i>fliK</i>
$\sigma$ 28 промотор кој ја регулира експресијата на <i>flaA</i> генот	<i>fliA</i>
$\sigma$ 54 промотор кој ја регулира експресијата на <i>flaB</i> генот	<i>rpoN</i>
Протеини на гликолизација на флагелинот	<i>cj1321-cj1325/6</i>

- Хемотакса

Способноста на детекција и движење нагоре и надолу во хемиски раствори е присутна кај кампилобактериите во текот на колонизацијата на цревата. Мутираните кампилобактерии кои не ја поседуваат оваа способност се неспособни за колонизација на цревата. Гастричниот муцин е важен хемотаксичен фактор за бактериите и има важна

улога при колонизацијата. Привлекувањето на кампилобакериите е стимулирано пред се од две состојки на муциноот: гликопротеинот и шеќерот L-фукоза (Stern and Line, 2000; Voxall, 2005).



Слика 5. Приказ на систем за хемотакса кај *Campylobacter jejuni* (Kovács, 2014)

Системот за хемотакса кај кампилобакериите користи дво-компонентен (хистидин и протеин киназа) пат на трансдукција на сигналот кој се состои од 6 хемотаксични протеини Che A, B, R, W, Y и Z (Hamer et al., 2010) и метил-апсорбирачки протеини на хемотакса (methyl-accepting chemotaxis proteins, MCPs). Овие протеини делуваат како хеморецептори кои ги детектираат сигналите од надворешната средина како на пр. присуство на аминокиселини. Сигналот потоа се пренесува на хистидин киназата CheA, која потоа се поврзува со протеинот CheW. CheA врши фосфорилација и пренос на фосфорна група на CheY, кој како одговор се поврзува со моторниот прекинувач на флагулумот FliM, што ја забрзува ротацијата на флагелумот и поттикнува забрзано движење кон напред (Young et al., 2007, Bolton, 2015, Hamer et al., 2010).

Табела 4. Фактори на хемотакса кај *Campylobacter* spp.

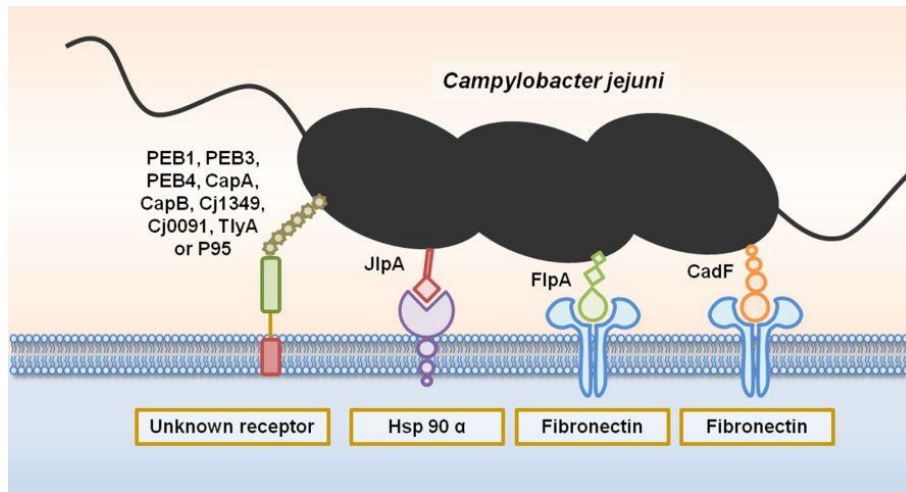
Фактор на вируленција	Кодиращки ген
Протеини на хемотакса CheA, B, R, V, W, Z	<i>cheA, cheB, cheR, cheV, cheW, cheZ</i>
MCP или тнр. трансдукторски протеини	<i>tlp1, tlp4, tlp10</i>
CheY, регулатор на флагеларна ротација	<i>cheY</i>
Протеини на енергетска размена CetA и CetB	<i>cetA u cetB</i>
Al-2 ензим за биосинтеза	<i>luxS</i>
AcfB, протеин за одржување во цекумот	<i>acfB</i>

Функцијата на CheR е во регулација на процесот со врзување на метил групи на метил апсорбирачките протеини зголемувајќи ја нивната способност за активација на CheA (Bolton, 2015). Останати познати гени вклучени во процесот на хемотакса кај кампилобактериите се уште *acfB*, *cetA* and *cetB* и *luxS*.

- Прилепување (адхезија) и колонизација

Бактериското прилепување се случува поради интеракцијата помеѓу молекулите на бактериската површина и молекулите на клетката домаќин. Микроорганизмите вообичаено користат пилии и фимбријални адхезии за прикачување на клетките домаќини. За кампилобактериите е карактеристично непостоењето на пилии за адхезија на клетките на домаќинот (Young et al., 2007). Адхезијата на *C. jejuni* се одвива со помош на липоолигосахариди (LOS), со флагелумот и со гликопротеини заедно со специфични адхезини како што се *CadF*, *JlpA*, *Peb1* и *CapA*.

Способноста на кампилобактериите за колонизација на епителните клетки се смета за есенцијална за појава на инфекцијата. *C. jejuni* изолиран од пациенти со симптоми на треска и дијареја покажал поголема способност за поврзување со епителните клетки отколку соеви изолирани кај асимптоматски пациенти (Hu and Кореско, 2000).



Слика 6. Механизми на адхезија кај *Campylobacter jejuni* (Kakoush, 2015)

Табела 5. Фактори на адхезија и колонизација кај *Campylobacter* spp.

Фактор на вируленција	Кодирачки ген
CadF, протеин на надворешна мембрана	<i>cadF</i>
CapA, адхезивен протеин	<i>capA</i>
Фосфолипаза А	<i>pldA</i>
Липопротеин	<i>jlpA</i>
Peb1, периплазматски врзувачки протеин	<i>peb1A</i>
Peb3, транспортен протеин	<i>peb3</i>
Peb4, заштитен протеин	<i>peb4</i>
FlpA, фибронектински протеин	<i>flpA</i>
Секреторен систем за адхезија	<i>virB11</i>
FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ и FliR, компоненти на флагелата	<i>flhA, flhB, fliO, fliP, fliQ и fliR</i>
FlaC есенцијален протеин за колонизација и инвазивност	<i>flaC</i>
CiaB, 73-kDa протеин вклучен во адхезијата	<i>ciaB</i>
CiaC, протеин на инвазивност	<i>ciaC</i>
CiaI, протеин за интраклеточно преживување	<i>cial</i>
Регулатор на одговор на промени во надворешната температура	<i>racR</i>
Heat shock протеин	<i>dnaJ</i>
Трансферабилен протеин	<i>virB11</i>
IamA, протеин поврзан со инвазивноста	<i>iamA</i>
HtrA, заштитен протеин на адхезивните протеини	<i>htrA</i>
VirK, заштитен протеин	<i>virK</i>
FspA, протеин со апоптозна активност	<i>fspA</i>

Фибронектинот е гликопротеин кој се наоѓа во епителните клетки на гастричнотестиналниот тракт. Адхезијата на *Campylobacter* на фибронектинот е овозможена со CadF, кој е протеин на надворешната мембрана со молекуларна маса од 37-kDa (Konkel et al., 1997). Овој протеин е кодиран од страна на високо конзервиран хромозомален *cadF* ген (Hofreuter et al., 2006). FlpA е уште еден протеин кај кампилобактериите кој специфично се поврзува со фибронектинот.

Следниот адхезин специфичен за кампилобактериите е *JlpA*, површински липопротеин кој се врзува за протеинот (heat shock protein - *Hsp90*) во Hep-2 клетките на домаќинот.

Кампилобактер адхезивниот протеин А (*CapA*) е автотанспортен липопротеин кој ја потпомага адхезијата на хуманите и пилешките епителни клетки (Ashgar et al., 2007). Протеините од групата „Peb“ (*peb1*, *peb3* и *peb4*) и фосфолипазата А (*pldA*) се уште некои претставници на адхезините кај кампилобактериите за кои во голем број на истражувања е потврдено нивното учество во процесот на поврзување со клетките на домаќинот (Ziprin et al., 2001; Min et al., 2009; Flanagan et al., 2009).

Колонизацијата е процес во кој се вклучени многу фактори вклучувајќи ја тука и адаптацијата на бактеријата на различни услови на надворешната средина т.е. условите во дигестивниот тракт. За регулација и реакција при овој процес бактериите користат систем составен од две компоненти. Најчесто овие компоненти се хистидин киназите и регулаторите на одговор (response regulators, RR). Во литературата еден од почесто истражуваниот е *racR* генот кој пак има директно влијание на многу други гени кои се важни за развој, размножување и колонизација на цревата кај птиците и кај луѓето. Таков е случајот со *dnaJ* генот кој е задолжен за бактерискиот одговор на температурни шокови (heat shock response) (Bras et al., 1999; Ziprin et al., 2001). Следен ген кој исто така е истражуван кај кампилобактериите е *virB11* кој учествува во адхезијата и инвазивноста, но е интересен поради можноста да се пренесува на плазмид помеѓу бактериите (Bacon et al., 2000).

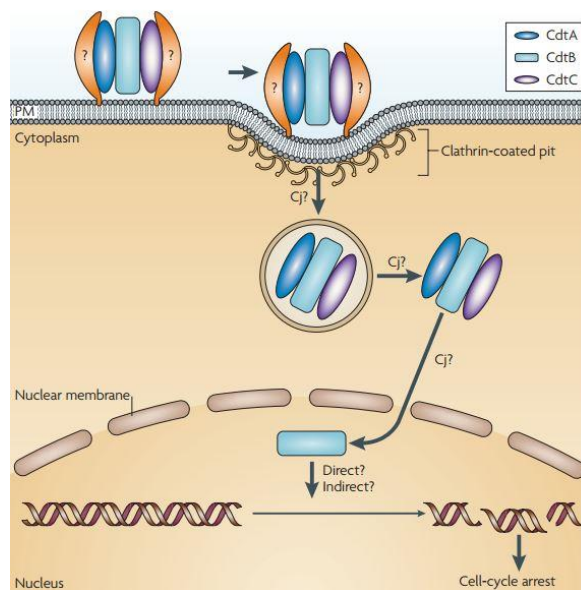
При инвазијата на клетките на домаќинот *C. jejuni* го користи својот секреторен систем кој сеуште не е доволно истражен. За функционирање на овој секреторен систем потребен е функционален флагелум кој покрај улогата што ја врши при подвижноста и адхезијата има значење и при инвазивноста. Како главни патници на овој експортен механизам се протеините од групата *Cia* (*ciaB*, *ciaC* и *ciaI*) и флагеларниот протеин *flaC*. На овој начин овие протеини кои се есенцијални за колонизацијата и инвазивноста на кампилобактериите се директно испорачани во цитоплазмата на клетките на домаќинот (Konkel et al., 2004, Malik-Kale et al., 2008, Christensen et al., 2009, Poly and Guerry, 2008).

Следни протеини кај *Campylobacter* spp. кои се исто така важни за инвадирање на епителните клетки се invasion associated marker протеинот (*iamA*) (Carvalho et al., 2001; Rivera-Amill et al., 2001), потоа протеинот *ceuE*, кој е липопротеин со молекуларна маса

од 34-36 kDa и кој е важен за бактерискиот метаболизам на железото што пак е круцијално за инфективноста на кампилобактериите (Park and Richardson, 1995, Ketley, 1997; Bang et al., 2003).

- Токсини

Токсините кои ги продуцираат членовите на родот *Campylobacter* се ентеротоксини и цитотоксини. Нивната активност ги оштетува клеточните структури. Cytolethal distending toxin (CDT) е токсин на *C. jejuni* кој предизвикува пореметувања во клетката, дистензија на клеточните ѕидови и смрт на клетката (Ripabelli et al., 2010). Холотоксинот CDT се состои од три поединици CdtA, CdtB и CdtC. Повеќето од изолатите на *C. jejuni* и *C. coli* се носители на генот *cdt*, но разлики постојат во количината на произведен токсин од страна на бактеријата (Hu and Корецко, 2000; Voxall, 2005).



Слика 7. Влез и механизам на делување на CDT кај *Campylobacter jejuni* (Young, 2007)

Липоолигосахаридите се големи гликолипиди кои се наоѓаат на клеточната површина на кампилобактериите. Овие липоолигосахариди се важни за процесот на избегнување на имуниот одговор на домаќинот и во процесот на колонизација на клетките. Гените за биоинтеза на липоолигосахариди (*wlaN*, *cgtB*) кај *C. jejuni* се локализирани на хиперваријабилан локус. Овие два гени ги кодираат  $\beta$ -1,3-галактозилтрансферазите за синтеза на ганглиозиди кои ги имитираат ткивата на

клетките на домаќинот и иницираат продукција на автореактивни антитела што води до појава на Guillain-Barré и Miller-Fisher синдромот (Moran, 1997, Szymanski, et al., 2003).

Табела 6. Фактори на цитотоксичност кај *Campylobacter* spp.

Фактор на вируленција	Кодиращки ген
Cytolethal distending toxin (CDT поединици)	<i>cdtA</i> , <i>cdtB</i> и <i>cdtC</i>
1,3 галактозилтрансферази вклучени во продукција на липополисахариди	<i>cgtB</i> и <i>wlaN</i>

### 3.6. СЕЗОНСКИ ВАРИЈАЦИИ НА КАМПИЛОБАКТЕРИОЗАТА

Инфекциите кај луѓето со *Campylobacter* spp. во земјите со умерена клима имаат конзистентни сезонски текови со дефиниран сезонски врв во летните месеци (Јули, Август, Септември) (Kovats et al., 2005; Amato-Gauci and Ammon, 2007; EFSA, 2009), додека во тропските земји постојат многу мали варијации во текот на целата година. Причините за сезоналитетот кај оваа инфекција сеуште се голема пречка за научните кругови и во оваа група истражувањата се фокусирани на: климата, врнежите, старосната група и социо-економскиот статус на заболените лица, излетите во природа, патувањата во странство, контактот со домашните животни и консумацијата на месо и млеко.

## **4. ИЗОЛАЦИЈА, КОНФИРМАЦИЈА И ТИПИЗАЦИЈА НА *CAMPYLOBACTER* spp.**

### **4.1. ИЗОЛАЦИЈА И КОНФИРМАЦИЈА НА *CAMPYLOBACTER* spp.**

За изолација и конфирмација на *Campylobacter* spp. најчесто се користи методата со збогатување во течен медиум (Preston или Bolton бујон) и последователно инокуирање на цврста хранлива подлога (mCCDA) како што е опишано во ISO стандардот 10272-1 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. -- Part 1: Detection method.

Примарната идентификацијата на кампилобактериите како и кај сите бактерии започнува веќе при примарната изолација односно врз основа на изгледот на колониите. Описот на колониите на термотолерантните кампилобактерии е даден во повеќе референци (Donnison, 2003; Health Protection Agency, UK, 2003; OIE, 2004; USDA, 1998).

За идентификација на видот на бактеријата постојат многу тестови. Меѓутоа, најчесто употребуваните тестови пропишани во ISO стандардот и аплицирани во голем број на истражувања (Hald and Madsen, 1997; Keramas et al., 2004; Nielsen et al., 2000; Petersen et al., 2001; Sails et al., 2002), вклучуваат подготовка на Gram-препарат, влажен препарат и оксидаза тест. По изведените три анализи на добиените чисти култури, се потврдува дали сите три теста се позитивни. Во колку соевите се позитивни на сите три теста (Gram-негативни спирални или извиткани стапчиња, со карактеристична подвижност во вид на сврдел што се утврдува под микроскоп и позитивна продукција на оксидаза), се евидентираат како припадници на родот *Campylobacter* и се складираат т.е. соодветно чуваат за понатамошна идентификација.

### **4.2. ТИПИЗАЦИЈА НА *CAMPYLOBACTER* spp.**

Точната идентификација на кампилобактериите е потребна за да се обезбедат важни информации од клинички и епидемиолошки аспект за следење на изворите и рутите на трансмисија и развој и следење на стратегии за контрола на ланецот на храна. За оваа намена се користат повеќе методи (пристапи) кои се разликуваат според цената, комплицираноста и дискриминаторната моќ. Фенотипските методи како серотипизацијата и фаготипизацијата се ефтини и лесни за изведба. Генотипските методи имаат поголема сензитивност и дискриминаторна моќ, се поскапи и покомплицирани за изведба.

#### 4.2.1. Фенотипски методи

- Серотипизација. За серотипизација на кампилобактериите се развиени две техники (Patton et al., 1985). Серотипизација по Penner која вклучува пасивна аглутинација со растворливи термостабилни антигени (Penner and Hennessy, 1980) и серотипизација по Lior која вклучува аглутинација на слајд на термолабилни антигени (Lior et al., 1982). Серотипизацијата била широко прифатена за типизација помеѓу *C. jejuni* и *C. coli* (Wassenaar and Newell 2000). Пречки кои се јавуваат при користењето на серотипизацијата се вкрстената реактивност, неконзистентноста и слабата репродукцибилност и трошоците поврзани со продукцијата на серуми.
- Фаготипизација. Оваа постапка ја користи специфичноста на фагите на *Campylobacter* spp. кон површинските рецептори на клетките на домаќинот. Успешната адхезија на бактериите врз клетките на дигестивниот тракт резултира со формирање на оштетувања на клетките и изолатите може да се идентификуваат на база на тоа кои фаги ја предизвикуваат инфекцијата (Salama et al., 1990). Фаготипизацијата претставува корисна метода во комбинација со серотипизацијата при следење на труења со храна (Sails et al., 2003).
- Биотипизација. Оваа метода врши дискриминација на изолатите на *Campylobacter* spp. на основа на нивните биохемиски својства. Биотипизацијата не бара употреба на скапи хемикалии и не вклучува комплицирани процедури како што е производството на антисеруми. Од идентификуваните соеви на ниво на род се вршат соодветните тестови за идентификација на видот кои ги вклучуваат следните тестови: толеранција на температура, раст во нормална атмосфера, тест за хидролиза на хипурати, индоксил ацетат тест, продукција на H<sub>2</sub>S во Triple sugar iron (TSI) агар, каталаза тест.

Табела 7. Карактеристики на одделните видови на бактериите од родот *Campylobacter* определени со карактеристичните идентификациони биохемиски тестови

Карактеристични идентификациони тестови базирани на биохемиски својства						
ВИД	Каталаза тест	Редукција на нитрати	Хидролиза на индоксил ацетат	Хидролиза на хипурати	Осетливост на налидиксична киселина	Продукциј а на H <sub>2</sub> S на TSI агар
<i>C. jejuni</i>	+	+	+	+	-	-
<i>C. coli</i>	+	+	+	-	-	v
<i>C. lari</i>	+	+	-	-	+	-
<i>C. upsaliensis</i>	-	+	+	-	-	-
<i>C. fetus</i>	+	+	-	-	+	-
<i>C. hyointestinalis</i>	+	+	-	-	+	+
<i>C. concisus</i>	-	+	-	-	+	+
<i>C. mucosalis</i>	-	-	-	-	+	+
<i>C. sputorum</i>	-	+	-	-	+	+
<i>C. helveticus</i>	-	+	+	-	-	-
<i>C. curvus</i>	-	+	+	-	+	+
<i>C. rectus</i>	-	+	+	-	+	+
<i>C. showae</i>	+	+	+	-	-	+
<i>C. hyoilei</i>	+	+	v	-	-	+
<i>C. gracilis</i>	-	+	-	-	+	+

#### 4.2.2. Генотипски методи

- Полимераза верижна реакција (PCR – polymerase chain reaction) и методите засновани на оваа техника се почесто се користат и развиваат за брза детекција, идентификација, конфирмација и типизација на претставниците на *Campylobacter* spp. (Blaser, 2000; Englen et al., 2003; Sahin et al., 2003). Една од најважните компоненти на на овие методи се олигонуклеотидните прајмери кои може да се дизајнираат на основа на скевенци од гените на *Campylobacter* spp. Во зависност од користените прајмери методата може да овозможи детекција, идентификација и диференцијација на различни кампилобактерии. Најчесто користени за одредување на видот се прајмери дизајнирани на основа на гените на 16S rRNA или 23S rRNA, додека за одредување на сојот (типот) се користат прајмери дизајнирани на основа на специфични варијабилни региони како што се гените *hipO*, *flaA*, *mapA*, *ceuE*, *glyA*, *cadF*, или *lpxA* (Bang et al., 2002; Cloak and Fratamico, 2002; Nielt et al., 2002; Hounq et al., 2001; Klena et al., 2004; Wang et al., 2002). Полимераза верижната реакција е доста погодна за работа со примероци со низок

број на кампилобактерии поради способноста на методата за многукратна амплификација на одредени генски секвенци за краток временски период (Englen et al., 2003). Понатаму, со користење на специфични прајмери со оваа метода може ефикасно да се разликуваат *C. jejuni* и *C. coli*. Неколку специфични гени (*hipO*, *flaA*, *mapA*, *ceuE* и *glyA*) успешно се користат во последните две декади за разликување помеѓу *C. jejuni* и *C. coli* (Bang et al., 2002; Wang et al., 2002). Единствениот недостаток на PCR методите е неможноста за дискриминација помеѓу живите бактерии и бактериите кои се наоѓаат во VBNC фазата што е доста важно за некои епидемиолошки студии (Sahin et al., 2003).

- Гел електрофореза во пулсирачко поле (Pulsed-field gel electrophoresis - PFGE) Оваа лабораториска техника се користи за сепарација на доста долги вериги на ДНК со цел добивање на профил со кој би се разликувале изолатите. Во оваа метода се користи електрично поле со променливи насоки со што се насочува движењето на ДНК низ агарозен гел. За прв пат оваа метода е применета на изолати на *Campylobacter* spp. добиени при појава на гастроентеритис во Велика Британија во 1984 година (Bradbury et al., 1984). Во наредните десетина години методата се усовршувала како би го добила форматот по кој се изведува денес. Во САД е оформена мрежа на лаборатории кои ја вршат оваа анализа на патогените микроорганизми во храната. Оваа мрежа овозможува брза споредба на сите изолати преку електронска база на податоци.
- *Fla* типизација Оваа лабораториска метода е тесно поврзана со способноста за движење на кампилобактериите. Флагеларните филаменти кај бактериите се формирани од протеинска поединица, кодирана од *fla* генот. Кај кампилобактериите постојат два флагеларни гена *flaA* и *flab*. Методата ги користи прајмерите од стабилните крајни региони на N- и C- на протеините и за нивна амплификација се користи PCR техниката. Крајниот продукт од реакцијата понатака подложи на дигестија како би се добиле полиморфизми на рестриктивниот фрагмент (RFLP – restriction fragment length polymorphisms) по направена електрофореза.

- RAPD - random amplification of polymorphic DNA. При изведбата на оваа метода се врши амплификација на кратки делови на ДНК со арбитрарен прајмер. Добиените ампликони се со различна големина зависно од локацијата на прајмерот на геномот на микроорганизмот. Поради ова оваа метода е погодна за споредба на микроорганизми од ист вид. Оваа техника поседува висока моќ на дискриминација и типизација.
- AFLP – Amplified fragment length polymorphism. Оваа метода поседува висока резолуција и се почесто се користи за генотипизација на *Campylobacter* spp. При оваа метода се користат две рестриktivни еднонуклеази по што се лигираат олигонуклеотидни адаптери на добиените ДНК фрагменти. По ова се врши амплификација на фрагментите кои се врзани со адаптерите. Во повеќе студии е утврдено дека оваа метода има еднаква дискриминаторна моќ како PFGE методата.
- MLST – Multi locus sequence typing. Методата на MLST е моментално водечка молекуларна метода за типизација. За прв пат е предложена во 1998 година како универзален метод за карактеризација на бактериски популации (Dingle et al., 2001, Maiden, 2006). Веќе неколку години упсешно се користи за карактеризација на соевите на *C. jejuni* во повеќе светски лаборатории. Техниката се базира на PCR амплификација на региони (локи) со тежина од 360-600 bp на седумте house-keeping гени (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *gylA*, *pgm*, *tkt* и *uncA*) на *Campylobacter* spp. Секоја секвенционарна варијанта на овие локи се нарекува алел на кој му се доделува број на алелот. Комбинацијата на алели за различни локи се нарекува „алелен профил“ или „sequence type“ (ST) (Jolley et al., 2004, Maiden et al., 1998).

### **4.3. АНТИМИКРОБНА ОСЕТЛИВОСТ НА *CAMPYLOBACTER* spp.**

При инфекција кај луѓето со термотолерантни кампилобактерии, надокнадувањето на течности и електролити е основна симптоматска терапија кај повеќето пациенти, бидејќи луѓето најчесто оздравуваат без примена на антимикробна терапија проследено со коректен диететски режим на исхрана (Blaser and Engberg, 2008). Во случај кога пациентот има висока температура и крвав пролив или кога се работи за

новороденчиња, деца, трудници и лица со ослабен имунитет неопходна е антибиотска терапија.

Антимикробната резистенција е се поприсутен феномен кај *Campylobacter* spp. и кај другите патогени микрорганозми пристуни во храната. Микробиолошка резистенција постои кога некоја бактерија може да преживее повисоки концентрации на одреден антибиотик во споредба со „дивиот“ тип од истата бактерија (EFSA, 2008). Резистентните изолати се фенотипски различни од „дивиот“ тип поради нивната аквизиција на механизам на антимикробна резистенција преку трансфер на гени или преку мутација (стекната резистенција) (EFSA, 2008).

Моментално, антимикробната резистенција на *Campylobacter* spp. е огромен проблем на јавното здравје (Tang et al., 2017). Резистенцијата на соевите на *C. jejuni* и *C. coli* кон флуорокинолоните (Engberg et al., 2004), аминогликозидите (Alfredson and Korolik, 2007) и макролидите е еден од актуелните предизивици во развиените, но и во земјите во развој (Gibreel and Taylor, 2006). Особено внимание предизвикува резистенцијата кон флуорокинолонските (ципрофлоксацин) и макролидните (еритромицин) препарати поради фактот што овие антибиотици се прва линија на одбрана т.е. се лекови од избор при терапирањето на гастроентеритиси предизвикани со кампилобактерии (Wise et al., 1998).

Тетрациклините ретко се користат при кампилобактериоза, но се земаат во предвид како алтернативни лекови при терапија на возрасни пациенти (Alfredson and Korolik, 2007, Engberg et al., 2006). При сериозни бактериемии и системски инфекции како лек од избор се препорачуваат и аминогликозидните препарати (гентамицин) преку интравенозна апликација (Engberg et al., 2006, Alfredson and Korolik, 2007).

Флуорокинолоните вообичаено се користат во терапијата на луѓето заболени од кампилобактериоза. Тие исто така се користат и кај домашните животни за терапија на бактериските инфекции. Пред 1995 година флуорокинолоните не се користеа кај животните кои служат за производство на храна. Поради ова и студиите од периодот пред 1995 година покажуваа ниско ниво на резистенција кон флуорокинолоните од страна на изолатите на *Campylobacter* spp. пронајдени кај луѓето. Веќе во 1999 година нивото на резистенција изнесува 18%, додека во 2008 резистенцијата е веќе 23% кај изолатите на *Campylobacter* spp. (CDC, 2010).

Кај *Campylobacter* spp. постојат два добро познати механизми на резистенција кон флуорокинолоните. Тоа се модификацијата на целното место на ензимот DNK гираза

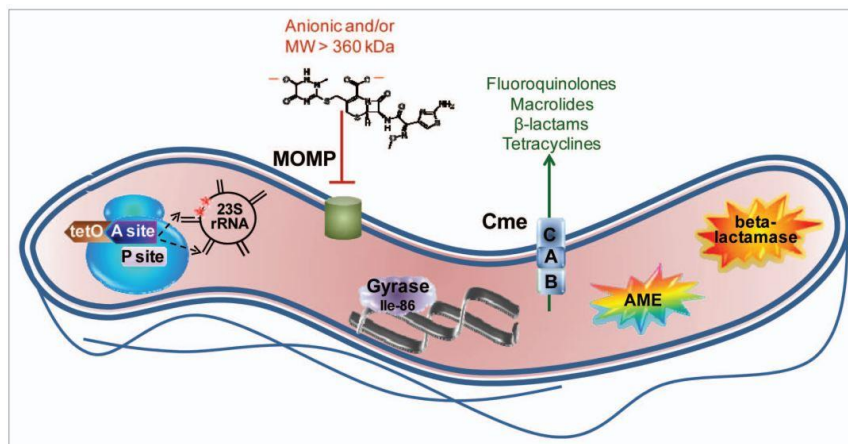
и активноста на ефлукс пумпите. Модификацијата на целното место за кинолоните на ензимот гираза А (quinolone resistance-determining region-QRDR) е доста честа кај кампилобактериите (Iovine, 2013). Модификацијата се базира на мутација во *gyrA* генот што резултира со замена на аминокиселина во QRDR на *gyrA* протеинот. Следниот механизам на резистенција е со помош на ефлукс пумпите кои се хромозомски кодирани (CmeABC). Ефлукс пумпите доста често функционираат во синергија со првиот механизам и на тој начин се одржува високо ниво на резистенција кон кинолонските препарати. Оваа ефлукс пумпа ја намалува акумулацијата на флуорокинолоните кај кампилобактериите, но е ефикасна и кај други антибиотици (Ge et al., 2005; Luo et al., 2003).

Еритромицинот како претставник на макролидните антимицробни супстанции е прв лек на избор за третман на кампилобактериозата кај луѓето. Мониторингот на резистенцијата кај *C. jejuni* и *C. coli* кон овој антибиотик е доста честа во светот. Групата на макролидите ги опфаќа азитромицинот, клиндамицинот, телитромицинот, но најчесто користен кај домашните животни е тилозинот, кој доста често се употребува во одгледувањето на свињи при третманот на дизентерија кај одбиени прасиња (Juntunen et al., 2010; Logue et al., 2010).

Засега се познати неколку механизми на резистенција на кампилобактериите кон макролидите. Првиот е мутација на целното место за макролидите на 23S rRNA гените. Со настанатите промени се пореметува врзувањето на макролидите на рибозомалната 50s подединица. Исто така, може да дојде до инсерции (мутации) кај рибозомалните протеини L4 и L22 што исто води до резистенција кон оваа група на антибиотици. Ефлукс пумпата CmeABC исто така може да допринесе за појавата на резистенција и најчесто делува синергистички со мутацијата на 23S rRNA (Iovine, 2013; Gibreel, 2005). Следен механизам на резистенција кон макролидите е изменетата пропустливост на нивната клеточна мембрана. Оваа изменета пропустливост кампилобактериите ја постигнуваат со експресија на порин на надворешната мембрана (major outer membrane protein - MOMP). Порините се протеини на надворешната мембрана кои ги формираат мембранските пори и овозможуваат пасивна дифузија на хидрофилни молекули, вклучувајќи ги и антибиотиците. MOMP формира селективни пори со помал размер со што го ограничува влезот на повеќе антибиотици кои имаат молекуларна маса повисока од 360 KD (макролидите имаат молекуларна маса >700 KD).

Тетрациклините се воведени во употреба во 40-тите години и имаат ефект и врз Грам позитивните и врз Грам негативните микроорганизми. Истите се често користени во 70-тите и 80-тите години од минатиот век. По 2000 година тетрациклините воглавно се користат во ветеринарната медицина за терапија на домашните животни. Сепак, препознавањето на зголемената резистенција и развојот на други антимицробни препарати ја минимализираа нивната употреба (Akhtar, 1988; Dasti et al., 2007).

Резистенцијата на *Campylobacter* spp. кон тетрациклините најчесто се поврзува со *tet(O)* генот кој е детектиран и кај *C. jejuni* и кај *C. coli* (Gibreel et al, 2004). Овој ген се пренесува преку трансферабилен плазмид и поретко преку хромозомот. Протеинот *tet(O)* го штити рибозомот од инхибиторниот ефект на тетрациклините со врзување на слободното место на рибозомот. Поради ова овој протеин уште се нарекува и рибозомален заштитен протеин (ribosomal protection protein – RPP). Покрај овој механизам на резистенција, кампилобактериите поседуваат и ефлукс пумпа која исто допринесува за резистенцијата кон тетрациклините (Humphrey et al., 2005; Lin et al., 2002).



Слика 8. Приказ на најважните механизми на резистенција кај *Campylobacter* spp.

Аминогликозидните антибиотици каде спаѓаат гентамицин, амикацин, неомицин, тобрамицин и стрептомицин традиционално се користат за терапевтска намена кај луѓето, со посебен акцент на стрептомициноот и неомициноот кои наоѓаат употреба и во ветеринарната медицина (Iovine, 2013).

Главниот механизам за резистенција кај кампилобактериите кон аминогликозидите се базира на ензими кои вршат модификација на овие антибиотици. Најчесто среќавани во пракса се: 3'-аминогликозидфосфотрансфераза (канамицин,

гентамицин) кодирана од генот *aph-3* (Gibreel et al., 2004) и 6'-аденил трансфераза (стрептомицин) кодирана од генот *aadE* (Pinto-Alphandary et al., 1990).

Бета-лактамските антибиотици се широко прифатена група на антибиотици, и иситите покриваат 65% од вкупниот пазар на светско ниво (Chandel et al., 2008). Овие антибиотици исто така често се користат и во ветеринарната медицина. Во оваа група спаѓаат следните препарати: пеницилинот, оксацилинот, амоксицилинот, ампицилинот, карбапеницилинот. Како и кај другите групи на антибиотици и кај оваа група се забележува зголемено ниво на резистенција на светско ниво што го комплицира нивното користење. Особено важно за оваа група е продуцирањето на  $\beta$ -лактамазата од страна на микроорганизмите. Ова е потврдено и низ неколку студии на оваа тема кои утврдиле зголемена продукција на  $\beta$ -лактамазата кај изолати на *C. jejuni* и *C. coli* од луѓе и животни (Tajada et al., 1996; Griggs et al., 2009; Juntunen et al., 2012).

Резистенцијата кон  $\beta$ -лактамските антибиотици како што се амоксицилин, ампицилин и тикарцилин се должи најчесто на продукцијата на ензимот  $\beta$ -лактамаза, кој ги инактивира овие антибиотици хидролизирајќи го нивниот лактамски прстен (Aarestrup & Engberg, 2001; Griggs et al., 2009).  $\beta$ -лактамазата bla<sub>OXA-61</sub>, доста често се среќава кај *C. jejuni* и *C. coli*, (Griggs et al., 2009). Исто како и кај претходно споменатите класи на антибиотици и кај резистенцијата на кампилобактериите кон  $\beta$ -лактамите важна улога игра *СмеABC* ефлукс пумпата (Lin et al., 2002).

Табела 8. Механизми на антимицробна резистенција кај *Campylobacter* spp.

Класа на антибиотик	Механизам на резистенција
Флуорокинолони	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Модификација на DNK гираза</li> <li>• Мултирезидуална ефлукс пумпа</li> <li>• Мутација на 23S rRNK и/или рибозомалните протеини</li> </ul>
Макролиди	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Мултирезидуална ефлукс пумпа и/или изменета пропустливост на клеточната мембрана</li> </ul>
Аминогликозиди	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ензимска модификација и инактивација на антибиотиците</li> <li>• Врзување на заштитиен протеин на целното место на антибиотиците во рибозомите</li> </ul>
Тетрациклини	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Мултирезидуална ефлукс пумпа</li> </ul>
$\beta$ -лактами	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ензимска инактивација на антибиотиците со <math>\beta</math>-лактамаза</li> <li>• Мултирезидуална ефлукс пумпа</li> </ul>

#### 4.4. МЕТОДИ ЗА УТВРДУВАЊЕ НА АНТИМИКРОБНАТА ОСЕТЛИВОСТ

Денес се среќаваат стандардизирани методи и тестови за осетливост на *C. jejuni* кон антибиотици (McDermott et al., 2004, 2005). Со овие протоколи е подобрена интерпретацијата и споредбата на резултатите помеѓу различни лаборатории. Протоколите се публикувани во вид на стандарди од страна на Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014) во САД и од страна на European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2014) во Европа. Двете тела даваат насоки со кои ќе се изведе тестирањето на антимикробната осетливост и ќе се интерпретираат резултатите и изолатите ќе се категоризираат како осетливи (S – susceptible), интермедијарни (I - intermediate) или резистентни (R – resistant). Во стандардизираните методи спаѓаат методите на диск-дифузија, бујонска микродилуција и агар дилуција.

- Минимална инхибиторна концентрација (Minimal inhibitory concentration MIC) е дефинирана како најниската концентрација на антимикробна супстанца која го спречува видливиот раст на микророганот при тестирање со агар или бујонска дилуција (CLSI, 2006). Опсегот на концентрации на антимикробни супстанции кои ќе се користат при тестирањето на антимикробната осетливост мора да ги опфатат и крајните очекувани лимити на микророганот кој се испитува (S - susceptible, осетлив; I - intermediate, интермедијарен и R - resistant, резистентен). Методот со агар дилуција со користење на Mueller-Hinton агар збогатен со 5% дефибринирана овча крв развиен од страна на McDermott и соработниците (McDermott et al., 2004) е прифатен од страна на Clinical and Laboratory Standards Institute во САД како стандарден метод за тестирање на антимикробната осетливост на термофилните кампилобактерии (CLSI, 2005). Овој метод ги опфаќа следните антимикробни супстанции (ciprofloxacin, doxycycline, gentamicin, erythromycin и мегорепем). Подоцна во CLSI е развиена и прифатена и методата со бујонска дилуција. На европско тло моментално се користат повеќе методи, но препорачана метода од страна на Европската референтна лабораторија за антимикробна резистенција е методата со микротитарски плочи каде секое бунарче носи одредена концентрација од бараните антимикробни агенци.

- Диск дифузија е метода при која се користи комерцијално произведен хартиен диск импрегниран со одредена концентрација на антиминокробна супстанца. Овие дискови се нанесуваат на површината од агарот кој е претходно инокулиран со микроорганизмот кој се тестира. При испитувања на соеви кои припаѓаат на *Campylobacter* spp. се користи Mueller-Hinton агар збогатен со 5% овча крв кој се инокулира со суспензија од микроорганизми со густина од 0.5 McFarland (CLSI, 2006). Антибиотикот од дискот дифундира низ агарот, но соодветно на тоа доаѓа и до логаритмичко намалување на неговата концентрација. Паралелно на овој процес инокулираните микроорганизми кои не се инхибирани од присутниот антибиотик продолжуваат да се размножуваат формирајќи видливо поле на раст на агарот. Во зоните каде концентрацијата на антибиотик е доволно висока за да делува инхибиторно нема раст на бактериите и се формира зона на инхибиција околу секој диск (Jorgensen and Turnidge, 2003).



Слика 9. Изглед на плоча на Columbia крвен агар инокулирана со *Campylobacter jejuni* по завршена инкубација со антиминокробни дискови

- E-test е комерцијално достапен метод за квантитативно определување на антиминокробната осетливост кој е доста лесен за употреба бидејќи ја комбинира диск дифузијата со можноста за утврдување на минималната инхибиторна концентрација (Jorgensen and Turnidge, 2003).



Слика 10. Изглед на плоча на Columbia крвен агар инокулирана со *Campylobacter jejuni* по завршена инкубација со E-test

## 5. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

Моментално *Campylobacter* spp. е еден од најчестите причинители на гастроентеритиси кај луѓето. Болеста вообичаено се јавува спорадично, само понекогаш во вид на фамилијарни епидемии и секогаш е доста тешко да се потврди изворот на инфекција. Исто така, карактеристика на гастроентеритисите предизвикани од кампилобактериите е минувањето на клиничките симптоми без потреба од антимикробна терапија. Само одреден процент од пријавените случаи имаат изразена долготрајна дијареја со придружна треска и овие пациенти имаат потреба од терапија. Секако дека и пројавената клиничка слика ќе зависи од патогеноста на присутниот вид на кампилобактерии и општата физиолошка состојба на пациентот.

Од тие причини, како цели и задачи на истражувањето ги зацртаваме следните:

1. Да се утврди преваленцата на *Campylobacter* spp. во различните фази на производство и добивање на пилешко месо:
  - во фаза на одгледување (на фарма)
  - во фаза на колење (во кланица)
  - во фаза пред продажба (во ладилник)
2. Да се определи застапеноста на најважните видови на *Campylobacter* spp. во фазите на производство на пилешко месо;
3. Детерминација на можната сезонска варијација во преваленцата на кампилобактериите во земените примероци од животни и храна;
4. Воведување и евалуација на PCR метода за детекција и идентификација на најчестите претставници на *Campylobacter* spp. во изолати од животни и храна;
5. Апликација на PCR метода за детекција на гените носители на антимикробната резистенција кај потврдените изолати на *C. jejuni* и *C. coli*;
6. Апликација на PCR метода за детекција на гените на вируленција кај потврдените изолати на *C. jejuni*;
7. Апликација и евалуација на применетите PCR методи кај хумани изолати на *Campylobacter* spp.;
8. Да се предложат специфични мерки со цел намалување на ризикот од појава на кампилобактериоза кај луѓето преку:
  - намалување на процентот на колонизирани животни на фарма

- намалување на бројот на позитивни трупови на кланица
- едукација на потрошувачите за безбедно ракување со пилешкото месо при неговата припрема.

## 6. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Во ова истражување основен материјал за анализа претставуваа клоакалните брисеви, цекумите и брисевите од пилешките трупови земени од живинарска фарма, од кланицата и од ладилникот непосредно пред продажбата. Основните аналитички методи опфаќаа главно анализа на присутните кампилобактерии преку користење на стандарни методи како и молекуларни методи за утврдување на присуството на гените на вируленција и гените носители на антимиembroбната резистентност на изолираните видови на кампилобактерии.

### 6.1. ЗЕМАЊЕ НА МОСТРИ

Кај живи животни истражувањата на *Campylobacter* spp. можат да се вршат со помош на земање на мостри од фецес или од клоака. Клоаката претставува продолжение на задното црево (rectum), кој е дел од дебелото црево (intestinum crassum), а со оглед на вознемиреноста на животните и условите во фармите, земањето на мострите може да бидат проследени со потешкотии. Меѓутоа, клоакалните мостри т.н. брисеви се наметнуваат како поедноставно и задоволително решение и истовремено од страна на ОЕ се препорачани како мостра за анализа на кампилобактериите (World Health Organization, 2000; Newell and Wagenaar, 2000).

За целите на ова истражување земени се примероци - клоакални брисеви од вкупно 64 животни, со потекло од фарма за одгледување на бројлери на територијата на Република С. Македонија.

Во фазата на колење на живината од кланицата се земени 166 мостри - цекуми (слепи црева).

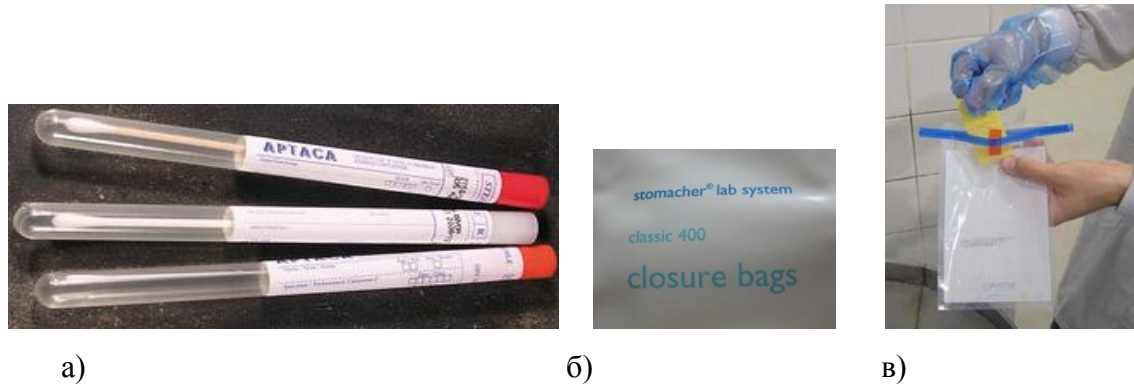
Во фазата пред продажба од ладилникот се земени повторно брисеви од пилешки трупови - 53 мостри. Вкупниот број на земени примероци за анализа на преваленцата на *Campylobacter* spp. изнесуваше 283.

За земање на мостри т.н. клоакалните брисеви, се користат стерилни, поединечно пакувани пластични ватирани стапчиња (Artasa, No. 2150 SG), кои веднаш после земањето примерок се транспортираат до лабораторија за микробиологија на храна при Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје, каде се засадуваат истиот ден (3-4 часа од земањето) на соодветна хранлива подлога.

При земањето на цекумите како примероци за анализа користени се стерилни ножички и стерилни кеси за пакување и транспорт на примероци (Seward BA604/CLR

Stomacher labssystem).

За земањето на брисеви од пилешките трупови се користат готови комерцијални брисеви за таа намена (Biotrace HS 10BPW/2G). Изгледот на соодветната опрема за земање на примероците се прикажани на слика 11.



Слика 11. (а) Стерилни брисеви за земање на клоакални брисеви (Артаса, No. 2150 SG), (б) Стерилни ќеси за пакување и транспорт и (в) Стерилни брисеви за земање примероци од пилешки трупови (Biotrace HS 10BPW / 2G)

## 6.2. ИЗОЛАЦИЈА И ПРИМАРНА ИДЕНТИФИКАЦИЈА (ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА РОДОТ) НА ИЗОЛИРАНИТЕ СОЕВИ БАКТЕРИИ

За изолацијата на *Campylobacter* spp. се користи методата со збогатување во течен медиум (Preston бујон) и последователно инокуирање на цврста хранлива подлога (mCCDA-) како што е опишано во ISO стандардот 10272-1:2006 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. -- Part 1: Detection method.

Примарната идентификацијата на кампилобактериите како и кај сите бактерии започнува веќе при примарната изолација односно врз основа на изгледот на колониите. Описот на колониите на термотолерантните кампилобактерии е даден во повеќе референци (Donnison, 2003; Health Protection Agency, UK, 2003; OIE; 2004; USDA, 1998).

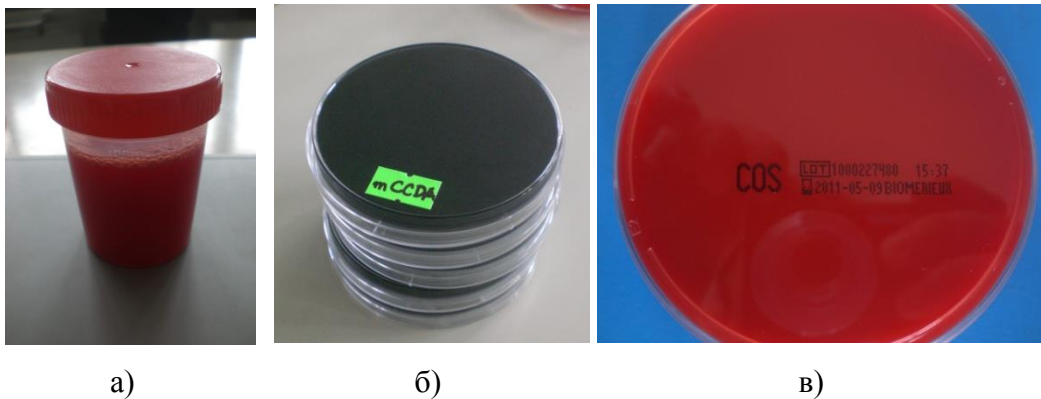
### 6.2.1. Медиуми за култивирање

За изолација и добивањето на чисти култури на бактериите од родот *Campylobacter* се користат три медиуми (слика 12):

1. Preston бујон (Fluka). Подлога за селективно збогатување, која се подготвува според рецептура посочена од производителот. Овој бујон се состои од:

- Хранлив бујон бр.2 (Nutritient Broth No.2, Fluka, No. 70123);
- Лизирана коњска крв (Lysed Horse Blood, Oxoid, SR0048);
- Додаток за подобрување на растот на кампилобактер (Campylobacter Growth Supplement, Oxoid, SR0232) и
- Селективен додаток за кампилобактер (Preston Campylobacter Selective Supplement, Oxoid, SR0117), кој содржи антибиотици: Polymyxin B, Rifampicin, Trimethoprim и Cyclohexamide (инхибитор за биосинтеза на еукаритоски протеини)

Подготвените 70 ml, се разливаат во 100-милилитарски стерилни чашки (Deltalab Eurotubo, No. 409726). Особено е важно празниот простор над течноста во чашката да е минимален, за да се обезбедат идеални микроаерофилни услови при инкубација. Подготвената подлога, по препорака на производителот, се чува +4°C и се употребува најмногу до 7 дена од датумот на подготовка.



Слика 12. (а) Чашки со Preston бујон, (б) Петриevi плочи со mCCDA агар и (в) Петриevi плочи со Columbia крвен агар

2. Модифициран јагленов цефоперазон деоксихолатен агар (modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate agar, mCCDA - Oxoid). Подлогата се подготвува според рецептура посочена од производителот и се состои од следните 2 компоненти:

- Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base (Fluka, No. 59751) и
- Селективен додаток (CCDA Selective Supplement, Oxoid, SR0155) кој содржи Cefoperazone и Amphotericin B.

Подготвената подлога разлива во Петриevi плочи, по препорака на производителот, се чува на +4°C и може да се употреби до 14 дена од денот на

ПОДГОТОВКА.

3. Готови плочи на Columbia крвен агар (Biomerieux, No. 43041). Подлогите се комерцијално достапни и имаат рок на употреба до 90 дена. Columbia крвен агар е неселективна подлога која во составот содржи: триптон, пептон, екстракт од квасец, натриум хлорид, агар и овча крв.

#### 6.2.2. Селективно збогатување

Збогатувањето на средината за фаворизирање на растот на кампилобактериите се изведува на тој начин што земените брисеви и цекуми, асептички се пренесуваат прво во пластичните стерилни чашки со Preston бујонот и се поставуваат во соодветен сад за обезбедување на микроаерофилна средина како што е прикажано на слика 13.



Слика 13. Инокулирани чашки со Preston бујон припремени за инкубација во микроаерофилна атмосфера

По инокулацијата чашки се поставуваат во инкубатор тип Memmert INE 500 прикажан на слика 14, на температура од 42°C, во траење од 24 часа при обезбедени микроаерофилни услови.



Слика 14. Изглед на термостати (Mettmert INE 500), во кои се врши инкубацијата на засеаните подлоги и бујони

### 6.2.3. Примарна изолација

По селективното збогатување, со еза се земаат по 10  $\mu$ l од секој бујон и се врши засејување (култивирање) на Петриevi плочи со mCCDA подлога (слика 15). Засеаните плочи се поставуваат во специјални садови за анаеробно култивирање (BBL Gas Pak, Anaerobic Systems), во кои микроаерофилната атмосфера (8-10% O<sub>2</sub> и 5-7% CO<sub>2</sub>) се создава со гас генератори за таа намена Campygen, Oxoid, CN 00025A (слика 16).

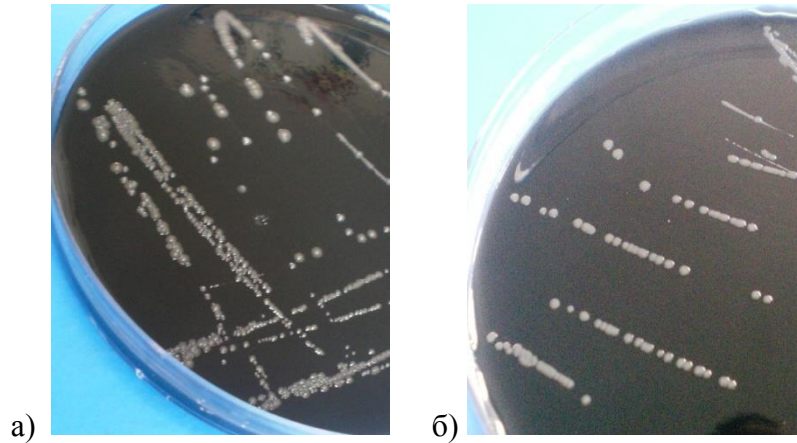


Слика 15. Засејување со еза на Петриева плоча со mCCDA подлога

Садовите се инкубираат на температура од 37°C, за време од 48 часа, со цел да се добијат одделни колонии на термотолерантни кампилобактерии. На сликата 17 е прикажан изгледот на израснатите колонии на бактериите *C. jejuni* и *C. coli* на mCCDA агар.



Слика 16. Комерцијални гас генератори (Campygen Oxoid, CN 00025A)

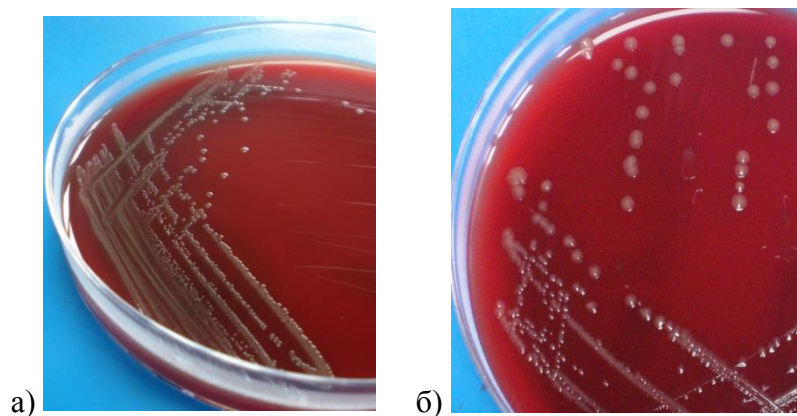


Слика 17. (а) Колонии на *C. jejuni* и (б) *C. coli* на mCCDA агар

#### 6.2.4. Добивање на чисти култури

Од секоја Петриева плоча во која има израснати карактеристични колонии на термотолерантните кампилобактерии (според нивниот изглед), се одбира најмалку една, или најмногу три колонии или соеви. Колкав ќе биде бројот на соеви кои се пресадуваат (1, 2 или 3) зависи од морфолошкиот изглед на колониите, односно се зема по една колонија од соеви со различни морфолошки карактеристики (големина, одсјај - заматеност, сплесканост - издигнатост итн.).

Секоја примарна колонија со еза од 10  $\mu$ l се засејува на Columbia крвен агар со цел да се добијат чисти култури. Инкубацијата на плочите со Columbia крвен агар се врши на температура од 37°C, за време од 24 часа во обезбедни микроаерофилни услови. По инкубацијата изгледот на карактеристичните *C. jejuni* и *C. coli* колонии на Columbia крвниот агар е прикажан на слика 18.

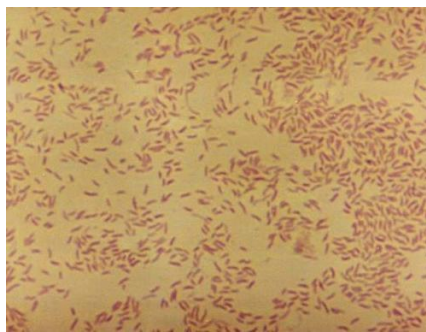


Слика 18. (а) Раст на колонии на *C. jejuni* и (б) *C. coli* на Columbia крвен агар

#### 6.2.5. Примарна идентификација на родот на изолираните соеви

За идентификација на видот на бактеријата постојат многу тестови. Меѓутоа, најчесто употребуваните фенотипски карактеристики пропишани во ISO стандардот и

аплицирани во голем број на истражувања (Hald and Madsen, 1997; Keramas et al., 2004; Nielsen et al., 1997; Petersen et al., 2001; Sails et al., 2002), вклучуваат подготовка на Gram-препарат, влажен препарат и оксидаза тест (Bactident oxidase, Merck, 1.13300). По изведените три анализи на добиените чисти култури, се потврдува дали сите три теста се позитивни тестови за родот *Campylobacter*. Во колку соевите се позитивни на сите три теста (Gram-негативни спирални или извиткани стапчиња, со карактеристична подвижност во вид на сврдел што се утврдува под микроскоп и позитивна продукција на оксидаза), се евидентираат како припадници на родот *Campylobacter* и се складираат т.е. соодветно чуваат за понатамошна идентификација.



Слика 19. Изглед на Грам-негативен препарат на културата *C. jejuni*

### 6.2.6. Складирање на изолираните соеви

Секој позитивен изолат се означува и складира на два начини т.е. на две различни температури и тоа краткотрајно складирање на  $-20^{\circ}\text{C}$  и долготрајно складирање на  $-80^{\circ}\text{C}$  во ултра замрзнувач.



Слика 20. (а) Краткотрајно складирање на изолираните соеви на *Campylobacter* spp. во замрзнувач и (б) долготрајно складирање во ултра замрзнувач

Краткотрајно складирање на  $-20^{\circ}\text{C}$  во замрзнувач (Слика 20а), се врши по засејување на културата во епрувети со Skim milk medium (Fluka, No. 70166) во кој е додаден 15-20% глицерол. На овој начин, складираните соеви остануваат живи најмалку 3 месеци на температура од  $-20^{\circ}\text{C}$ . Зачуваните изолати се користат за понатамошна идентификација на видот на бактеријата.

Долготрајно складирање на  $-80^{\circ}\text{C}$  во ултра замрзнувач (Слика 20б) се врши по засејување на колониите во глицерол бујон. Бујонот се подготвува од Триптоза соја бујон (Tryptic Soy Broth, Fluka, No. 22092) во кој се додаваат 15-20% глицерол и се разлева во стерилни пластични епруветки (Simport Cryovial T311-2) чиј изглед е прикажан на слика 21. Секоја епрувета потоа се засејува (инокулира) со поголемо количество на свеж изолат од бактеријата. Инокулираните епруветки се затвораат и ставаат во ултра-замрзнувач на  $-80^{\circ}\text{C}$ , каде остануваат виабилни со години. На овој начин складираните соеви, се одмрзнуваат само во случај кога има проблеми со истите изолати складирани на  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Слика 21. Пластични епруветки (cryovials) кои се користат за долготрајно складирање на термотолерантните кампилобактерии

## 6.3. ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА ВИДОТ

### 6.3.1. Идентификација на видот со диференцијални биохемиски тестови

Од идентификуваните соеви на ниво на род, се вршат соодветните тестови за идентификација на видот кои ги вклучуваат следните подоле објаснети тестови:

#### Толеранција на температура

Изолатите се засадуваат на готови комерцијално достапни подлоги со Columbia

крвен агар (Biomérieux, No. 43041) и се инкубираат во микроаерофилни услови на 3 различни температури: 25°C, 37°C и 42°C.

#### Раст во нормална атмосфера

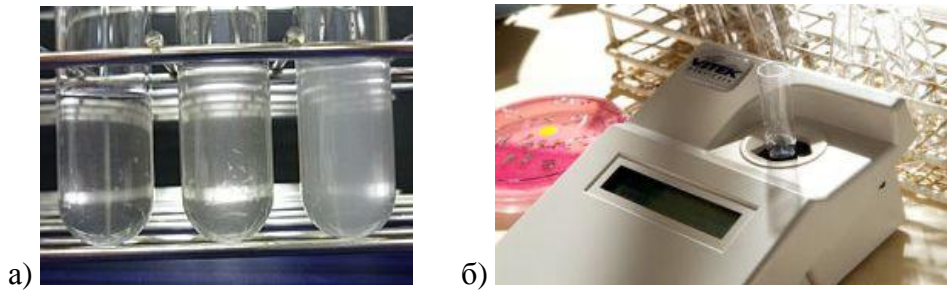
Секој изолат се засадува на Columbia крвен агар (Biomérieux, No. 43041) и се инкубира во нормална атмосфера на температура од 37°C.

#### Тест за хидролиза на хипурати

За изведба на тестот за хидролиза на хипуратот се користи стандарден кит (Fluka, No. 01869), кој го сочинуваат комерцијално произведени ленти-стрипови со нанесен натриум хипурат, нинхидрин и растворувач. Тестот е заснован на способноста на ензимот хипурат хидролаза да го хидролизира натриум хипуратот до бензоева киселина и глицин. Глициноот кој се создава при оваа реакција се детектира по 24 часа инкубација со помош на нинхидринот со кој всушност гради комплекс со сино-виолетова боја.

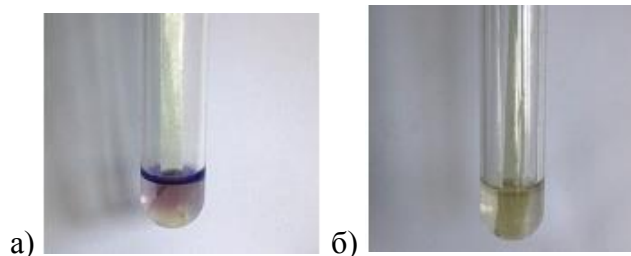
Постапката најпрво започнува со подготовка на бактериска суспензија со помош на Vitek Densichek (Слика 22) од испитуваната култура во 0,5 ml на солен растворувач со густина до 2 МекФарланди (McFarland).

Во микробиологијата McFarland стандарди се користат како референтни единици за подготовка на бактериска суспензија со сакана турбидност (заматеност) со што бројот на бактериите ќе биде во границите на посакуван или зададен опсег. Оригиналните Макфарланд-ови стандарди биле добиени со мешање на познати количини на бариум хлорид и сулфурна киселина, при што се формира талог од бариум сулфат, кој предизвикува заматеност. На пример единицата 0,5 Макфарланд стандард е подготвена со мешање на 0,05 ml од 1,175% бариум хлорид дихидрат ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), со 9,95 ml на 1% сулфурна киселина ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Меѓутоа, денес постојат Макфарланд стандарди подготвени од суспензии на латекс честички, со соодветен рок на траење преку кои се овозможува и подобра стабилност на суспензиите. Стандардот може да се споредува визуелно со суспензијата на бактерии кои се наоѓаат во стерилен солен раствор или во хранлив бујон. Ако бактериската суспензија е премногу матна, таа може да се разреци и обратно ако не е доволно матна, може да се додадат поголем број бактериски клетки.



Слика 22. (а) Изглед на различна турбидност на суспензија од бактериските клетки од 0.5, 1 и 2 McFarland-ови стандарди и (б) на инструментот Vitek Densichek за подготовка на бактериската суспензија.

Во подготвената суспензија се вметнува хипурат лентата (стрипот) и културата се инкубира 24 часа на 37°C. По инкубацијата, на сидот од епруветата се додаваат внимателно 200 µl од реагенсот нинхидрин. Епруветата без да се протресува се реинкубира на 37°C, 5-10 минути. Доколку на горниот слој на течноста има појава на сино-виолетова боја тоа е знак дека реакцијата е позитивна, во спротивно ако нема промена на бојата, т.е. не се појавува син прстен над растворот реакцијата е негативна и тоа јасно се забележува од сликата 23.



Слика 23. (а) Позитивна хипурат реакција на бактеријата *C. jejuni* и (б) негативна хипурат реакција кај колонија на *C. coli*

#### Индоксил ацетат тест

Тестот се изведува со комерцијално произведени индоксил ленти (стрипови) (Indoxyl Strips, Fluka, No. 04739). Хартиениот дел од лентата (каде е нанесен реагенсот 3-ацетоxy indol како супстрат за дејствување на испитуваниот ензим ацетат естераза), прво се навлажнува со 10 µl стерилна дестилирана вода и потоа на него се нанесува испитуваната колонија. Доколку во рок од 5 минути не дојде до промена на бојата на местото каде е нанесена колонијата, изолатот се прогласува за индоксил негативен, а доколку се појави сино - зеленкаста боја за индоксил позитивен (слика 24).



Слика 24. Позитивна индоксил реакција кај *C. jejuni*

Испитување на осетливоста/резистенцијата кон цефалотин и налидиксична киселина

Во епрувети со 2 ml стерилен физиолошки раствор, од секој бактериски изолат се подготвува суспензија со густина од 0,5 МекФарланди со Vitek Densichek. Суспензијата со помош на стерилен брис (стерилно ватирано стапче), се нанесува на готови Петриеве плочи со Columbia крвен агар (Biomérieux, No. 43041). Врз подлогата со помош на стерилна пинцета се ставаат по 2 антибиограм дискови од кои едниот е со антибиотикот цефалотин (KF30, Oxoid) а другиот со налидиксична киселина (NA30, Oxoid). Инкубацијата на Петриевите плочи се изведува во микроаерофилни услови обезбедени со гас генератори (CampyGen, Oxoid, CN 00025A) на температура од 41°C, во времетраење од 48 часа. По изведената инкубација (слика 25) се врши мерење на зоната на инхибиција со соодветен лењир за таа намена. Зоните на инхибиција кои се користат за интерпретација на резултатите изразени во mm се означуваат: за цефалотинот  $R \leq 14$  и  $S \geq 18$ , а за налидиксичната киселина  $R \leq 13$  и  $S \geq 19$  каде R значи резистентно, а S осетливо. Вредностите помеѓу двете наведени вредности се интермедијарни и се обележуваат со латинската буква I.



Слика 25. Засеана плоча со Columbia крвен агар (Biomérieux, No. 43041) со нанесени дискови со цефалотин и налидиксична киселина

Продукција на  $H_2S$  во Triple sugar iron (TSI) агар

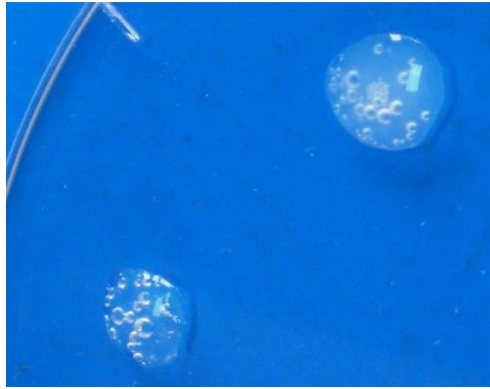
Секој изолат се инокулира на кос троен шеќерно железен агар (Triple sugar iron agar) кој во својот состав содржи: лактоза, сукроза, глюкоза и железо цитрат (Merck, 1.03915). Засејувањето на косиот агар се врши во вид на цик-цак линија почнувајќи од дното на епруветата, а на крај со еzata се врши убод во длабочината на агарот. Епруветите потоа се инкубираат на 37°C, во микроаерофилна атмосфера за време од 5 дена. Зацрнувањето на подлогата во околината на инокулумот, во убодот и/или на косината на агарот (слика 26) се смета како позитивна  $H_2S$  реакција.



Слика 26. TSI агар инокулиран со *C. jejuni* без продукција на  $H_2S$

Каталаза тест

На предметно стакло се нанесува соодветно од изолатите на кампилобактериите и истото се прелива со 3% водороден пероксид. Кај позитивниот тест, во рок од 30 секунди се забележува појава на меурчиња (слика 27).



Слика 27. Позитивна каталаза реакција кај *C. jejuni*

По изведените горенаведени тестови, идентификацијата на припадноста на видот на бактеријата се врши според совпаѓањето на детектираните фенотипски карактеристики на изолатот, со податоците дадени во Табелата 7.

Независно што при типизацијата на бактериските соеви може да се користат и генотипските методи, наједноставната метода на фенотипизација и резистотипизација е применета во овој случај.

#### **6.4. ДЕТЕКЦИЈА И ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА ИЗОЛАТИТЕ НА *CAMPYLOBACTER* SPP. СО PCR МЕТОДА**

Изолатите на *Campylobacter* spp. по одмрзнувањето се освежени во Preston или Bolton бујон, а потоа се засеани на Columbia крвен агар. По завршената инкубација во неопходните микроаерофилни услови за време од 24 часа се започнува со припремата за PCR.

- Во епендорф туба со 100  $\mu$ l TE (Tris-EDTA-Mg<sup>2+</sup>) се раствора една колонија од изолатот.
- Изолацијата на ДНК се врши со загревање на суспензијата на 95°C за време од 10 минути.



Слика 28. MRC Thermo shaker

- Се врши центрифугирање на 20.000 g за време од 5 минути



Слика 29. Центрифуга Hettich Mikro 120

- Примерокот се раствора во размер 1:10 во ТЕ
- Се складираат припремените изолати на  $-20^{\circ}\text{C}$  до почетокот на тестирањето.

*Овие изолати (термолизати) се користат и за другите две PCR методи (за детекција на гени на вируленција и на гени на антиминокробна резистенција).*

Протокол за PCR (според Wang et al., 2002)

Методата се врши во количина од 25  $\mu\text{l}$  која содржи:

- Припремен изолат на ДНК – 2,5  $\mu\text{l}$
- PCR Master Mix (2X) – 12,5  $\mu\text{l}$
- Primer Mix – 5  $\mu\text{l}$
- Дестилирана вода – 5  $\mu\text{l}$

Табела 9. Листа на прајмери за PCR методата за детекција на *Campylobacter* spp.

Прајмер	Секвенца (5'–3')	Температура на припојување $^{\circ}\text{C}$	Големина на ампликон bp
CJF	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	59	323
CJR	GCCACAACAAGTAAAGAAGC		
CCF	GTAAAACCAAAGCTTATCGTG	59	126
CCR	TCCAGCAATGTGTGCAATG		
CLF	TAGAGAGATAGCAAAAAGAGA	59	251

CLR	TACACATAATAATCCCACCC		
CUF	AATTGAAACTCTTGCTATCC		
CUR	TCATACATTTTACCCGAGCT	59	204
CFF	GCAAATATAAATGTAAGCGGAGAG		
CFR	TGCAGCGGCCCCACCTAT	59	435
23SF	TATACCGGTAAGGAGTGCTGGAG		
23SR	ATCAATTAACCTTCGAGCACCG	59	650

---

Амплификацијата е изведена во Qiagen Rotor Gene Q (слика 30) со следните подесувања:

- Иницијална денатурација на 95°C во времетраење од 10 минути
- 30 циклуси на:  
Денатурација на 95°C во времетраење од 30 секунди  
Припојување на 59°C во времетраење од 1 минута  
Екстензија на 72°C во времетраење од 1 минута
- Финална екстензија на 72°C во времетраење од 10 минути.



Слика 30. Qiagen Rotor Gene Q

#### Услови на електрофореза

Добиените PCR фрагменти (во количина од 5-8  $\mu$ l) се раздвоени со хоризонтална електрофореза во агарозен гел со густина 1.5% и 1X TBE буфер при напон од 100V и во времетраење од 45 минути. За проценка на големината на добиените фрагменти беше искористен маркер со позната молекулска маса (100 bp DNA ladder). Добиениот гел се бои со етидиум бромид во времетраење од 20-30 минути, потоа се вршеше одбојување со дестилирана вода. Сликањето на обоениот гел се вршеше во трансилуминатор под UV светлина (слика 32).



Слика 31. Thermo Easycast B2



Слика 32. Трансилуминатор Bio Rad Gel Doc XR+

## 6.5. PCR МЕТОДА ЗА ДЕТЕКЦИЈА НА ГЕНИ НА ВИРУЛЕНЦИЈА КАЈ ИЗОЛАТИ НА *CAMPYLOBACTER JEJUNI*

За оваа метода се користат термолизатите припремени за претходната PCR метода и кај нив се применува следниот:

Протокол за PCR (според Datta et al., 2003)

Методата се врши во количина од 25  $\mu$ l која содржи:

- Припремен изолат на ДНК – 2,5  $\mu$ l
- PCR Master Mix (2X) – 12,5  $\mu$ l
- Primer Mix – 5  $\mu$ l
- Дестилирана вода – 5  $\mu$ l

Табела 10. Листа на прајмери за PCR методата за детекција на гени на вируленција кај *Campylobacter jejuni*.

Прајмер	Секвенца (5'–3')	Температура на припојување	Големина на ампликон bp
flaA664	AATAAAAATGCTGATAAAACAGGTG	53	855
flaA1494	TACCGAACCAATGTCTGCTCTGATT		
cadF-F2B	TTGAAGGTAATTTAGATATG	45	400
cadF-R1B	СТААТАССТАААГТТГАААС		
racR-25	GATGATCCTGACTTTG	45	584
racR-593	TCTCCTATTTTTACCC		
dnaJ-299	AAGGCTTTGGCTCATC	46	720
dnaJ-1003	CTTTTTGTTTCATCGTT		
virB-232	TCTTGTGAGTTGCCTTACCCCTTTT	53	494
virB-701	CCTGCGTGTCTGTGTTATTTACCC		
ciaB-403	TTTTTATCAGTCCTTA	42	986
ciaB-1373	TTTCGGTATCATTAGC		
DS-18	CCTTGTGATGCAAGCAATC	49	370
DS-15	ACACTCCATTTGCTTTCTG		
cdtB-113	CAGAAAGCAAATGGAGTGTT	51	620
cdtB-713	AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT		
cdtC-192	CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA	47	182
cdtC-351	TTGGCATTATAGAAAATACAGTT		
wlaN-DL 39	TТААГАГСААГАТАТГААГГТГ	46	672
wlaN-DL 41	ССАТТТГААТТГАТАТТТТТГ		

Амплификацијата е изведена во Qiagen Rotor Gene Q со следните подесувања:

- Иницијална денатурација на 95°C во времетраење од 10 минути
- 30 циклуси на:

Денатурација на 94°C во времетраење од 1 минута

Припојување на температура соодветна на прајмерот во времетраење од 1 минута

Екстензија на 72°C во времетраење од 1 минута

- Финална екстензија на 72°C во времетраење од 10 минути.

## Услови на електрофореза

Добиените PCR фрагменти (во количина од 5-8 µl) се раздвоени со хоризонтална електрофореза во агарозен гел со густина 1.5% и 1X TBE буфер при напон од 100V и во времетраење од 45 минути. За проценка на големината на добиените фрагменти беше искористен маркер со позната молекулска маса (100 bp DNA ladder). Добиениот гел се бои со етидиум бромид во времетраење од 20-30 минути, потоа се вршеше одбојување со дестилирана вода. Сликањето на обоениот гел се вршеше во трансилуминатор под UV светлина.

## 6.6. PCR МЕТОДА ЗА ДЕТЕКЦИЈА НА ГЕНИ НА РЕЗИСТЕНЦИЈА КАЈ ИЗОЛАТИ НА *CAMPYLOBACTER JEJUNI* И *CAMPYLOBACTER COLI*

За оваа метода се користат термолизатите припремени за претходната PCR метода и кај нив се применува следниот:

Протокол за PCR (според Obeng et al., 2012)

Методата се врши во количина од 25 µl која содржи:

- Припремен изолат на ДНК – 2,5 µl
- PCR Master Mix (2X) – 12,5 µl
- Primer Mix – 5 µl
- Дестилирана вода – 5 µl

Табела 11. Листа на прајмери за PCR методата за детекција на гени на антимицробна резистенција кај *C. jejuni* и *C. coli*

Прајмер	Секвенца (5'–3')	Температура на припојување	Големина на ампликон bp
tet(O)-F	GCGTTTTGTTTATGTGCG	54	559
tet(O)-R	ATGGACAACCCGACAGAAG		
cmeB-F	TCCTAGCAGCACAATATG	54	241
cmeB-R	AGCTTCGATAGCTGCATC		
BlaOXA-61-F	AGAGTATAATACAAGCG	54	372
BlaOXA-61-R	TAGTGAGTTGTCAAGCC		
aphA-3-1-F	TGCGTAAAAGATACGGAAG	54	701
aphA-3-1-R	CAATCAGGCTTGATCCCC		

aadE1-F	GAACAGGATGAACGTATTCG	54	837
aadE1-R	GCATATGTGCTATCCAGG		

---

Амплификацијата е изведена во Qiagen Rotor Gene Q со следните подесувања:

- Иницијална денатурација на 94°C во времетраење од 5 минути
- 30 циклуси на:
  - Денатурација на 94°C во времетраење од 30 секунди
  - Припојување на 54°C во времетраење од 30 секунди
  - Екстензија на 72°C во времетраење од 1 минута
- Финална екстензија на 72°C во времетраење од 10 минути.

#### Услови на електрофореза

Добиените PCR фрагменти (во количина од 5-8 µl) се раздвоени со хоризонтална електрофореза во агарозен гел со густина 1.5% и 1X TBE буфер при напон од 100V и во времетраење од 45 минути. За проценка на големината на добиените фрагменти беше искористен маркер со позната молекулска маса (100 bp DNA ladder). Добиениот гел се бои со етидиум бромид во времетраење од 20-30 минути, потоа се вршеше одбојување со дестилирана вода. Сликањето на обоениот гел се вршеше во трансилуминатор под UV светлина.

## 7. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Истражувањето во целост беше спроведено во текот на 2017-2020 година. Вкупно се тестирани 283 примероци со потекло од живина. Од фазата на примерно производство т.е. одгледување на бројлерите се земено 64 примероци на брисеви од клоака. Од фазата на колење се земено вкупно 166 примероци на цекуми и од фазата пред продажба т.е. пред дистрибуција до потрошувачите се земено 53 примероци на брисеви од трупови.

### 7.1. ЗАСТАПЕНОСТ НА КАМПИЛОБАКТЕРИИТЕ ВО ФАЗИТЕ НА ПРОИЗВОДСТВО НА СВЕЖО ПИЛЕШКО МЕСО

Со цел да се следи преваланцата на кампилобактериите во производните фази односно на фармата, во кланицата и во ладилникот сумирани се резултатите и соодветно прикажани во Табелата 12. Може да се заклучи дека од вкупно 283 земено мостри (клоакални брисеви, цекуми и брисови од трупови), *Campylobacter* spp. беше изолиран од 169 мостри или процентуално од 59,7% од вкупно земените мостри.

Најголем процент на изолирани кампилобактерии е забележан во фармата и тој изнесува 73,4%. Од производната фаза - кланица процентот на изолирани соеви кај примероците на цекуми изнесува 61,4%, додека во фазата ладилник забележан е најнизок процент (37,7%) на идентификувани *Campylobacter* видови.

Врз основа на добиените резултати за апсолутните и процентуалните вредности на идентификуваните соеви на бактерии (табела 12) во соодветниот период на истражувањето се забележува дека доминантен е термотолерантниот вид *C. jejuni* кој е изолиран од сите 3 фази со вкупно 111 идентификувани изолати (39,2%).

Втор по својата застапеност е сојот *C. coli*, кој исто така е изолиран од сите фази на производство, но во помал број на примероци (43) односно со процентен удел од 15,2%.

Понатака следува *C. lari* со 9 изолати т.е. 3,2 % и последен претставник на кампилобактериите со најмал број од само 6 примероци (односно 2,1%) е *C. upsaliensis*.

Табела 12. Апсолутни и процентуални вредности на изолирани кампилобактерии во соодветните видови мостри земени од фазите на производство на пилешко месо.

Фаза	Локација на земање на мостри	Број на мостри	Вид на мостра	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Фарма за бројлери	Фарма	64	Брис од клоака	47 (73,4%)	31 (48,4%)	13 (20,3%)	2 (3,1%)	1 (1,5%)
Фаза на колење	Кланица	166	Цекум	102 (61,4%)	68 (40,9%)	25 (15,1%)	6 (3,6%)	3 (1,8%)
Фаза пред продажба	Ладилник	53	Брис од труп	20 (37,7%)	12 (22,6%)	5 (9,4%)	1 (1,9%)	2 (3,8%)
	<b>Вкупно</b>	283	/	169 (59,7%)	111 (39,2%)	43 (15,2%)	9 (3,2%)	6 (2,1%)

Гледано по фази и локации на земање на мострите, највисок процент на *C. jejuni* е добиен на фармата каде тој беше застапен со 48,4%. На останатите локации, овој процент беше понизок и изнесува: во кланицата 40,9% кај испитаните цекуми и најмал кај брисевите од трупови во ладилникот со само 22,6% застапеност. Видот *C. coli* е изолиран над 20% во фармата за одгледување на бројлерите и тоа 20,3%. Во останатите две фази, кланицата и ладилникот, преваленцата на бактеријата *C. coli* беше помала и изнесуваше 15,1% и 9,4%.

*C. lari* е изолиран во најголем процент од фармата (3,1%), а со најмал процент во ладилникот со само 1 изолиран примерок односно 1,9%. Последниот идентификуван сој на кампилобактериите е видот *C. upsaliensis* кој е изолиран во најголем процент во ладилникот и изнесува 3,8%.

Анализирајќи ги вкупните резултати од сите производни фази може да се констатира дека во првата фаза т.е. во **фармите за бројлери** преваленцата на *Campylobacter* spp. е највисока и истата е во согласност со повеќето други истражувања кои се занимавале со истата проблематика. Во табелата 13 се прикажани резултатите за преваленцата на кампилобактериите во испитуваната фарма и публикуваните резултати од други автори кои вршеле истражување со слична проблематика. Според резултатите од студиите изведени во Малезија (Saleha, 2002), Виетнам (Schwan, 2010) и Чешка

(EFSA, 2010) детектираната преваленца на *Campylobacter* spp. изнесувала 72,6%, 76,0% и 61,1% соодветно. Меѓутоа, постојат и примери во литературата со доста повисока, но и пониска детектирана преваленца. На пример, застапеноста на *Campylobacter* spp. во една студија изведена во Турција на фарми за бројлери изнесувала 92,9% (Yildirim et al., 2005), додека пониска преваленца на *Campylobacter* spp., е детектирана на пример во Австрија (EFSA, 2013), Швајцарија ((EFSA, 2013) и Данска (EFSA 2018) со 48,2, 37,3, 16,6%, соодветно.

Табела 13. Споредба на апсолутни и процентуални вредности на детектирани кампилобактерии во испитаните мостри од фарма за бројлери со други истражувања

Извор	Бр. на мостри	Вид на мостра	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Фарма за бројлери	64	Брис од клоака	47 (73,4%)	31 (48,4%)	13 (20,3%)	2 (3,1%)	1 (1,50%)
Малезија Saleha, 2002	508	Брис од клоака	369 (72,6%)	270 (53,1%)	99 (19,5%)	/	/
Виетнам Schwan, 2010	96	Брис од клоака	73 (76,0%)	58 (60,4%)	15 (15,6%)	/	/
Турција Yildirim et al., 2005	57	Брис од клоака	53 (92,9%)	49 (86%)	4 (7,0%)	/	/
Чешка EFSA, 2010	690	Брис од клоака	422 (61,1%)	/	/	/	/
Австрија EFSA, 2013	342	Брис од клоака	165 (48,2%)	/	/	/	/
Швајцарија EFSA, 2013	445	Брис од клоака	166 (37,3%)	/	/	/	/
Данска EFSA, 2017	3316	Брис од клоака	550 (16,6%)	/	/	/	/

Сите овие податоци укажуваат на висока контаминација со *Campylobacter* spp. на фармите за бројлери, што е од голема важност за понатамошниот тек на процесот на добивање на безбеден производ од микробиолошки аспект. Со намалување на бројот на бројлери носители на овој микроорганизам се намалува ризикот од контаминација на финалниот производ, но и од вкрстена контаминација на други прехранбени производи. Поради ова и поради сè поголемата опасност од труењата со овој патоген микроорганизам на глобално ниво, Европската комисија ја имплементираше Директивата 2003/99/ЕС за мониторинг и собирање на информации за зоонози, која ги

обврзува земјите членки на ЕУ на собирање на релевантни и споредливи податоци за зоонозите, нивните причинители, нивната антимицробна резистенција како и случаите на труењата со храна контаминирана со кампилобактерии. Во листата на зоонози покрај *Campylobacter* spp., спаѓаат и *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Brucella* spp., *Echinococcus* spp., *Trichinella* spp, веротоксичната *E. coli* и туберкулозата т.е. *Mycobacterium bovis*. Според тоа, земјите членки на Европската унија треба да ги следат трендовите и изворите на овие зоонози на својата територија, поднесувајќи годишен извештај до Европската комисија кој ги содржи соодветните податоци за нивно присуство. По доставувањето на податоците од сите земји членки на ЕУ, Европската агенција за безбедност на храна (EFSA) ги сумира и анализира истите и го издава годишниот извештај за целата Европска унија (Community Summary Report).

Доминантен вид на *Campylobacter* кај живината потврдено во многу научни истражувања е *C. jejuni*. Според тоа и резултатите за видовата застапеност во фармата за одгледување на бројлери поврдуваат дека се работи за истиот вид на кампилобактерија. *C. Jejuni* во фармата во нашето истражување беше застапен со 48,4% т.е. во 31 изолат од вкупно 64 испитани мостри. Меѓутоа, во литературата која сведочи за студии со слична тематика преваленцата на *C. jejuni* се движи во широк размер. На пример, во претходно наведената студија изведена во Турција (Yildirim et al., 2005), учеството на *C. Jejuni* на фарма за бројлери изнесувало 86% односно 49 позитивни примероци од вкупно 57 испитани примероци на клоакални брисеви. Пониска преваленца е утврдена во други студии изведени во Малезија (Saleha, 2002) и Виетнам (Schwan, 2010) каде оваа бактерија е застапена со 53,1% и 60,4% соодветно. Во овие две студии преваленцата на вториот по удел вид на бактерија *C. coli* изнесувал соодветно 19,5% и 15,6%, додека во испитувањето извршено во Турција (Yildirim et al., 2005) застапеноста на *C. coli* изнесувала 7,0%. Во нашата испитувана фарма *C. coli* беше детектиран со нешто повисок процентен удел (преваленца од 20,3%) т.е. во 13 примероци. Останатите два вида на кампилобактерии, *C. lari* и *C. upsaliensis*, учествуваа со низок процент 3,1 и 1,5%.

Реалната застапеност на *Campylobacter* spp. во процесот на добивање на свежо пилешко месо е следена во **фазата на колење**, во која со испитувањето на примероците на цекуми (слепи црева) е констатирано присуството на кампилобактериите. Според литературните податоци познато е дека во различни примероци како брисеви, цекуми, кожа и други органи од пилешко месо се пронајдени различни нивоа на соодветните

видови на кампилобактерии. За да се добие реална слика за преваленцата на *Campylobacter* spp., во фазата на колење и истата да се спореди со слични изведени истражувања во табелата 14 се прикажани соодветно резултатите за детектираните видови на кампилобактерии во цекуми од пилешки трупови.

Табела 14. Споредба на апсолутни и процентуални вредности на детектирани кампилобактерии во испитаните мостри од фазата на колење со други истражувања

Извор	Бр. на мостри	Вид на мостра	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Кланица	166	Цекум	102 (61,4%)	68 (40,9%)	25 (15,1%)	6 (3,6%)	3 (1,8%)
Чешка EFSA, 2018	143	Цекум	94 (65,7%)	58 (40,6%)	36 (25,2%)	/	/
Италија Di Giannatale, 2010	393	Цекум	251 (63,9%)	189 (48,1%)	199 (50,6%)	5 (1,2%)	/
Холандија Van Asselt, 2008	2380	Цекум	744 (31,3%)	/	/	/	/
Шведска EFSA, 2018	4645	Цекум	564 (12,1%)	513 (11%)	/	/	/
Финска EFSA, 2018	1630	Цекум	29 (1,8%)	/	/	/	/

Во фазата на колење е утврдена преваленца на *Campylobacter* spp. од 61,4% односно 102 позитивни примероци од 166 земени примероци на цекуми.

Во научното мислење публикувано од EFSA (EFSA, 2021) кое се однесува на *Campylobacter* spp. е потенцирана важноста на овој микророганizam и неговото влијание врз јавното здравје и се евидентира дека просечната преваленца кај бројлерите во фазата пред продажба во последните извештаи се движи околу 37% (табела 15). Овој податок е донекаде и обесхрабрувачки и соодветно укажува на неефикасноста на активностите и инвестициите кои беа превземени со цел намалување на присутноста на кампилобактериите во пилешкото месо во Европската Унија.

Табела 15. Застапеност на *Campylobacter* spp. во ЕУ (2010-2018)

Година	Преваленца по фази на производство		
	Продажба	Колење	Фарма
2018		37,5%	26%
2017		37,4%	12,3%
2016		36,7%	27,3%
2015	59%	37,7%	15,3%
2014	36,4%	9,9%	27,2%
2013	25,2%	12,0%	15,1%
2012	24,9%	15,8	13,2%
2011	34%	29,3%	17,8%
2010	22,9%	44,7%	18,2%

Анализирајќи ја застапеноста на кампилобактериите во оваа фаза од производството во нашето истражување и во други истражувања во кои биле искористени истиот вид на примероци (цекуми) можеме да согледаме дека добиените резултати се блиски со оние добиени во истражувањата направени во Чешка (EFSA, 2018) и Италија (Di Giannatale, 2010) каде преваленцата на *Campylobacter* spp. изнесувала 65,7% и 63,9%. Во Холандија (Van Asselt, 2008) при испитувањата за застапеноста на бактериите во примероци на цекуми утврдена била пониска застапеност на *Campylobacter* spp. од 31,3%. Согласно на барањата на мониторинг програмите за контрола на зоонозите во Шведска и Финска (EFSA, 2018), анализирани се примероци на цекуми и е утврдена преваленца од 12,2% и 1,8%, соодветно. Според овие наведени референци се забележува дека постои голема варијација во процентуалната застапеност на *Campylobacter* spp. во различни региони.

Видовата застапеност на кампилобактериите во фазата на колење укажува дека *C. jejuni* е најзастапен вид со детектирани 68 позитивни примероци на цекуми (40,9%), додека останатите видови се застапени со помал процентен удел. Слични резултати за процентната застапеност на *C. jejuni* биле забележани во испитувањето направено во Италија (Di Giannatale et al., 2010), каде од вкупно земени 393 примероци бил детектиран *C. jejuni* во 189 примерок од цекуми, односно со преваленца од 48,1%.

Во однос на видот *C. coli* кој беше утврден во 25 примероци на цекуми (15,1%), Di Giannatale добила повисоки податоци за застапеност на *C. coli* во цекумите која изнесувала 50,6%. Во ова истражување инетересна беше констатацијата за голем број на примероци кои ги содржеа и *C. jejuni* и *C. coli*. За останатите два вида на

кампилобактерии преваленцата во фазата на колење за *C. lari* беше 3,6%, а за *C. upsaliensis* 1,8%, при анализата на примероците на цекуми.

Од пилешките трупови кои се складираат во ладилник по завршениот процес, односно во фазата пред продажба, беа земани брисеви од цел труп, а резултатите добиени за апсолутните и процентите удели на застапеност на одделните видови на кампилобактерии се споредени во табелата 16 со резултати добиени од други литературни податоци.

Табела 16. Споредба на апсолутни и процентуални вредности на детектирани кампилобактерии во испитаните мостри од фазата пред продажба со други истражувања

Извор	Бр. на мостри	Вид на мостра	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Ладилник	53	Брис од труп	20 (37,7%)	12 (22,6%)	5 (9,4%)	1 (1,9%)	2 (3,8%)
Сенегал Cardinale et al., 2003	300	Кожа	168 (56%)	113 (37,7%)	55 (18,3%)	/	/
Иран Rahimi et al., 2008	280	Пилешко месо	157 (56,1%)	140 (50,0%)	17 (6,1%)	/	/
Нигерија Salihu et al., 2009	681	Пилешко месо	558 (81,9%)	340 (49,9%)	156 (22,9%)	39 (5,7%)	23 (3,4%)
САД Han et al., 2009	141	Пилешко месо	61 (43,3%)	39 (27,7%)	12 (8,5%)	/	/
САД Bailey et al., 2008	398	Испироци од трупови	350 (88,0%)	/	/	/	/
Турција Ramuk et al., 2009	210	Испироци од трупови	141 (67%)	120 (57,1%)	85 (40,5%)	5 (2,4%)	/
Хрватска EFSA, 2018	726	Кожа од врат	537 (74%)	362 (50%)	164 (22,6%)	/	/
Обединето кралство EFSA, 2018	4069	Кожа од врат	2015 (49,5%)	/	/	/	/
Унгарија EFSA, 2018	331	Пилешко месо	51 (15,4%)	/	/	/	/

Застапеноста на *Campylobacter* spp. во фазата пред продажба не е на завидно ниво и покрај фактот дека беше најниска. Таа изнесуваше 37,7% односно од вкупно земените 53 брисеви, 20 примероци беа позитивни и е помала во однос на останатите литературни податоци презентирани во табелата 16. Тоа претставува и предмет за пошироко размислување, бидејќи свежото пилешко месо добиено по процесот на колење и ладење оди директно во продажба како разладено свежо пилешко месо и соодветно до потрошувачите. При неправилно приготвување и/или недоволен термички третман, како и контаминација на останатите прехранбени продукти со бактериите од родот

*Campylobacter* при ракување со претходно контаминираното месо, можна е појава на труења со храна кај луѓето.

Споредбата на добиените резултати во нашето испитување со податоците од литературата, потврдуваат дека постои висока застапеност на *Campylobacter* spp. во месото од бројлери во различни земји. Така на пример, во студија изведена во Сенегал (Cardinale et al., 2003) е утврдено присуство на *Campylobacter* spp. од 56% во примероци од кожа. Во друга студија изведена во Иран (Rahimi and Tajbakhsh, 2008) преваленцата на кампилобактерии изнесувала 56,1%, а во САД (Han et al., 2009) таа изнесувала 43,3% за примероци на пилешко месо. Во Турција (Pamuk and Akgun, 2009) по изведените анализи на испироците од пилешките трупови откриена била преваленца од 67%, додека најголема застапеност на кампилобактериите од 81,9% и 88% е утврдена соодветно во Нигерија (Salihu et al., 2009) во примероци на пилешкото месо и во САД (Bailey et al., 2008) во примероци од испироци на пилешките трупови. Во земјите од Европската Унија во извештајот на EFSA за 2017 година една од земјите кои се издвојуваат по високата преваленца е Хрватска каде кампилобактериите се потврдени во 74% од примероците на кожа од врат со 50% присутност на *C. jejuni*. Исто така, повисока застапеност од онаа која ја утврдивме во нашето истражување е потврдена во Обединетото Кралство каде кампилобактериите се детектирани во 49,5% од земените примероци на кожа од врат. Во Унгарија (EFSA, 2018) се анализирани примероци на пилешко месо и е утврдена застапеност на *Campylobacter* spp. од 15,4%. Сите презентирани литературни податоци укажуваат на висока и секако недозволива контаминација во оваа фаза од производството на свежо пилешко месо.

Преваленцата на најзастапениот вид т.е. *C. jejuni* во испитаните примероци изнесуваше 22,6% односно 12 позитивни примероци од 53 земени мостри. Студијата изведена во Сенегал (Cardinale et al., 2003) јавува за преваленца на *C. jejuni* од 37,7%, во Иран (Rahimi and Tajbakhsh, 2008) истата изнесувала 50,0% слично како и во Нигерија (Salihu et al., 2009) каде била 49,9%. Во испитувањето извршено во САД (Han et al., 2009) детектираната преваленца на *C. jejuni* изнесувала 27,7%. Најголема застапеност на овој патоген микроорганизам е документирана во студија во Турција (Pamuk and Akgun, 2009) каде таа изнесувала 57,1%.

Видот *C. coli* е втор по процентуалната застапеност во фазата пред продажба, исто како и во другите две фази. Тука неговата застапеност изнесуваше 9,4% односно 5 примероци од вкупно 53 брисеви во кои беше детектиран *C. coli*. Во студиите кои се

занимавале со оваа проблематика и кои претходно беа споменати неговата преваленца била утврдена по следниот редослед: во Сенегал, Иран, Нигерија, САД и Турција со 18,3%, 6,1%, 22,9%, 8,5% и 40,5% соодветно.

За разлика од претходните две фази во третата фаза од производството на свежо пилешко месо трет вид по застапеност беше *C. upsaliensis* кој беше детектиран во 2 примерока односно 3,8%. Во испитувањата изведени во Нигерија (Salihu et al., 2009) неговата застапеност била 3,4%.

Најмала застапеност во фазата пред продажба имаше *C. lari* и тоа само во еден примерок односно 1,9%. Во истражувањето (Pamuk and Akgun, 2009) во Турција застапеноста на овој кампилобактер изнесувала 2,4%, додека во студијата на Salihu (Salihu et al., 2009) во Нигерија таа изнесувала 5,7%.

## **7.2. СЕЗОНСКА ЗАСТАПЕНОСТ НА *CAMPYLOBACTER* spp.**

Во повеќе Европски држави, колонизацијата на бројлерите со *Campylobacter* spp., но и појавата на болеста кај луѓето има потврдена сезонска варијација, при што највисока инциденца е утврдена во текот на летото и есента (EFSA 2010; Jorgensen et al., 2011, Cousins et al., 2019). Причините за оваа сезонска варијација сеуште се нејасни, но секако дека на фармите мора да се нотира влијанието на повисоката температура врз зголеменото присуство на инсекти на фармите и присуството на дивите птици додека за појавата на кампилобактериозата кај луѓето влијание имаат и патувањата, готвењето храна на отворено, пливањето во отворени води и контактот со животните (Schönberg-Norio et al., 2004; Kapperud 2003).

Табела 17. Преглед на испитани примероци по сезона во изведеното истражување

МАРТ	Број на мостри	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Фарма	16	9 (56,3%)	6 (37,5%)	3 (18,8%)
Кланица	42	21 (50,0%)	13 (31,0%)	5 (11,9%)
Ладилник	11	3 (27,3%)	1 (9,1%)	0 (0,0%)
<b>Вкупно</b>	<b>69</b>	<b>33 (47,8%)</b>	<b>20 (29,0%)</b>	<b>8 (11,6%)</b>
ЈУНИ	Број на мостри	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Фарма	16	13 (81,3%)	8 (50,0%)	4 (25,0%)
Кланица	42	28 (66,7%)	17 (40,5%)	7 (16,7%)
Ладилник	12	6 (50,0%)	4 (33,3%)	2 (16,7%)
<b>Вкупно</b>	<b>70</b>	<b>47 (67,1%)</b>	<b>29 (41,4%)</b>	<b>13 (18,6%)</b>
АВГУСТ	Број на мостри	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Фарма	16	15 (93,8%)	12 (75,0%)	3 (18,8%)
Кланица	42	32 (76,2%)	26 (61,9%)	9 (21,4%)
Ладилник	15	8 (53,3%)	6 (40,0%)	2 (13,3%)
<b>Вкупно</b>	<b>73</b>	<b>55 (75,3%)</b>	<b>44 (60,3%)</b>	<b>14 (19,2%)</b>
ДЕКЕМВРИ	Број на мостри	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Фарма	16	10 (62,5%)	5 (31,3%)	3 (18,8%)
Кланица	40	21 (52,5%)	12 (30,0%)	4 (10,0%)
Ладилник	15	3 (20,0%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)
<b>Вкупно</b>	<b>71</b>	<b>34 (47,9%)</b>	<b>18 (25,4%)</b>	<b>8 (11,3%)</b>

Во текот на ова истражување највисока преваленца на *Campylobacter* spp. беше утврдена во текот на месец Август со вкупно 55 потврдени изолати од 73 земени примероци (75,3%). Во текот на месец Јуни преваленцата изнесуваше 67,1% и во месеците Март и Декември присуството на *Campylobacter* spp. беше на најниско ниво кое изнесуваше 47,8% и 47,9%. Детален преглед на добиените резултати по сезони се дадени во табела 17.

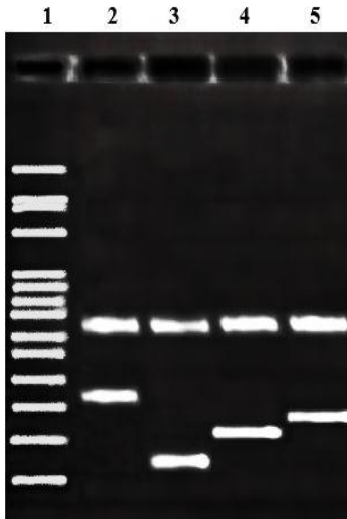
### 7.3. ВОВЕДУВАЊЕ И ЕВАЛУАЦИЈА НА PCR МЕТОДА ЗА ДЕТЕКЦИЈА И ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА НАЈЧЕСТИТЕ ПРЕТСТАВНИЦИ НА *CAMPYLOBACTER* SPP.

Со цел воведување и евалуација на PCR метода за детекција и идентификација на кампилобактериите искористени се 108 изолати на *C. jejuni*, 35 изолати на *C. coli*, 5 изолати на *C. lari* и 5 изолати на *C. upsaliensis* идентификувани со класичната микробиолошка методологија при ова истражување. Во текот на испитувањата (табела 18) утврдена е 100% точност на употребениот PCR метод при идентификацијата на изолатите.

Табела 18. Преглед на испитани примероци со PCR методата за детекција на различни кампилобактерии

Потекло на изолат	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Брис од клоака	30/30	10/10	2/2	1/1
Цекум	68/68	20/20	2/2	2/2
Пилешко месо	10/10	5/5	1/1	2/2
<b>Вкупно</b>	<b>108/108</b>	<b>35/35</b>	<b>5/5</b>	<b>5/5</b>

Поставениот PCR протокол се покажа како прецизна и лесна метода за изработка со времетраење од околу 3 часа. Дополнителна предност на овој протокол е можноста за детекција на *hipO* генот кај *C. jejuni* кој може да не се експресира при класичните фенотипски анализи со што се отежнува аналитичката работа во лабораторија. Покрај истражувачката цел овој протокол овозможува примена и во рутинската работа и детекцијата на термофилните кампилобактерии во сложени матрикси на храна каде бројот на кампилобактерии може да е доста низок (>100 cfu/g). Тестираниот PCR протокол претставува ефективна алтернатива на традиционалните биохемиски реакции за типизација и идентификација на *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, и *C. fetus subsp. fetus* изолирани во храна, животни и луѓе.



Слика 33. Визуелизација на PCR ампликони на гени за идентификација.

Линија 1: 100-bp скала

Линија 2: *C. jejuni* 323-bp

Линија 3: *C. coli* 126-bp

Линија 4: *C. upsaliensis* 204-bp

Линија 5: *C. lari* 251-bp

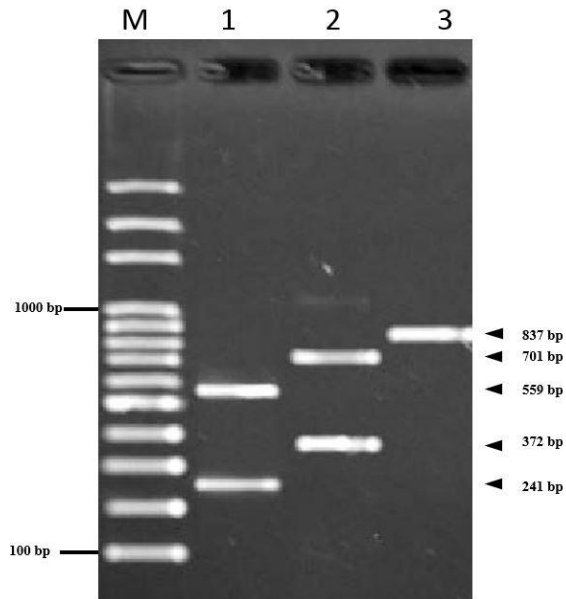
#### **7.4. ВОВЕДУВАЊЕ И ЕВАЛУАЦИЈА НА PCR МЕТОДА ЗА ДЕТЕКЦИЈА НА ГЕНИТЕ НОСИТЕЛИ НА АНТИМИКРОБНАТА РЕЗИСТЕНЦИЈА КАЈ ИЗОЛАТИТЕ НА *C. JEJUNI* И *C. COLI***

Оваа студија дава увид за потенцијалот на PCR методата за детекција на гените на антимикробна резистенција, за преваленцата на овие гени кај испитуваните изолати и за можноста за појава на резистенција кон повеќе класи на антибиотици.

Како што претходно беше наведено кампилобактериозата најчесто е самоограничена инфекција и не изискува третман со антибиотици. Сепак, кај луѓе кај кои постои ризик од посериозни компликации (деца, постари лица и лица со намален имунитет) е потребна таква терапија како би се спречила појава на бактериемија или секвели на болеста. Овој момент ја нагласува потребата за следење на антимикробната резистенција на кампилобактериите во храната и кај луѓето.

Во оваа студија фокусот беше на следните гени на антимикробна резистенција: *StmB*, *Bla<sub>oxA-61</sub>*, *tet(O)*, *aph-3-1* и *aadE*. Секој од овие гени се поврзува со резистенција кон одредена класа на антибиотици освен *StmB* кој е асоциран со резистенција кон повеќе класи на антибиотици.

Во овој дел од истражувањето беа анализирани 108 изолати на *C. jejuni* и 35 изолати на *C. coli* кои потекнуваа од ланецот на производство на пилешко месо.



Слика 34. Визуелизација на PCR ампликони на гени на антимикробна резистенција

М: 100-bp скала

Линија 1: *CmeB* и *tet(O)* гени;

Линија 2: *BlaOXA-61* и *aph-3-I* гени;

Линија 3: *aadE* ген

Табела 19. Утврдена преваленца на гени носители на антимикробна резистенција кај изолати на *C. jejuni* и *C. coli*

Вид	Број на изолати	<i>CmeB</i>	<i>BlaOXA-61</i>	<i>Tet(O)</i>	<i>aph-3-I</i>	<i>aadE</i>
<i>C. jejuni</i>	108	21 (19,4%)	27 (25,0%)	21 (19,4%)	0 (0%)	15 (11,4%)
<i>C. coli</i>	35	33 (94,3%)	1 (2,9%)	14 (40,0%)	5 (14,3%)	1 (2,9%)

#### 7.4.1. Детекција и застапеност на генот *CmeB* кај *C. jejuni* и *C. coli*

*CmeABC* ефлукс пумпата кај микроорганизмите е позната како важен механизам за резистенција кон повеќе антибиотици вклучувајќи ги тука и макролидите и флуорокинолоните. Оваа ефлукс пумпа (*CmeABC*) е кодирана од оперон кој се состои од три гени: *CmeA* (периплазматски протеин), *CmeB* (транспортер на лекот преку внатрешна мембрана) и *CmeC* (протеин на надворешна мембрана). Во многу експерименти каде е извршена инактивација на оваа ефлукс пумпа кај кампилобактериите дошло до осетливост на бактериите кон антибиотици кон кои тие се интринзично резистентни покажувајќи ја клучната улога на ефлукс пумпата за интринзичната, но и стекнатата резистенција на кампилобактериите (Lin et al, 2002).

Покрај тоа што е носител на резистенцијата кон антибиотици *CmeB* генот е интересен и поради фактот што тој е носител и на резистенција кон различни детергенти, бои, дезинфициенси и жолчна киселина (Lin et al., 2002; Pumbwe et al., 2004).

Во направеното истражување нашите резултати покажаа огромна разлика во застапеноста на овој ген кај *C. jejuni* и кај *C. coli*. Изолатите на *C. jejuni* покажаа застапеност на овој ген од 19,4% додека од вкупно испитаните 35 изолати на *C. coli* дури 33 (94,3%) од нив го носеа овој ген.

Овој податок е многу поблизок со резултатите добиени при студија изведена кај бројлери чувани и на конвенционален (затворен) начин и кај бројлери чувани на отворено (Obeng et al., 2012). Во споменатата студија *CmeB* генот не бил детектиран кај ниту еден изолат на *C. jejuni* и во двата типа на одгледување на бројлерите. Кај *C. coli* овој ген бил детектиран во 41,7% од изолатите добиени при затворен начин на чување и кај 100% од изолатите добиени од отворениот начин на одгледување.

За разлика од овие резултати во истражувањето направено во САД и изолати добиени од мисирки (Olah et al., 2006) преваленцата на генот *CmeB* изнесувала 85,5% кај *C. jejuni* и 14,5% кај изолатите на *C. coli*.

#### **7.4.2. Детекција и застапеност на генот *Bla<sub>OXA-61</sub>* кај *C. jejuni* и *C. coli***

Ензимот  $\beta$ -лактамаза е доста сличен со другите лактамази кои се наоѓаат кај *Fusobacterium*, *Acinetobacter* и *Pseudomonas*, и тие ја моделираат резистенцијата кон пеницилин, оксацилин, ампицилин, пиперацилин итн. Преваленцата на генот *Bla<sub>OXA-61</sub>* кај кампилобактериите доста варира во хуманата и анималната популација (Lachance et al., 1991; Griggs et al., 2009; Tajada et al., 1996).

Во нашето истражување генот *Bla<sub>OXA-61</sub>* беше потврден во 22,2% од изолатите на *C. jejuni* и само кај 2,9% од изолатите на *C. coli*. Добиените резултати даваат поинаква слика од резултати добиени во слични студии. Така на пример, во студија изведена во Чешка (Bardon et al., 2017) авторите утврдиле преваленца на генот *Bla<sub>OXA-61</sub>* од 74% кај изолати на *C. jejuni* и 67,4% кај изолати на *C. coli*. Во едно друго истражување (Obeng et al., 2012) авторите детектирале преваленца на генот *Bla<sub>OXA-61</sub>* од 65,4% кај *C. jejuni* и 37,5% кај *C. coli*.

#### **7.4.3. Детекција и застапеност на генот *tet(O)* кај *C. jejuni* и *C. coli***

Овој *tet(O)* ген овозможува експресија на високо ниво на резистенција кон тетрациклините (до 512  $\mu\text{g/mL}$ ) (Gibreel et al., 2004). Во една споредбена студија е потврдено дека сите изолати кои го носеле овој ген покажале резистенција кон тетрациклините, додека оние кои не го носеле овој ген не покажале резистенција што

значи дека експресијата на резистенцијата кај овој ген е максимална (Zhao et al., 2015). Овој ген е лоциран на трансферабилен плазмид наречен *pTet* плазмид, кој е доста често потврдун кај *C. jejuni* и *C. coli* (Chen et al., 2013). Овој плазмид (*pTet*) може да претставува и плазмид за повеќекратна резистенција (multiple drug-resistant - MDR plasmid) поради можноста да носи и гени за резистенција покрај тетрациклините и кон аминокликозидите (Chen et al., 2013).

По направените анализи во нашето истражување *tet(O)* генот беше потврден кај 19,4% од изолатите на *C. jejuni* и кај 40% од изолатите на *C. coli*. Во слично истражување направено од група автори во Кина (Du et al., 2018) генот *tet(O)* бил детектиран кај 8,3% во изолатите на *C. jejuni* и 64,5% во изолатите на *C. coli*. Во студија пак изведена во Австралија (Obeng et al., 2012) била утврдена преваленца на овој ген во 11,2% од изолати на *C. coli* додека во изолатите на *C. jejuni* воопшто не бил детектиран (0%). Доста ниска преваленца на генот *tet(O)* била утврдена во истражувањето на Laprade (Laprade et al., 2016) каде при анализите на изолатите на *C. jejuni* овој ген бил детектиран во 11% од случаите додека при анализа на изолатите на *C. coli* преваленцата изнесувала само 4%. Разгледувајќи ги публикациите на оваа тема највисоката преваленца на овој ген во изолати на *C. jejuni* беше забележана во студија направена во Чешка каде авторите (Bardon et al., 2017) утврдиле преваленца од 76,9% додека за изолатите на *C. coli* таа изнесувала 47%.

#### **7.4.4. Детекција и застапеност на генот *aph-3-1* кај *C. jejuni* и *C. coli***

Во оваа студија генот *aph-3-1* не беше детектиран кај ниту еден испитуван изолат на *C. jejuni* додека кај изолатите на *C. coli* тој беше детектиран во 5 примероци (14,3%). Вообичаено овој ген нема висока преваленца кај *Campylobacter* spp. што секако има позитивен ефект и се одразува со ниска резистенција на бактериите од овој род кон аминокликозидните антибиотици. Тоа може да се заклучи и од други резултати добиени во други студии. Во студија направена во Турција (Issa et al., 2018) преваленцата на овој ген била 3,7% и 7,2% во изолати на *C. jejuni* и *C. coli* соодветно. Во истражувањето на друга група автори (Devi et al., 2019) во изолатите на овие два соја не бил воопшто утврден овој ген. Во истражување спроведено во Кина (Qin et al., 2012) генот *aph-3-1* бил детектиран кај 7,3% од изолатите на *C. jejuni* и во ниту еден изолат на *C. coli*.

#### 7.4.5. Детекција и застапеност на генот *aadE* кај *C. jejuni* и *C. coli*

По направените анализи преваленцата на овој ген изнесуваше 11,4% кај изолати на *C. jejuni* и 2,9% кај изолати на *C. coli*. Во повеќето студии кои го испитувале овој ген и неговата застапеност во *Campylobacter* spp. се потврдени слични вредности. Во студијата на Cantero (Cantero et al., 2017) застапеност на овој ген изнесувала 6,3% кај *C. jejuni* и 0% кај *C. coli*. Блиски резултати до наведените се добиени и во студија изведена во Австралија (Obeng et al., 2012) каде преваленцата на *aadE* генот во испитуваните кампилобактерии изнесувала 0%. Во истражување направено во Полска (Wysok, 2020) исто така не е утврден ниту еден изолат на *C. jejuni* кој го носел овој ген додека кај изолати на *C. coli* застапеноста била 22%. Највисока застапеност на овој ген кај изолати на *C. coli* била детектирана во Кина (Du et al., 2018) и таа изнесувала 48,9% додека кај *C. jejuni* била на доста ниско ниво (0,8%) слично на останатите истражувања.

Сумирајќи ги резултатите добиени во делот за присуство на гени носители на антимикробната резистенција може да се забележи дека најголем процент од изолатите на *C. coli* поседуваа 2 или 3 гени на антимикробна резистенција (51,4% и 40%). Сите пет гени од испитуваните беа детектирани само во еден единствен изолат.

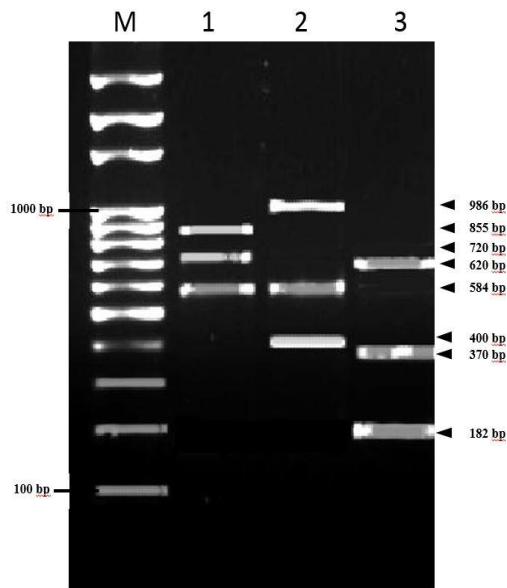
Евидентна е помалата застапеност на испитуваните гени кај изолатите на *C. jejuni*. Изолатите на *C. jejuni* кои беа дел од ова истражување во најголем дел носеа еден ген на антимикробна резистенција (55,6%) додека 36 од нив (33,3%) не покажаа присуство на ниту еден ген од испитуваните.

Табела 20. Дистрибуција на гените носители на антимикробна резистенција во испитуваните изолати на *C. jejuni* и *C. coli*

Изолат	0 гени	1 ген	2 гени	3 гени	4 гени	5 гени
<i>C. jejuni</i> = 108	36 (33,3%)	60 (55,6%)	12 (11,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>C. coli</i> = 35	1 (2,9%)	18 (51,4%)	14 (40,0%)	1 (2,9%)	0 (0%)	1 (2,9%)

## 7.5. ВОВЕДУВАЊЕ И ЕВАЛУАЦИЈА НА РСR МЕТОДА ЗА ДЕТЕКЦИЈА НА ГЕНИТЕ НА ВИРУЛЕНЦИЈА КАЈ ИЗОЛАТИТЕ НА *C. JEJUNI*

Изолатите на *C. jejuni* (вкупно 108 со потекло од производството на пилешко месо) беа анализирани за присуство на следните гени на вируленција: *flaA* (вклучен во подвижноста на бактериите), *cadF*, *racR*, *virB11*, *dnaJ*, *ciaB* (активни при адхезијата, колонизацијата и инвазијата на епителните клетки) *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *wlaN* (со цитотоксична функција).



Слика 35. Визуелизација на РСR ампликони на гени на вируленција

М: 100-bp скала

Линија 1: *racR*, *dnaJ* и *flaA* гени;

Линија 2: *cadF*, *racR* и *ciaB* гени;

Линија 3: *cdtC*, *cdtA* и *cdtB* гени

### 7.5.1. Детекција и застапеност на генот *flaA* кај *C. jejuni*

Како што е претходно наведено флагелумот на *C. jejuni* и подвижноста што тој ја овозможува се есенцијални за многу аспекти од метаболизмот на оваа бактерија. Едни од најважните се: колонизацијата на епителните клетки, вируленцијата и секрецијата на одредени протеини во клетката домакин.

Во нашето истражување каде беше опфатена и анализата на преваленцата на овој ген во изолати на *C. jejuni* истиот беше детектиран во 50% од случаите. Бидејќи *flaA* е еден од најважните протеини на флагелумот неговиот недостаток може да доведе до појава на краток нефункционален флагелум. Ова пак води до драматичен пад на способноста за колонизација на *C. jejuni* (Nuijten et al, 2000).

При пребарувањето на студии кои го истражувале овој ген во светската литература детектиравме различни резултати. Највисока преваленца на овој ген била

утврдена во студиите на Datta, Andrzejewska, Koolman, Bang и Ramires каде истата изнесувала 100%. Нешто пониска преваленца детектирало истражувањето на Thakur во САД (Thakur et al., 2010) каде овој ген бил присутен во 82% од испитаните изолати на *C. jejuni*. Доста слични резултати како во нашето истражување евидентирале две студии изведени во Канада и Чиле (Laprade et al., 2016; Lapierre et al., 2016) каде преваленцата на генот *flaA* изнесувала 42% и 63%, соодветно.

Табела 21. Споредба на застапеноста на генот *flaA* во различни истражувања

Но.	Автори	Застапеност	Држава
1.	Наши податоци	50%	Р.С. Македонија
2.	Laprade et al., 2016	42%	Канада
3.	Lapierre et al., 2016	63%	Чиле
4.	Thakur et al., 2010	82%	САД
5.	Datta et al., 2003	100%	Јапонија
6.	Andrzejewska et al., 2015	100%	Полска
7.	Koolman et al., 2015	100%	Ирска
8.	Bang et al., 2003	100%	Данска
9.	Ramires et al., 2020	100%	Бразил

### 7.5.2. Детекција и застапеност на генот *virB11* кај *C. jejuni*

Застапеноста на генот *virB11* во нашето истражување покажа дека ниту еден од испитуваните изолати на *C. jejuni* не е носител на истиот. Научната литература која се однесува на истражувањата на овој ген исто така дава информации за ниска застапеност на овој ген кај кампилобактериите. Највисоките детектирани проценти на застапеност кои ги утврдивме при пребарувањето на литературата се од истражувањата изведени во Јапонија и Полска (Datta et al., 2003; Krutkiewicz et al., 2010) каде застапеноста изнесувала 9,5% и 13,6%. Во следната група на истражувања се студиите на Nahar, Bang, Andrzejewska, Bardon, Feodoroff, Wiczorek и Kordinas каде преваленцата на овој ген се движела помеѓу 7,7% и 1,7%. Во нашето истражување застапеноста на овој ген изнесуваше 0% што соодветствува со резултати добиени во неколку други студии (табела X). Некои од авторите го елаборираат ова отсуство на генот *virB11* поради неговата плазмидна локација што овозможува негов лесен трансфер надвор и во бактериската клетка (Ghorbanalizadgan et al., 2014).

Табела 22. Споредба на застапеноста на генот *virB11* во различни истражувања

Но.	Автори	Застапеност	Држава
1.	Наши податоци	0%	Р.С. Македонија
2.	Ghorbanalizadgan et al., 2014	0%	Иран
3.	Talukder et al., 2008	0%	Бангладеш
4.	Thakur et al., 2010	0%	САД
5.	Muller et al., 2006	0%	Германија
6.	Zhang et al., 2016	0%	Кина
7.	Kordinas et al., 2005	1,7%	Грција
8.	Wieczorek et al., 2018	1,9%	Полска
9.	Feodoroff et al., 2010	2,4%	Финска
10.	Bardon et al., 2017	4,4%	Чешка
11.	Andrzejewska et al., 2019	6,6%	Полска
12.	Bang et al., 2003	7,5%	Данска
13.	Nahar et al., 2018	7,7%	Бангладеш
14.	Datta et al., 2003	9,5%	Јапонија
15.	Krutkiewicz et al., 2010	13,6%	Полска

### 7.5.3. Детекција и застапеност на генот *cadF* кај *C. jejuni*

Ова е еден од гените кои се есенцијални за вируленцијата кај *Campylobacter* spp. бидејќи игра важна улога во адхезијата и колонизацијата на епителните клетки на домаќинот. Овој процес се одвива со поврзување на протеинот *cadF* со фибронектинот во епителните клетки посредувано од четири аминокиселински остатоци на протеинот *cadF* (фенилаланин – аргинин - леуцин – серин, FRLS комплекс).

Овој ген е еден од постојаните и стабилни гени на кампилобактериите кој во некои истражувања бил искористен и за успешна детекција на кампилобактериите (Konkel et al., 1999; Wieczorek et al., 2013). Генот *cadF* е доста застапен кај *C. jejuni*, но и кај изолати на *C. coli*. Досега изведените истражувања на овој ген покажуваат преваленца која се движи од 76-100% кај изолати на *C. jejuni*, и преваленца од 56-100% кај изолати на *C. coli* (при што изолатите имале различно потекло: луѓе, живина, мисирки, мачки, кучиња, овци, свињи и говеда).

Во нашето истражување застапеноста на овој ген кај изолатите на *C. jejuni* изнесуваше 100% што е идентично со многу од студиите кои го анализирале присуството на овој ген. Во научната литература детектиравме една студија која

евидентирала нешто пониска застапеност на овој ген (El-Jakee et al., 2015) која изнесувала 78,6%.

Табела 23. Споредба на застапеноста на генот *cadF* во различни истражувања

№.	Автори	Застапеност	Држава
1.	Наши податоци	100%	Р.С. Македонија
2.	El-Jakee et al., 2015	78,6%	Египет
3.	Lapierre et al., 2016	98%	Чиле
4.	Wieczorek et al., 2018	98,7%	Полска
5.	Datta et al., 2003	100%	Јапонија
6.	Koolman et al., 2015	100%	Ирска
7.	Bang et al., 2003	100%	Данска
8.	Ramires et al., 2020	100%	Бразил
9.	Ghorbanalizadgan et al., 2014	100%	Иран
10.	Talukder et al., 2008	100%	Бангладеш
11.	Muller et al., 2006	100%	Германија

#### 7.5.4. Детекција и застапеност на генот *racR* кај *C. jejuni*

Протеинот RacR е дел од дво-компонентниот систем кој го гради заедно со протеинот RacS и кој има голема улога при колонизацијата на епителните клетки. Овој систем (RacRS) делува и како активатор и како репресор во зависност од надворешната температура (Bras et al., 1999).

Застапеноста на овој ген во студиите кои вршеле истражувања кај кампилобактериите е доста различна. Највисока застапеност е утврдена во студиите направени во Јапонија, Чешка и Полска (Datta et al., 2003; Bardon et al., 2017; Wieczorek et al., 2018) каде истата изнесувала 90,5%, 95,6% и 97,9%. Во друга студија изведена во Полска застапеноста на овој ген изнесувала 56% (Andrzejewska et al., 2019).

Во нашите анализи преваленцата на овој ген кај изолатите на *C. jejuni* изнесуваше 27,8% што е многу слично со резултатите кои се добиени во студијата на Laprade (Laprade et al., 2016) каде истата изнесувала 21%.

Табела 24. Споредба на застапеноста на генот *racR* во различни истражувања

Но.	Автори	Застапеност	Држава
1.	Наши податоци	27,8%	Р.С. Македонија
2.	Laprade et al., 2016	21%	Канада
3.	Andrzejewska et al., 2019	56%	Полска
4.	Lapierre et al., 2016	60%	Чиле
5.	Thakur et al., 2010	62%	САД
6.	Ramires et al., 2020	75%	Бразил
7.	Koolman et al., 2015	83,3%	Ирска
8.	Kordinas et al., 2005	87,1%	Грција
9.	Datta et al., 2003	90,5%	Јапонија
10.	Bardon et al., 2017	95,6%	Чешка
11.	Wieczorek et al., 2018	97,9%	Полска

#### 7.5.5. Детекција и застапеност на генот *dnaJ* кај *C. jejuni*

Генот *dnaJ* кој е директно под транскрипциска контрола на претходно споменатиот ген *racR* (Bras et al., 1999), е задолжен за кодирањето на протеините на температурен стрес, што во голема мера влијае на успехот на колонизацијата на клетките на домаќинот (Konkel et al., 2004; Ziprin et al., 2001).

Табела 25. Споредба на застапеноста на генот *dnaJ* во различни истражувања

Но.	Автори	Застапеност	Држава
1.	Наши податоци	44,4%	Р.С. Македонија
2.	Thakur et al., 2010	16%	САД
3.	Laprade et al., 2016	20%	Канада
4.	Lapierre et al., 2016	30-50%	Чиле
5.	Reddy et al., 2018	59%	Јужна Африка
6.	Ramires et al., 2020	87,5%	Бразил
7.	Datta et al., 2003	90,5%	Јапонија
8.	Bardon et al., 2017	96,6%	Чешка
9.	Koolman et al., 2015	100%	Ирска

Исто како и кај претходниот испитуван ген (*racR*) во претходно извршените студии кои се однесувале на генот *dnaJ* приметлива е доста варијабилна застапеност. Така на пример, во студии изведени во Ирска и Чешка (Koolman et al., 2015, Bardon et al., 2017) авторите детектирале доста висока преваленца (100% и 96,6%) во испитуваните

изолати на *C. jejuni*. Пониска застапеност детектирале две студии во Бразил и Јапонија (Ramires et al., 2020, Datta et al., 2003) каде истата изнесувала 87,5% и 90,5%. Резултатите од нашето истражување на овој ген утврдија застапеност од 44,4% што е соодветно на резултатите добиени во студиите на Lapierre (30-50%) и Reddy (59%). Најниска застапеност на генот *dnaJ* била утврдена во две студии во САД и Канада (Thakur et al., 2010, Laprade et al., 2016) со вредности од 16% и 20%.

#### 7.5.6. Детекција и застапеност на генот *ciaB* кај *C. jejuni*

Протеините од група Cia т.е. кампилобактер инвазивните антигени (*Campylobacter invasive antigen - Cia*), се нормално вклучени во инвазијата на епителните клетки кај човекот, но имаат и големо значење при колонизацијата на дигестивниот систем кај живината (Biswas et al, 2007). Уште една важна карактеристика на протеинот CiaB е неговата секреција и внесување во епителните клетки преку флагелумот (Konkel et al, 2004; Song et al, 2004).

Генот *ciaB* кој го кодира протеинот CiaB е доста истражуван во научните кругови кои работат на ова поле. Генерално, литературата соопштува дека се работи за постојан и стабилен ген кај *C. jejuni* кој исто како и претходно споменатиот ген *cadF* може да се користи за детекција на изолати на оваа бактерија.

Табела 26. Споредба на застапеноста на генот *ciaB* во различни истражувања

№.	Автори	Застапеност	Држава
1.	Наши податоци	100%	Р.С. Македонија
2.	Reddy et al., 2018	32%	Јужна Африка
3.	Bardon et al., 2017	60%	Чешка
4.	Laprade et al., 2016	74%	Канада
5.	Koolman et al., 2015	83,3%	Ирска
6.	Talukder et al., 2008	95%	Бангладеш
7.	Feodoroff et al., 2010	99%	Финска
8.	Datta et al., 2003	100%	Јапонија
9.	Ghorbanalizadgan et al., 2014	100%	Иран
10.	Ramires et al., 2020	100%	Бразил
11.	Muller et al., 2006	100%	Германија
12.	Abu-Madi et al., 2016	100%	Катар

Застапеноста на генот *ciaB* во студиите најчесто е максимална или нешто под максимумот. За тоа сведочат многу студии каде се искористени повеќе протоколи и методи за потврда на постоењето на овој ген кај испитуваните изолати. Во нашето истражување анализата евидентираше присуство на овој ген кај сите изолати на *C. jejuni*. Пребарувањето на литературата кое го спроведовме детектираше две студии каде преваленцата беше нешто пониска и тоа во Јужна Африка (Reddy et al., 2018) каде изнесувала 32% и во Чешка (Bardon et al., 2017) со 60%.

### 7.5.7. Детекција и застапеност на генот *wlaN* кај *C. jejuni*

Како што е претходно наведено генот *wlaN* е доста важен при избегнувањето на имуниот одговор на домакилот, но и можната појава на Guillain-Barré и Miller-Fisher синдромот кај луѓето.

Во претходните студии на овој ген утврдени се различни нивоа на застапеност на истиот кај изолати на *C. jejuni*. Највисоката преваленца на генот *wlaN* која се сретнува во литературата е во студиите на Muller (Muller et al., 2006) и Andrzejewska (Andrzejewska et al., 2019) и истата изнесувала 54,5% и 54,6%. Пониска застапеност од 23%, 23,8%, 25% и 35% е детектирана во студии изведени во Финска, Јапонија, Бразил и Чиле (табела 27).

Табела 27. Споредба на застапеноста на генот *wlaN* во различни истражувања

Но.	Автори	Застапеност	Држава
1.	Наши податоци	13,9%	Р.С. Македонија
2.	Bardon et al., 2017	2,3%	Чешка
3.	Talukder et al., 2008	7,5%	Бангладеш
4.	Koolman et al., 2015	11,1%	Ирска
5.	Wieczorek et al., 2018	15,2%	Полска
6.	Kordinas et al., 2005	16%	Грција
7.	Feodoroff et al., 2010	23%	Финска
8.	Datta et al., 2003	23,8%	Јапонија
9.	Ramires et al., 2020	25%	Бразил
10.	Lapierre et al., 2016	35%	Чиле
11.	Muller et al., 2006	54,5%	Германија
12.	Andrzejewska et al., 2019	54,6%	Полска

Во нашите испитувања овој ген беше потврден во 13,9% од тестираните изолати на *C. jejuni*. Оваа преваленца е доста слична со онаа која била потврдена во студиите

направени во Ирска, Полска и Грција со вредности од 11,1%, 15,2% и 16% (Koolman et al., 2015; Wiczorek et al., 2018; Kordinas et al., 2005).

Најниска застапеност на генот *wlaN* се евидентира во истражувањата на Bardon (Bardon et al., 2017) и на Talukder (Talukder et al., 2008) каде истата била на ниво од 2,3% и 7,5%.

#### **7.5.8. Детекција и застапеност на гените *cdtA*, *cdtB* и *cdtC* кај *C. jejuni***

Холотоксинот CDT е единствениот фактор на вируленција кој е сличен помеѓу кампилобактериите и останатите цревни патогени бактерии (Poly et al, 2007). Самото прикачување на бактеријата и понатамошното делување на овој токсин врз епителната клетка предизвикува продукција на интерлеукин-8 (IL-8), што пак е проследено со насобирање на фагоцити, макрофаги, моноцити и неутрофили (Young et al, 2007). Ова најчесто се отсликува со инфламаторна дијареја кај заболените.

По направените анализи во нашите изолати на *C. jejuni* гените кои го кодираат формирањето на поединиците на CDT токсинот (*cdtA*, *cdtB* и *cdtC*) беа потврдени во вредности од 52,8%, 52,8% и 47,2%. За експресија на токсичноста на овој комплекс е потребно присуство на сите три единици (т.е. на трите гени) кај еден изолат (Pickett et al., 1996). Сумирајќи ги добиените резултати утврдивме дека кај 30,6% од нашите изолати на *C. jejuni* се содржани сите три гени.

Во литературата се евидентирани голем број на студии кои го имаат обработувано присуството на овие гени (табела 28).

Од студиите кои детектирале највисока застапеност треба да се напоменат оние изведени во Јапонија (Datta et al., 2003) и во Бразил (Ramires et al., 2020) каде во сите испитани изолати биле утврдено присуството на овие гени. Евидентиран е и пример каде во иста земја (Полска) во две различни студии се утврдени различни вредности за застапеноста на овие гени (Krutkiewicz et al., 2010 и Wiczorek et al., 2018).

Во две студии направени во Северна Америка (во Канада и во САД) авторите детектирале слична преваленца на гените на CDT токсинот во вредности од 66%, 70% и 86% (Laprade et al., 2016) и 72%, 68% и 76% (Thakur et al., 2010).

Доста слични вредности како во нашето истражување добиле студиите направени од страна на авторите Ghorbanalizadgan (58,3%, 58,3% и 58,3%), Lapierre (63%, 58% и 60%) и Reddy (56%, 63% и 56%) за трите гени (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*) соодветно.

Табела 28. Споредба на застапеноста на гените *cdtA*, *cdtB* и *cdtC* во различни истражувања

No.	Автори	Застапеност			Држава
		<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>	
1.	Наши податоци	52,8%	52,8%	47,2%	Р.С. Македонија
2.	Datta et al., 2003	100%	100%	100%	Јапонија
3.	Koolman et al., 2015	72,2%	100%	94,4%	Ирска
4.	Nahar et al., 2018	38,5%	61,5%	50%	Бангладеш
5.	Ramires et al., 2020	100%	100%	100%	Бразил
6.	Ghorbanalizadgan et al., 2014	58,3%	58,3%	58,3%	Иран
7.	Laprade et al., 2016	66%	70%	86%	Канада
8.	Lapierre et al., 2016	63%	58%	60%	Чиле
9.	Krutkiewicz et al., 2010	63,6%	81,8%	84,1%	Полска
10.	Wieczorek et al., 2018	96,6%	96,6%	97,6%	Полска
11.	Reddy et al., 2018	56%	63%	56%	Јужна Африка
12.	Thakur et al., 2010	72%	68%	76%	САД

### 7.5.9. Профили на вируленција кај *C. jejuni*

Во нашето истражување по направените анализи на гените на вируленција направивме и преглед на вкупниот број на појавени профили на вируленција кај испитуваните изолати на *C. jejuni*. Од претходно наведеното може да се заклучи дека гените т.е. факторите на вируленција кои тие ги кодираат во голема мера го условуваат процесот на преживување и колонизација во цревата кај живината и понатака процесите на адхезија, инвазија и излучувањето на токсини во дигестивниот тракт кај луѓето.

Направените тестирања детектираа вкупно 15 профили на вируленција (табела 29). Најзастапен беше профилот со бр. 7 кој ги носеше трите гени *flaA*, *cadF* и *ciaB* со 19,4% застапеност кај испитаните изолати. Следен профил на вируленција е профилот со бр. 12 (*cadF*, *ciaB*, *cdtA* и *cdtB*) со застапеност од 13,9% од изолатите на *C. jejuni*. На трето место по застапеност од 11,1% се најдоа два профила со следните гени на вируленција: профил со бр. 9 (*cadF*, *racR*, *dnaJ*, *ciaB*, *cdtA*, *cdtB* и *cdtC*) и профилот со бр. 15 (*cadF*, *ciaB*). Профилот со бр. 1 во кој се застапени сите 9 гени (освен *virB11* кој не беше детектиран во ниту еден изолат) беше детектиран само во 2,8% од изолатите на *C. jejuni*.

Табела 29. Патотипови - Профили на вируленција (virulence patterns) кај *C. jejuni*

No.	Детектирани патотипови – профили на вируленција									N	%
1.	<i>flaA</i>	<i>cadF</i>	<i>racR</i>	<i>dnaJ</i>	<i>ciaB</i>	<i>wlaN</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>	3	2,8
2.	<i>flaA</i>	<i>cadF</i>	<i>racR</i>	<i>dnaJ</i>	<i>ciaB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>		6	5,6
3.	<i>flaA</i>	<i>cadF</i>	<i>dnaJ</i>	<i>ciaB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>			3	2,8
4.	<i>flaA</i>	<i>cadF</i>	<i>ciaB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>					9	8,3
5.	<i>flaA</i>	<i>cadF</i>	<i>racR</i>	<i>dnaJ</i>	<i>ciaB</i>	<i>cdtC</i>				6	5,6
6.	<i>flaA</i>	<i>cadF</i>	<i>dnaJ</i>	<i>ciaB</i>	<i>wlaN</i>	<i>cdtC</i>				6	5,6
7.	<i>flaA</i>	<i>cadF</i>	<i>ciaB</i>							21	19,4
8.	<i>cadF</i>	<i>racR</i>	<i>dnaJ</i>	<i>ciaB</i>	<i>wlaN</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>		3	2,8
9.	<i>cadF</i>	<i>racR</i>	<i>dnaJ</i>	<i>ciaB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>			12	11,1
10.	<i>cadF</i>	<i>dnaJ</i>	<i>ciaB</i>	<i>wlaN</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>			3	2,8
11.	<i>cadF</i>	<i>dnaJ</i>	<i>ciaB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>				3	2,8
12.	<i>cadF</i>	<i>ciaB</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>						15	13,9
13.	<i>cadF</i>	<i>dnaJ</i>	<i>ciaB</i>	<i>cdtC</i>						3	2,8
14.	<i>cadF</i>	<i>ciaB</i>	<i>cdtC</i>							3	2,8
15.	<i>cadF</i>	<i>ciaB</i>								12	11,1

Важно е да се напомене дека целиот механизам на патогенеза кај *C. jejuni* сеуште е енигматичен, бидејќи и самите фактори на вируленција во споредба со оние кои ги поседуваат другите цревни патогени микророганализми се уникатни. Во 2000 година (Parkhill et al., 2000) беше направен огромен прогрес во истражувањето на кампилобактериите со секвенционирањето на целиот геном на *C. jejuni* NCTC11168 (1.6 mb), но сепак на молекуларно ниво механизмот на вируленција кој води до појава на кампилобактериоза не е целосно расветлен (Bouwman et al., 2013). Сеуште се води научна дебата кој од факторите кај луѓето, живината и бактериите допринесува за варијациите во клиничката манифестација на болеста. Исто така, сеуште постои едно отворено прашање за точниот механизам на адхезија, инвазија и миграција низ цревните ентероцити при инфекциите со *C. jejuni* (Kovács, 2014).

Рангирајќи ги соодветно на бројот на гени кои ги поседуваа можевме да евидентираме само мал број на изолати кои беа носители на 8 или 9 гени на вируленција (8,3% и 2,8%, соодветно). Највисока застапеност имаа изолатите на *C. jejuni* кои беа носители на 3 гени на вируленција (22,2%). Интересна беше констатацијата дека во 16,7% од случаите изолатите беа носители на 7 гени на вируленција што е делумно загајувачки поради способноста на кампилобактериите за лесна асимилација на плазмид трансферабилни гени од други микророганализми.

Табела 30. Преглед на вкупен број на гени на вируленција по изолат

Изолат	0-1 ген	2 гени	3 гени	4 гени	5 гени	6 гени	7 гени	8 гени	9 гени
<i>C. jejuni</i> = 108	0 (0%)	12 (11,1%)	24 (22,2%)	18 (16,7%)	9 (8,3%)	15 (13,9%)	18 (16,7%)	9 (8,3%)	3 (2,8%)

## 7.6. АПЛИКАЦИЈА НА ПРИМЕНЕТИТЕ РСР МЕТОДИ КАЈ ХУМАНИ ИЗОЛАТИ

За евалуација на РСР методите при работа со хумани изолати беа искористени 10 изолати (8 изолати на *C. jejuni* и 2 изолати на *C. coli*) со потекло од фецес кај луѓе превземени од Институтот за микробиологија и паразитологија при Медицинскиот факултет во Скопје.

Употребениот РСР метод за детекција и конфирмација на видовите на *Campylobacter* spp. имаше 100% точност во споредба со класичната микробиолошка

метода употребена кај овие изолати и во Лабораторијата на Институтот за микробиологија и паразитологија и во Лабораторијата за микробиологија на храна при Институтот за храна на ФВМ-С (табела 31).

Табела 31. Детекција и конфирмација на хумани изолати на *Campylobacter* spp. со применетата PCR метода

Потекло на изолат	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Фецес од луѓе	8/8	2/2	/	/

Применетата PCR метода за детекција на гените носители на антиминобна резистенција исто така се покажа како соодветна за употреба и кај изолати од луѓе. По завршувањето на анализите беа детектирани мал број на изолати (табела 32) кои беа носители на овие гени.

Евидентирани беа само три изолати на *C. jejuni* (H1, H7 и H8) кои беа носители на само еден ген на антиминобна резистенција. Во два случаи (H1 и H8) се работеше за генот *Bla<sub>oxa-61</sub>* и во случајот на изолатот H7 го детектиравме генот *tet(O)*.

При анализата на двата изолати на *C. coli* детектирано беше присуството на генот *CmeB* и во двата случаи.

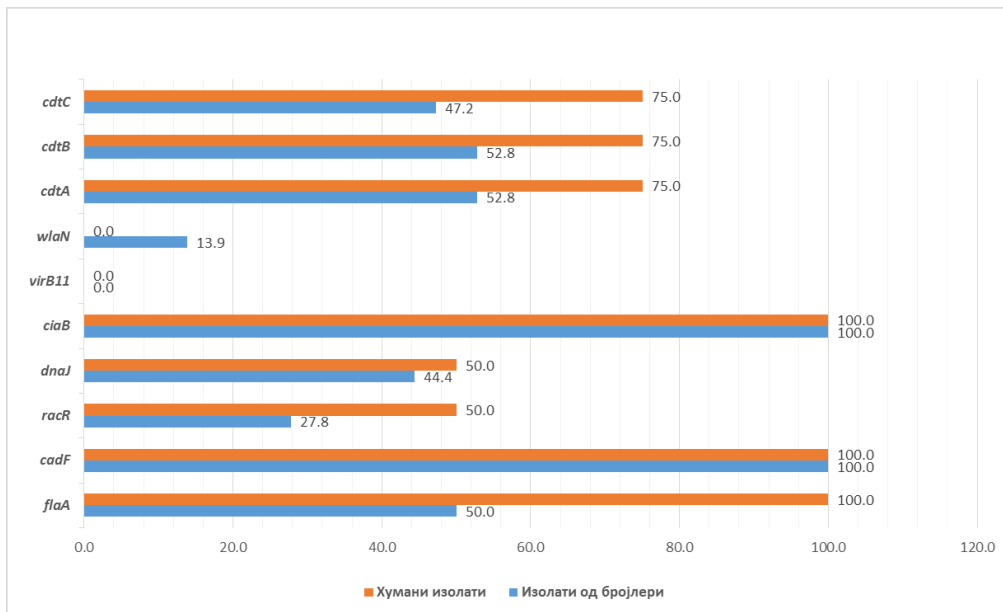
Табела 32. Детекција на гените на антиминобна резистенција кај хумани изолати

Вид	Број на изолати	<i>CmeB</i>	<i>Bla<sub>oxa-61</sub></i>	<i>tet(O)</i>	<i>aph-3-I</i>	<i>aadE</i>
<i>C. jejuni</i>	8	0 (0%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>C. coli</i>	2	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

При анализата на хуманите изолати на *C. jejuni* со PCR методата за детекција на гените на вируленција забележливо беше нивната повисока застапеност во однос на претходно испитаните изолати од ова истражување. Ова посебно се однесуваше на гените *flaA*, *racR*, *dnaJ*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*.

Во случајот со генот *flaA* можевме да евидентираме дека истиот беше потврден кај сите изолати на *C. jejuni* со потекло од луѓе во споредба со изолатите од бројлери (100% наспроти 50%). Исто така забележлива беше повисоката застапеност на гените *cdtA*, *cdtB* и *cdtC* кои ги кодираат протеините за формирање на холотоксинот CdtABC.

За разлика од изолатите кои потекнуваа од бројлери кај хуманите изолати во 6 од нив (75%) беше потврдено присуството на сите три гени.



Графикон 1. Процентуална застапеност на гени на вируленција кај изолатите на *C. jejuni*

Сумирањето на резултатите за преваленцата на гените на вируленција даде 4 профили на вируленција кај хуманите изолати на *C. jejuni*. Најзастапени беа профилот со бр. 1 (кој вклучуваше 8 гени на вируленција) и профилот со бр. 2 (кој вклучуваше 6 гени на вируленција). Овие два профили на вируленција покажаа застапеност од по 37,5%.

Табела 33. Профили на вируленција (virulence patterns) кај хумани изолати на *C. jejuni*

No.	Детектирани патотипови – профили на вируленција	N	%
1.	<i>flaA cadF racR dnaJ ciaB cdtA cdtB cdtC</i>	3	37,5
2.	<i>flaA cadF ciaB cdtA cdtB cdtC</i>	3	37,5
3.	<i>flaA cadF racR dnaJ ciaB</i>	1	12,5
4.	<i>flaA cadF ciaB</i>	1	12,5

## 8. МЕРКИ И ИНТЕРВЕНЦИИ ЗА НАМАЛУВАЊЕ НА ЗАСТАПЕНОСТА НА КАМПИЛОБАКТЕРИИТЕ

На основа на наодите на ова истражување може да се заклучи дека е присутна колонизацијата на живината со кампилобактерии и дека пилешкото месо претставува причина за појава на алиментарни гастроинтестинални заболувања кај луѓето. Затоа, во интерес на јавното здравје е да се применат сите расположливи стратегии за намалување на процентот на колонизирани единки на фармата и контаминирани трупови на кланица.

Стратегијата за намалување на застапеноста на *Campylobacter* spp. опфаќа комплексен пристап на проблемот низ целиот ланец на производство на пилешко месо. Факторите на ризик за колонизација на бројлерите и контаминација на труповите се многубројни, а интервенциите во производството за намалување на влијанието на овие фактори се различни (EFSA, 2020).

1. Интервенции за намалување на присуството на *Campylobacter* spp. во примарното производство
  - Стриктна примена на биосигурносните мерки на фармите (поставување на дезинфекциони бариери, ограничување на бројот на посетители, контрола на инсекти и други штетници). Овде се препорачува користење на посебна опрема за секој објект на фармата и воведување на просторија пред влезот во објектот каде би се вршела промена на обувки и униформа на вработените.
  - Контрола на водата за пиење која мора да биде константно контролирана посебно ако се работи за бунарска вода. Една од предложените мерки е и користење на поилки кај кои не постои можност за насобирање на водата во подолг период.
  - Намалување на возраста на бројлерите при колење, препораката е да се завршува циклусот на 33-35 дена старост на бројлерите бидејќи е докажано дека со одложување на рокот за десет дена нивото на колонизација може да се зголеми за двапати.
  - Да не се врши проретчување на јатото - ова е многу важен фактор поради присуството на работници во јатото, зголемената манипулација со живината и одложувањето на целосната дезинфекција на објектот. По целосното празнење на објектот и завршување на дезинфекцијата не се препорачува долго мирување на објектот (не подолго од десет дена) поради можниот ризик од контаминација на истиот.

- Примена на бактериоцини во храната кои можат да допринесат до намалување на застапеноста на кампилобактериите во цревата на бројлерите.
  - Додавање на хемиски адитиви во храната, и тука се мисли на органски киселини и некои биолошки агенси кои можат да се додаваат во храната со цел намалување на бројот на кампилобактерии во цревата на бројлерите.
  - Вакцинацијата за овој микророгананизам е во фаза на експериментални истражувања и затоа сеуште не може да се смета на оваа интервенција во пракса. Секако дека ефикасна вакцина во голем дел би влијаела на намалувањето на колонизацијата на бројлерите, а со тоа и на застапеноста на кампилобактериите во пилешкото месо на пазарот.
2. Интервенции за намалување на присуството на *Campylobacter* spp. при транспортот и при колењето
- Ускратување на вода и храна пред и во текот на транспортот на бројлерите до кланицата со цел намалување на волуменот на цревата и количината на фецесот кој се излучува во текот на транспортот,
  - Чистење и дезинфекција на транспортните кафези (кутии).
3. Интервенции за намалување на застапеноста на *Campylobacter* spp. при колењето и обработката на труповите
- Превенција на контаминација со содржината на цревата,
  - Воведување на распоред на колење, оваа интервенција предвидува колење на позитивните јата по колењето на негативните јата и понатамошна обработка на труповите од позитивните јата со одреден третман за деконтаминација,
  - Деконтаминација со примена на физички фактори. Физички фактори кои може да се користат се примена на температура (замрзнување или термички третман) или јонизирачко зрачење.

Исто така, неопходно е да се работи на зголемување на свеста кај крајните потрошувачи на пилешкото месо (ресторани, домаќинства) за потребата од правилно ракување со храната, акцентирајќи ја вкрстената контаминација помеѓу различни видови на храна.

Треба да се потенцира дека со примена на правилни хигиенски мерки во кујната и со нејзино правилно чување и складирање контаминацијата на месото се намалува или се отстранува, додека од друга страна пак се спречува вкрстената контаминација на другата храна.

Сите овие мерки во помал или поголем дел го намалуваат присуството на *Campylobacter* spp. во пилешкото месо и можноста за појава на кампилобактериозата кај луѓето. Комбинацијата од неколку од набројаните интервенции може да претставува ефикасна стратегија за борба со овој патоген микроорганизам.

## 9. ЗАКЛУЧОЦИ

1. Во земените примероци од трите фази на производство на пилешко месо е детектирано присуство на четири видови термотолерантни кампилобактерии (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* и *C. upsaliensis*).
2. Од 439 земени примероци при испитувањето (клоакални брисеви, цекуми и брисеви од трупови), во 267 од нив е детектирано присуство на термотолерантни кампилобактерии (преваленца од 60,82%).
3. Најголема преваленца на *Campylobacter* spp. е утврдена во фармата за бројлери со 73,4%, потоа во клиницата со 61,4 и најмала преваленца е утврдена во фазата пред продажба со 37,7%.
4. Најчесто детектиран вид во сите фази е *C. jejuni* со застапеност од 39,2%. Втор вид по застапеност е *C. coli* со 15,2%. Трет вид по застапеност е *C. lari* со 3,2% и четврт е *C. upsaliensis* со 2,1%.
5. Сумирањето на добиените резултати потврди дека највисока преваленца на *Campylobacter* spp. постои во потоплиот период од годината. Највисоката преваленца на кампилобактерии во испитаните примероци беше утврдена во Август (75,3%), потоа во Јуни (67,1%), Декември (47,9%) и Март (47,8%).
6. Применетата PCR метода за детекција и конфирмација на кампилобактериите имаше огромна применливост кај сите изолати на *Campylobacter* spp. Со помош на оваа метода сите испитани изолати на *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* и *C. upsaliensis* беа точно детектирани и потврдени во 100% од направените анализи.
7. PCR методата за детекција на гените на антиминокробна резистенција (*CmeB*, *Bla<sub>OXA-61</sub>*, *Tet(O)*, *aph-3-1*, *aadE*) беше искористена за тестирање на изолатите на *C. jejuni* и *C. coli*. По завршените испитувања беше потврдено дека кај изолатите на

*C. jejuni* најзастапен беше генот *Bla<sub>OXA-61</sub>* (25%) додека кај изолатите на *C. coli* во 94,3% од примероците беше присутен генот *CmeB*.

8. Со апликацијата на PCR методата за детекција на гените на вируленција (вкупно 10 гени) кај изолатите на *C. jejuni* беше потврдено 100% застапеност на два гени (*ciaB* и *cadF*). Генот *flaA* беше застапен во 50% од изолатите на *C. jejuni*. Гените кои го кодираат холотоксинот *cdtABC* (*cdtA*, *cdtB* и *cdtC*) беа детектирани во 30,6% од изолатите.
9. Сите три PCR методи се покажаа како соодветни за работа и со хумани изолати на *C. jejuni* и на *C. coli*. PCR методата за детекција и конфирмација на кампилобактериите покажа 100% точност, исто како и за изолатите од бројлери. При анализата на хуманите изолати на *C. jejuni* од гените на антиминокробна резистенција најзастапен беше генот *Bla<sub>OXA-61</sub>* (22,2%), додека кај изолатите на *C. coli* тоа беше генот *CmeB* (100%). При детекцијата на гените на вируленција во хуманите изолати најзастапени беа гените *flaA*, *ciaB* и *cadF* (100%).
10. Добиените резултати ја потврдија потребата за зголемување на распонот на интервенции во производството на свежо пилешко месо во примарното производство, но и во процесот на транспорт, колење, складирање, испорака и ракување при приготвувањето. Исто така, се наметнува и предизвикот за повнимателно користење на антибиотиците во ветеринарната медицина поради постоечкото високо присуство на гените носители на антиминокробната резистенција кај испитаните кампилобактерии.

## 10. ЛИТЕРАТУРА

Aarestrup, F.M., Engberg, J. (2001) Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet Res.*32(3-4):311-21.

Abu-Madi, M., Behnke, J. M., Sharma, A., Bearden, R., & Al-Banna, N. (2016). Prevalence of Virulence/Stress Genes in *Campylobacter jejuni* from Chicken Meat Sold in Qatari Retail Outlets. *PloS one*, 11(6), e0156938.

Akhtar, S., (1988). Antimicrobial sensitivity and plasmid-mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Bangladesh. *Chemotherapy* 34, 326–331

Alfredson, D.A. & Korolik, V. (2007) Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, *FEMS Microbiology Letters*, vol.277, no. 2, pp. 123-132.

Altekruse, S.F. and D.L. Swerdlow. (2002). *Campylobacter jejuni* and related organisms, pp. 103-112. In D.O. Cliver and H.P. Riemann, eds. *Foodborne Disease*. 2nd ed. Academic press, London

Amato-Gauci, A. and Ammon, A. (2007). The first European communicable disease epidemiological report. European Center of Disease Prevention and Control. Stockholm

Andrzejewska, M., Szczepańska, B., Śpica, D., Klawe, J.J. (2015). Trends in the occurrence and characteristics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry meat in Northern Poland, *Food Control*, Volume 51, Pages 190-194,

Andrzejewska, M., Szczepańska, B., Śpica, D., & Klawe, J. J. (2019). Prevalence, Virulence, and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* spp. in Raw Milk, Beef, and Pork Meat in Northern Poland. *Foods* (Basel, Switzerland), 8(9), 420.

Ang, J.Y., Nachman, S. (2003). *Campylobacter* Infections. [emedicine.medscape.com](http://emedicine.medscape.com)

Ashgar, S. S., Oldfield, N. J., Wooldridge, K. G., Jones, M. A., Irving, G. J., Turner, D. P., & Ala'Aldeen, D. A. (2007). CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *Journal of bacteriology*, 189(5), 1856–1865.

Atabay, H.I. and Corry, J.E. (1998). The isolation and prevalence of campylobacters from dairy cattle using a variety of methods. *J Appl Microbiol*, 84:733–740.

Austen, J. G., Burton, G. C. and Blendin, D. C. (1980). Detection of plasmids in related group of the *Campylobacter*. *FEMS Microbiol Lett* 8:201-204.

Bacon, D. J., Alm, R. A., Burr, D. H., Hu, L., Kopecko, D. J., Ewing, C. P., Trust, T. J., & Guerry, P. (2000). Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infection and immunity*, 68(8), 4384–4390.

Bailey, J., Fedorka-Cray, P., Richardson, L., Cox, N. and Cox, J. (2008). Detection of *Campylobacter* from broiler carcass rinse samples utilizing the Tecra Visual Immunoassay (VIA). *J. of Rapid Methods and Automation in Microbiol* 16:374–380.

Bang, D. D., A. Wedderkopp, K. Pedersen, and M. Madsen. (2002). Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (hip O) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. *Mol. Cell. Probes* 16:359-369

Bang, D.D., Nielsen, E.M., Scheutz, F., Pedersen, K., Handberg, K., Madsen, M. (2003) PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *J Appl Microbiol*. 94(6):1003-14.

Bardoň, J., Pudová, V., Koláčková, I., Karpíšková, R., Röderová, M., Kolář, M. (2017). Virulence and antibiotic resistance genes in *Campylobacter* spp. in the Czech Republic. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 66, č. 2, s. 59–66

Berndtson, E., Emanuelsson, U., Engvall, A. & Danielsson-Tham, M-L. (1996a). A one-year epidemiological study of *Campylobacter* in 18 Swedish chicken farms. *Prev Vet Med* 26:167-185.

Biswas, D., Fernando, U.M., Reiman, C.D., Willson, P.J., Townsend, H.G., Potter, A.A., Allan, B.J. (2007). Correlation between in vitro secretion of virulence-associated proteins of *Campylobacter jejuni* and colonization of chickens. *Curr Microbiol*. 54(3):207-12.

Blaser, M. J. (2000). *Campylobacter jejuni* and Related Species, p. 2276-2285. In G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin (eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, vol. 2, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia, PA

Blaser, M. J., & Engberg, J. (2008). Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections. In I. Nachamkin, C. M. Szymanski & M. J. Blaser (Eds.), *Campylobacter*, 3rd edition (pp. 99-121). Washington, DC: ASM Press.

Blaser, M.J. (1990). *Campylobacter* species. In: *Principles and practice of infectious diseases*. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, editors. 3rd ed. New York Churchill Livingstone, 194:1649-1658.

Boes, J. Nersting, L., Nielsen E.M., Kranker, S., Enøe, C., Wachmann, H.J. and Baggesen D.L. (2005). Prevalence and diversity of *Campylobacter jejuni* in pig herds on farms with and without cattle or poultry. *J Food Prot* 68:722-727.

Bolton, D.J., (2015) *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology* 48:99-108

Bouwman, L.I., Niewold, P., van Putten, J.P. (2013). Basolateral invasion and trafficking of *Campylobacter jejuni* in polarized epithelial cells. *PLoS One*. 8(1):e547-59.

Boxall, N. (2005). The Epidemiology of *Campylobacter jejuni* in Commercial Broiler Flocks in New Zealand. PhD. Thesis, Massey University, Palmerston North, New Zealand.

Bradbury, W. C., A. D. Pearson, M. A. Marko, R. V. Congi, and J. L. Penner. (1984) Investigation of a *Campylobacter jejuni* outbreak by serotyping and chromosomal restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* Vol. 19:342

Brás, A. M., Chatterjee, S., Wren, B. W., Newell, D. G., & Ketley, J. M. (1999). A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. *Journal of bacteriology*, 181(10), 3298–3302.

Brás, A. M., Chatterjee, S., Wren, B. W., Newell, D. G., & Ketley, J. M. (1999). A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. *Journal of bacteriology*, 181(10), 3298–3302.

Brieseman, M. A. (1990). A further study of the epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *New Zealand Med Journal*, 103:207-209.

Butzler, J.P. (2000). *Campylobacteriosis* in humans (A historical overview). In: WHO, Department of Communicable Disease Surveillance and Response. The Increasing Incidence of Human *Campylobacteriosis*. Report and Proceedings of a WHO Consultation of Experts, Copenhagen, Denmark, 2000.

Buzby, J.C., Allos, B.M. and Roberts, T. (1997) The economic burden of *Campylobacter*-associated Guillain-Barre syndrome. *J Infect. Dis* 176 Suppl 2:192-197.

Cabrita, J., J. Rodrigues, F. Bragança, C. Morgado, I. Pires, and A. P. Gonçalves. (1992). Prevalence, biotypes, plasmid profile and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from wild and domestic animals from Northeast Portugal. *J Appl Bacteriol* 73:279–285.

Cantero, G., Correa-Fiz, F., Ronco, T., Strube, M., Cerda-Cuellar, M., and Pedersen, K. (2017). Characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* broiler isolates by whole-genome sequencing. *Foodborne Pathog. Dis.* 15, 145–152.

Cappelier, J.M., Magras, C., Jouve, J.L., Federighi, M. (1999) Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* cells in two animal models. *J Food Microbiol* 16:375-383

Cardinale, E., Perrier Gros-Claude, J.D., Tall, F., Cissé, M., Guèye, E.F., Salvat, G. (2003) Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in Retail Chicken Carcasses in Senegal. *Revue Élev. Méd vét Pays trop* 56 (1-2):13-16.

Carvalho, A.C., Ruiz-Palacios, G.M., Ramos-Cervantes, P., Cervantes, L., Jing, X., Picckering, L.K. (2001) Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J Clin Microbiol* 39:1353-1359.

Center for disease control (2010) National Antimicrobial Resistance Monitoring System: enteric bacteria. Human isolates final report, 2008. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services,

Center for Disease Control and Prevention (2006). FoodNet Surveillance Report 2004.

Center for Disease Control and Prevention (2010). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food - 10 States, 2009. *MMWR* 59:418-422.

Chandel, A.K., Rao, L.V., Narasu, M.L., Singh, O.V., (2008). The realm of penicillin G acylase in  $\beta$ -lactam antibiotics. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 199–207.

Chaveerach P, ter Huurne AAHM, Lipman LJA, van Knapen F (2003) Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. *Appl Environ Microbiol* 69:711–714

Chen, Y., Mukherjee, S., Hoffmann, M., Kotewicz, M. L., Young, S., Abbott, J., Luo, Y., Davidson, M. K., Allard, M., McDermott, P., & Zhao, S. (2013). Whole-genome sequencing of gentamicin-resistant *Campylobacter coli* isolated from U.S. retail meats reveals novel plasmid-mediated aminoglycoside resistance genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(11), 5398–5405.

Christensen, J.E., Pacheco, S.A., Konkel, M.E.. (2009) Identification of a *Campylobacter jejuni*-secreted protein required for maximal invasion of host cells. *Mol Microbiol* 73:650-62

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006) Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. CLSI document M45-A.. CLSI, Wayne, PA, USA

Clinical and Laboratory Standards Institute. Informational Supplement M100-S15. 2005. CLSI, Wayne, PA, USA

Cloak, O. M., and P. M. Fratamico. (2002). A multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from a swine processing facility and characterization of isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic resistance profiles. *J. Food Prot.* 65:266-273

CLSI, 2014. Clinical and Laboratory Standard Institute. <<http://clsi.org/>>

Cockerill III, F.R. (1999). Genetic methods for assessing antimicrobial resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 43:199-212.

Coker, A. O., R. D. Isokpehi, B. N. Thomas, K. O. Amisu and C. L. Obi. (2002). Human *Campylobacteriosis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases.* 8:237-243.

Cousins, M., Sargeant, J.M., Fisman, D., Greer, A.L. (2019) Modelling the transmission dynamics of *Campylobacter* in Ontario, Canada, assuming house flies, *Musca domestica*, are a mechanical vector of disease transmission. *R. Soc. open sci.* 6:181394

Crushell, E., Sinead, H., Sharif, F. and Bourke, B. (2004). Enteric *Campylobacter*: Purging its secrets? *Review Pediatr Res* 55, No.1.

Dasti, J.I., Gross, U., Pohl, S., Lugert, R., Weig, M., Schmidt-Ott, R., (2007). Role of the plasmid encoded tet(O) gene in tetracycline-resistant clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Med. Microbiol.* 56, 833–837

Datta, S., Niwa, H., Itoh, K. (2003). Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J Med Microbiol.*52(Pt 4):345-348.

Dekeyser, P., Goussin-Detrain, M., Butzler, J.P. and Sternon, J. (1972) Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool cultures. *J of Infect Dis* 125:390-392.

Denis, M., C. Soumet, K. Rivoal, G. Ermel, D. Blivet, G. Salvat, and P. Colin. (1999). Development of a PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:406–410

Devi, A., Mahony, T.J., Wilkinson, J.M., Vanniasinkam, T. (2019). Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* from New South Wales, Australia. *J Glob Antimicrob Resist.* 16:76-80.

Di Giannatale, E., Prencipe, V., Colangeli, P., Alessiani, A., Barco, L., Staffolani, M., Tagliabue, S., Grattarola, C., Cerrone, A., Costa, A., Pisanu, M., Santucci, U., Iannitto, G. and Migliorati, G. (2010). Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* in broiler flocks and broiler carcasses in Italy. *Veterinaria Italiana* 46(4):415-423.

Dingle, K. E., Van Den Braak, N., Colles, F. M., Price, L. J., Woodward, D. L., Rodgers, F. G., et al. (2001). Sequence typing confirms the *Campylobacter jejuni* strains associated with Gullian-Barre and Miller-Fisher syndromes are of diverse genetic lineage, serotype, and flagella type. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3346-2249

Donnison, A. (2003). Isolation of Thermotolerant *Campylobacter* – Review and Methods for New Zealand Laboratories.

Doyle, M.P. and Roman, D.J. (1981) Growth and survival of *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* as a function of temperature and pH. *Journal of Food Protection* 44: 596 –601

Du, Y., Wang, C., Ye, Y., Liu, Y., Wang, A., Li, Y., Zhou, X., Pan, H., Zhang, J., & Xu, X. (2018). Molecular Identification of Multidrug-Resistant *Campylobacter* Species From Diarrheal Patients and Poultry Meat in Shanghai, China. *Frontiers in microbiology*, 9, 1642.

EFSA (European Food Safety Authority), (2008) Scientific Opinion of the panel on biological hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *EFSA Journal* ; 756:1-87.

EFSA (European Food Safety Authority), (2009). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *EFSA Journal* 2009, 223

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2006). The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *EFSA Journal* 2006; 94, 3-288

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2010). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008, *EFSA Journal*; 2010 8(1):1496.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011; *EFSA Journal* 2013;11(4):3129, 250 pp.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017;15(12):5077, 228 pp.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal 2018;16(12):5500, 262 pp.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2019). The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA Journal 17(12):5926, 276 pp.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal 2021;19(2):6406, 286 pp.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards) (2020). Update and review of control options for *Campylobacter* in broilers at primary production. EFSA Journal 2020;18(4):6090, 89 pp.

El-Jakee, J., Nagwa, S., Ata, Hakim, A.S., Syame, S.M. and Omara, S.T. (2015). Prevalence of Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Patterns of *Campylobacter* Species Isolated from Chicken in Egypt. Asian Journal of Poultry Science 9 (4): 250-261

Engberg, J. (2006) Contributions to the epidemiology of *Campylobacter* infections. Danish Medical Bulletin 2006; 53:361-389.

Engberg, J., Neimann, J., Nielsen, E.M., Aerestrup, F.M. & Fussing, V. (2004) Quinolone-resistant *Campylobacter* infections: risk factors and clinical consequences, Emerging Infectious Diseases, vol. 10, no. 6, pp.1056-1063.

Englen, M. D., S. R. Ladely, and P. J. Fedorka-Cray. (2003). Isolation of *Campylobacter* and identification by PCR. Methods Mol. Biol. 216:109-121.

Englen, M.D., S.R. Ladely, and P.J. Fedorka-Cray. (2003). Isolation of *Campylobacter* and identification by PCR. Methods Mol. Biol. 216:109-121.

EUCAST, (2014). European Committee on antimicrobial susceptibility testing.

Feodoroff, B., Ellström, P., Hyytiäinen, H., Sarna, S., Hänninen, M. L., & Rautelin, H. (2010). *Campylobacter jejuni* isolates in Finnish patients differ according to the origin of infection. Gut pathogens, 2(1), 22.

Fernandez, H., Fagundes Neto, U. and Ogatha, S. (1997) Acute diarrhea associated with *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* in Sao Paulo, Brazil. Pediatric Infec Disease J 16:1098-1099.

Flanagan, R. C., Neal-McKinney, J. M., Dhillon, A. S., Miller, W. G., & Konkel, M. E. (2009). Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. *Infection and immunity*, 77(6), 2399–2407.

Franco, D.A., (1988). *Campylobacter* species: Considerations for controlling a foodborne pathogen. *J Food Prot* 51:145–153.

Friedman, C.R., Neimann, J., Wegener, H.C. and Tauxe, R.V. (2000). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*. 2nd ed. Washington DC: ASM press; p.121-138.

Friesema, I.H.M., Havelaar, A.H., Westra, P.P., Wagenaar, J.A. and van Pelt, W. (2012) Poultry Culling and *Campylobacteriosis* Reduction among Humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 18(3):466–468.

Garrity, G.M., Bell, J.A. and Lilburn, T.: Class V. Epsilonproteobacteria class. nov. In: D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley and G. M. Garrity (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria), Springer, New York, 2005, p. 1145.

Ge, B., McDermott, P. F., White, D. G., & Meng, J. (2005). Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3347–3354.

Ghorbanalizadgan, M., Bakhshi, B., Kazemnejad Lili, A., Najjar-Peerayeh, S., & Nikmanesh, B. (2014). A molecular survey of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* virulence and diversity. *Iranian biomedical journal*, 18(3), 158–164.

Gibreel, A. & Taylor, D.E. (2006) Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*", *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 58, no. 2, pp. 243-255.

Gibreel, A., Kos, V.N., Keelan, M., Trieber, C.A., Levesque, S., Michaud, S., Taylor, D.E. (2005) Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: molecular mechanism and stability of the resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(7):2753-9.

Gibreel, A., Tracz, D.M., Nonaka, L., Ngo, T.M., Connell, S.R., Taylor, D.E. (2004) Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to tet(O)-mediated tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(9):3442-50.

Gorkiewicz, G., Feierl, G., Zechner, R., Zechner and E.L. (2002). Transmission of *Campylobacter hyointestinalis* from a Pig to a Human. *J Of Clin Microbiol* 40(7):2601-2605.

Griggs, D. J., Peake, L., Johnson, M. M., Ghori, S., Mott, A., & Piddock, L. J. (2009). Beta-lactamase-mediated beta-lactam resistance in *Campylobacter* species: prevalence of Cj0299 (bla OXA-61) and evidence for a novel beta-Lactamase in *C. jejuni*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(8), 3357–3364.

Griggs, D.J., Peake, L., Johnson, M.M., Ghori, S., Mott, A., Piddock, L.J., (2009). Beta-lactamase-mediated beta-lactam resistance in *Campylobacter* species: prevalence of Cj0299 (bla OXA-61) and evidence for a novel beta-lactamase in *C. jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3357–3364

Hadden, R. D. M. and N. A. Gregson. (2001). Guillain-Barre syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. *J. Appl. Microbiol.* 90:145S-154S

Hald, B. and Madsen, M. (1997). Healthy Puppies and Kittens as Carriers of *Campylobacter* spp., with Special Reference to *Campylobacter upsaliensis*. *J of Clin microbiol* 35(12):3351–3352.

Hamer, R., Chen, P.Y., Armitage, J.P. et al. (2010) Deciphering chemotaxis pathways using cross species comparisons. *BMC Syst Biol* 4, 3.

Han, F., Lestari, I.S., Pu, S. and Ge, B. (2009). Prevalence and Antimicrobial Resistance Among *Campylobacter* spp. in Louisiana Retail Chicken After the Enrofloxacin Ban. *Foodborne Pathogens and Disease* 6:2.

Health Protection Agency, UK (2003). National Standard Method: Identification of *campylobacter* species. Issue no: 1 Issue date: 01.12.2003 Issued by: Standards Unit, Evaluations and Standards Laboratory Page 1 of 10, Reference no: BSOP ID 23/1

Hébert, G. A., D. G. Hollis, R. E. Weaver, M. A. Lambert, M. J. Blaser, and C. W. Moss. (1982) 30 years of *campylobacters*: biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 15:1065-1073.

Hiatt, K. L., N. A. Cox, and N. J. Stern. (2002). Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter* spp. in poultry hatchery samples. *Avian Dis.*46:219-223.

Hofreuter, D., Tsai, J., Watson, R. O., Novik, V., Altman, B., Benitez, M., et al. (2006). Unique features of a highly pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *Infect. Immun.* 74, 4694–4707.

Houng, H. S., O. Sethabutr, W. Nirdnoy, D. E. Katz, and L. W. Pang. (2001). Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and

differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 40:11-19

Hu, L. and D.J. Kopecko. (2000). Interactions of *Campylobacter* with eukaryotic cells: gut luminal colonization and mucosal invasion mechanisms, pp. 191-215. In I. Nachamkin and M. J. Blaser, eds. *Campylobacter*. 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C

Hubbert, W.T., Hagstad, H.V., Spangler, E., Hinton, M.H. and Hughes, K.L. (1996) *Food safety and quality assurance: Food of animal origin* (2nd edn). Iowa State University Press  
Humphrey T. (2004) Control of *Campylobacter* spp. in the food chain: a far from simple task. *Culture* 25:6-9

Humphrey, T. J., Jørgensen, F., Frost, J. A., Wadda, H., Domingue, G., Elviss, N. C., Griggs, D. J., & Piddock, L. J. (2005). Prevalence and subtypes of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. in commercial poultry flocks before, during, and after treatment with fluoroquinolones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(2), 690–698.

Humphrey, T.J., Henley, A. and Lanning, D.G. (1993). The colonization of broiler chickens with *Campylobacter jejuni*; some epidemiologic investigations. *Epidemiol Infect* 110:601-607.

Iain, A. G., Sarah J. O'Brien, J.S., Frost, J.A., Tam, C., Tompkins, D., Neal, K.R., Syed, Q., Farthing, M.J.G. (2006). Investigating vomiting and/or bloody diarrhoea in *Campylobacter jejuni* infection and The *Campylobacter* Sentinel Surveillance Scheme Collaborators *J of Med Microbiol* 55:741-746

Iovine, N.M., (2013). Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence* 4, 230–240.

ISO/CD 10272-1 and 10272-2 (2006) *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. part 1: Detection method; Part 2: Colony count technique.* International Organisation for Standardisation (ISO), ISO Central Secretariat, 1 rue de Varembé, Case Postale 56, CH - 1211, Geneva 20, Switzerland.

Issa, G., Basaran Kahraman, B., Adiguzel, M.C., Yilmaz Eker, F., Akkaya, E., Bayrakal, G.M., Koluman, A., Kahraman, T. (2018). Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* isolates from raw chicken Meats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 24 (5): 701-707.

Jolley, K.A., M.S. Chan and M.C. Maiden. (2004). mlstdbNet - distributed multilocus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 5:86

Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D. (2003) Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds.): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed. Washington: American Society for Microbiology, 2003:1109–1127.

Jorgensen, F., Ellis-Iversen, J., Rushton, S., Bull, S. A., Harris, S. A., Bryan, S. J., Gonzalez, A., & Humphrey, T. J. (2011). Influence of season and geography on *Campylobacter jejuni* and *C. coli* subtypes in housed broiler flocks reared in Great Britain. Applied and environmental microbiology, 77(11), 3741–3748.

Jorgensen, J.H. and Turnidge, J.D. (2007) Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A. (eds.). Manual of Clinical Microbiology, 9th ed.. ASM Press, Washington, DC. p.1152-1172

Juntunen, P., Heiska, H., Hänninen, M., (2012). *Campylobacter coli* Isolates from Finnish Farrowing Farms Using Aminopenicillins: High Prevalence of bla OXA-61 and  $\beta$ -Lactamase Production, But Low MIC Values. Foodborne Pathog. Dis. 9, 902–906

Juntunen, P., Heiska, H., Olkkola, S., Myllyniemi, A., Hänninen, M., (2010). Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* selected by tylosin treatment at a pig farm. Vet. Microbiol. 146, 90–97.

Juntunen, P., Heiska, H., Olkkola, S., Myllyniemi, A.L., Hänninen, M.L. (2010) Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* selected by tylosin treatment at a pig farm. Vet Microbiol. 146(1-2):90-7.

Kaakoush, N.O., Mitchell, H.M., Man, S.M. (2015) Chapter 67 - *Campylobacter*, Editor(s): Yi-Wei Tang, Max Sussman, Dongyou Liu, Ian Poxton, Joseph Schwartzman, Molecular Medical Microbiology (Second Edition), Academic Press. Pages 1187-1236, ISBN 9780123971692.

Kapperud, G. (2003). Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway. Am J Epidemiol. 158(3):234–42.

Keramas, G., Bang, D.D., Lund, M., Madsen, M., Bunkenborg, H., Telleman, P. and Christensen, C.B.V. (2004). Use of Culture, PCR Analysis, and DNA Microarrays for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Chicken Feces. J. of clin microbiol, Vol. 42(9):3985–3991.

Ketley, J.M. (1997) Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. Microbiology (Reading). 143 (Pt 1):5-21.

Klančnik, A., Guzej, B., Jamnik, P., Vuckovic, D., Abram, M., Mozina, S.S. (2009) Stress response and pathogenic potential of *Campylobacter jejuni* cells exposed to starvation. *Res Microbiol* 160:345-352

Klena, J. D., C. T. Parker, K. Knibb, J. C. Ibbitt, P. M. Devane, S. T. Horn, W. G. Miller, and M. E. Konkel. (2004). Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *J. Clin. Microbiol.* 42:5549-5557

Konkel M. E., Garvis S. G., Tipton S. L., Anderson D. E. Jr., Cieplak W. Jr. (1997). Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* 24, 953–963

Konkel M.E., Klena J.D., Rivera-Amill V., Monteville M.R., Biswas, D., Raphael B., et al. (2004) Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol* 186:3296-303.

Konkel, M. E., Gray, S. A., Kim, B. J., Garvis, S. G., & Yoon, J. (1999). Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. *Journal of clinical microbiology*, 37(3), 510–517.

Koolman, L., Whyte, P., Burgess, C., Bolton, D. (2015). Distribution of virulence-associated genes in a selection of *Campylobacter* isolates. *Foodborne Pathog Dis.* 12(5):424-32.

Kordinas, V., Nicolaou, C., Ioannidis, A., Papavasileiou, E., John Legakis, N., Chatzipanagiotou, S. (2005). Prevalence of four virulence genes in *Campylobacter jejuni* determined by PCR and sequence analysis. *Mol Diagn.* (4):211-5.

Kovács, J.K. (2014) Investigation of virulence-associated factors in the pathogenesis of *Campylobacter jejuni*, and the anti-*Campylobacter* mode of action of clove essential oil. PhD Thesis.

Kovats, R.S., Edwards, S.J., Charron, D., Cowden, J., D'Souza, R.M., Ebi, K.L., Gauci, C., Gerner-Smidt, P., Hajat, S., Hales, S., Hernández Pezzi, G., Kriz, B., Kutsar, K., McKeown, P., Mellou, K., Menne, B., O'Brien, S., van Pelt, W., Schmid, H. (2005). Climate variability and *Campylobacter* infection: an international study. *Int J Biometeorol* 49:207-214

Krutkiewicz, A., Klimuszko, D. (2010). Genotyping and PCR detection of potential virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from different sources in Poland. *Folia Microbiol (Praha).* 55(2):167-75.

Lachance, N., Gaudreau, C., Lamothe, F., & Larivière, L. A. (1991). Role of the beta-lactamase of *Campylobacter jejuni* in resistance to beta-lactam agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(5), 813–818.

Lake, R., A. Hudson, P. Cressey and G. Nortje. (2003). Risk Profile: *Campylobacter jejuni/coli* in poultry (whole and pieces). Client Report FW0109. Christchurch: ESR. (Institute of Environmental Science & Research Limited). A Crown Research Institute, Christchurch, New Zealand.

Lapierre, L., Gatica, M.A., Riquelme, V., Vergara, C., Yañez, J.M., San Martín, B., Sáenz, L., Vidal, M., Martínez, M.C., Araya, P., Flores, R., Duery, O., Vidal, R. (2016). Characterization of Antimicrobial Susceptibility and Its Association with Virulence Genes Related to Adherence, Invasion, and Cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates from Animals, Meat, and Humans. *Microb Drug Resist.* 22(5):432-44.

Laprade, N., Cloutier, M., Lapen, D.R., Topp, E., Wilkes, G., Villemur, R., Khan, I.U. (2016). Detection of virulence, antibiotic resistance and toxin (VAT) genes in *Campylobacter* species using newly developed multiplex PCR assays. *J Microbiol Methods.* 124:41-7.

Levy, A.J. (1946) A gastroenteritis outbreak probably due to a bovine strain of *Vibrio*. *Yale J. of Biol and Med* 18:243.

Lin, J., Michel, L. O., & Zhang, Q. (2002). CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(7), 2124–2131.

Lior, H., D. L. Woodward, J. A. Edgar, L. J. Laroche and P. Gill. (1982). Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol* 15 (5):761-768

Logue, C., Danzeisen, G., Sherwood, J., Thorsness, J., Mercier, B., Axtman, J., (2010). Repeated therapeutic dosing selects macrolide-resistant *Campylobacter* spp. in a turkey facility. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1379–1388.

Logue, C.M., Danzeisen, G.T., Sherwood, J.S., Thorsness, J.L., Mercier, B.M., Axtman, J.E. (2010) Repeated therapeutic dosing selects macrolide-resistant *Campylobacter* spp. in a turkey facility. *J Appl Microbiol.* 109(4):1379-88.

Luo, N., Sahin, O., Lin, J., Michel, L. O., & Zhang, Q. (2003). In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(1), 390–394.

Maiden, M. C. J. (2006). Multi-locus sequence typing of Bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 60, 561-588

Maiden, M. C. J., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, et al. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3140-3145.

Malik-Kale P., Parker C.T., Konkel M.E.. (2008) Culture of *Campylobacter jejuni* with sodium deoxycholate induces virulence gene expression. *J Bacteriol* 190:2286-97.

McDermott, P., Bodeis, S., Aarestrup, F.M., Brown, S., Traczewski, M., Fedorka-Cray, P., et al., (2004). Development of a standardized susceptibility test for *Campylobacter* with quality-control ranges for ciprofloxacin, doxycycline, erythromycin, gentamicin, and meropenem. *Microb. Drug Resist.* 10, 124–131

McDermott, P.F., Bodeis-Jones, S.M., Fritsche, T.R., Jones, R.N., Walker, R.D., (2005). Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.* 43, 6136–6138.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. and Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607-625.

Min T., Vedadi M., Watson D. C., Wasney G. A., Munger C., Cygler M., Matte A., Young N. M. (2009). Specificity of *Campylobacter jejuni* adhesin PEB3 for phosphates and structural differences among its ligand complexes. *Biochemistry* 48, 3057–3067.

Moran, A.P. (1997) Structure and conserved characteristics of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides. *J Infect Dis* 176(Suppl. 2):S115-121.

Moran, A.P. and Upton, M. E. (1987). Factors affecting production of coccoid forms by *Campylobacter jejuni* on solid media during incubation. *J Appl Bacteriol* 62:527-537.

Müller, J., Schulze, F., Müller, W., Hänel, I. (2006). PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Vet Microbiol.* 113(1-2):123-9.

Nachamkin, I. “*Campylobacter jejuni*.” *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*, 2nd ed. Eds. M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville. Washington, D. C.: ASM Press. (2001). p179-192

Nahar, N., Rashid, R.B. (2018). Genotypic Analysis of the Virulence and Antibiotic Resistance Genes in *Campylobacter* species in silico. *J Bioanal Biomed* 10: 13-23.

Newell, D.G. and J.A. Wagenaar (2000). Poultry infections and their control at the farm level, pp. 497-509. In I. Nachamkin and M.J. Blaser (eds.). *Campylobacter*. 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.

Nielsen, E.M., Engberg, J., Fussing, V., Petersen, L., Brogren, C-H. and On, S.L.W.. (2000). Evaluation of Phenotypic and Genotypic Methods for Subtyping *Campylobacter jejuni* Isolates from Humans, Poultry, and Cattle. *J of Clin Microbiol* 3800-3810.

Nielsen, E.M., Engberg, J., Madsen, M. (1997). Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol and Med Microbiol*, 19:47-56.

Nuijten, P. J., van den Berg, A. J., Formentini, I., van der Zeijst, B. A., & Jacobs, A. A. (2000). DNA rearrangements in the flagellin locus of an *flaA* mutant of *Campylobacter jejuni* during colonization of chicken ceca. *Infection and immunity*, 68(12), 7137–7140.

O'Sullivan, N.A., Fallon, R., Carrol, C., Smith, T., Maher, M. (2000). Detection and differentiation of *C. jejuni* and *C. coli* in broiler chickens samples using a PCR/DNA probe membrane based colorimetric detection assay. *Mol Cell Probes* 14:7-16

Obeng, A.S., Rickard, H., Sexton, M., Pang, Y., Peng, H., Barton, M. (2012). Antimicrobial susceptibilities and resistance genes in *Campylobacter* strains isolated from poultry and pigs in Australia. *J Appl Microbiol*. 113(2):294-307.

OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (2004). Ch. 2.10.8. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*.

Olah, P.A., Doetkott, C., Fakhr, M.K., Logue, C.M. (2006). Prevalence of the *Campylobacter* multi-drug efflux pump (CmeABC) in *Campylobacter* spp. Isolated from freshly processed Turkeys. *Food Microbiol*. 23(5):453-60.

On, S.L.W., Atabay, H. I., Corry, J. E. L., Harrington, C. S., and Vandamme, P. (1998) Emended description of *Campylobacter sputorum* and revision of its infrasubspecific (biovar) divisions, including *C. sputorum* bv. *paraureolyticus*, a urease-producing variant from cattle and humans. *Int J Syst Bacteriol* 48:195-206.

Oosterom, J., Notermans, S., Karman, H. and Engels, G.B. (1983) Origin and Prevalence of *Campylobacter jejuni* in poultry processing. *Journal of Food Protection* 46: 339 – 344

Pamuk, S. and Akgun, S. (2009). Detection of thermophilic *Campylobacter* in unpacked broiler carcasses in retail markets of Afyonkarahisar and confirmation of *C. jejuni* isolates using PCR. *J of veter and animal advances* 8(10):2063-2068.

Park, S.F., Richardson, P.T. (1995) Molecular characterization of a *Campylobacter jejuni* lipoprotein with homology to periplasmic siderophore-binding proteins. *J Bacteriol.* 177(9):2259-64.

Parkhill, J., Wren, B.W., Mungall, K., Ketley, J.M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Moule, S., Pallen, M.J., Penn, C.W., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., van Vliet, A.H., Whitehead, S., Barrell, B.G. (2000) The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature.* 403(6770):665-8.

Patton, C. M., T. J. Barrett and G. K. Morris. (1985). Comparison of the Penner and Lior methods for serotyping *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol* 22 (4):558-565

Petersen, L., Nielsen, E.M., Engberg, J, On, S.L.W. and Dietz, H.H. (2001). Comparison of Genotypes and Serotypes of *Campylobacter jejuni* Isolated from Danish Wild Mammals and Birds and from Broiler Flocks and Humans. *Appl and environm microbiol* 67(7):3115–3121.

Pickett, C. L., Pesci, E. C., Cottle, D. L., Russell, G., Erdem, A. N., & Zeytin, H. (1996). Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infection and immunity*, 64(6), 2070–2078.

Pinto-Alphandary, H., Mabilat, C., and Courvalin, P. (1990). Emergence of aminoglycoside resistance genes *aadA* and *aadE* in the genus *Campylobacter*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(6), 1294–1296.

Poly, F., Ewing, C., Goon, S., Hickey, T. E., Rockabrand, D., Majam, G., Lee, L., Phan, J., Savarino, N. J., and Guerry, P. (2007). Heterogeneity of a *Campylobacter jejuni* protein that is secreted through the flagellar filament. *Infection and immunity*, 75(8), 3859–3867.

Poly, F., Guerry, P. (2008) Pathogenesis of *Campylobacter*. *Curr Opin Gastroenterol.* Jan;24(1):27-31.

Portner DC, Leuschner RGK, Murray BS (2007) Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiol* 54:265–270

Pumbwe, L., Randall, L. P., Woodward, M. J., & Piddock, L. J. (2004). Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(2), 341–347.

Qin, S., Wang, Y., Zhang, Q., Chen, X., Shen, Z., Deng, F., Wu, C., & Shen, J. (2012). Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(10), 5332–5339.

Rahimi, P., Tajbakhsh E. (2008). Prevalence of *Campylobacter* species in poultry meat in the Esfahan city, Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 11, No 4, 257–262 .

Ramires, T., de Oliveira, M.G., Kleinubing, N.R., de Fátima Rauber Würfel, S., Mata, M.M., Iglesias, M.A., Lopes, G.V., Dellagostin, O.A., da Silva, W.P. (2020). Genetic diversity, antimicrobial resistance, and virulence genes of thermophilic *Campylobacter* isolated from broiler production chain. *Braz J Microbiol.* 51(4):2021-2032

Reddy, S. and Zishiri, O.T. (2018). Genetic characterisation of virulence genes associated with adherence, invasion and cytotoxicity in *Campylobacter* spp. isolated from commercial chickens and human clinical cases. *Onderstepoort j. vet. res.* [online]. vol.85, n.1, pp.1-9.

Reintjes R, van Treeck U, Oehler M and Petruschke N (1999) Ein Ausbruch von *Campylobacter* - Enteritis in Nordrhein-Westfalen. *Epidemiologisches Bulletin Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health* 43:317-320

Ridsdale, J.A., Atabay, H.I., Corry, J.E.L. (1998) Prevalence of campylobacters and arcobacters in ducks at the abattoir. *J of Appl Microbiol* 85:567-573.

Ripabelli, G., Tamburro, M., Minelli, F., Leone, A., Sammarco, M.L. (2010) Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33(4):355-64.

Rivera-Amill, V., Kim, B.J., Seshu, J., Konkel, M.E. (2001) Secretion of the Virulence-Associated *Campylobacter* Invasion Antigens from *Campylobacter jejuni* Requires a Stimulatory Signal, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 183, Issue 11, Pages 1607–1616.

Robinson, D.A. (1981). Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 282(6276):1584.

Rollinson, D.M. and Colwell, R.R. (1986) Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl and Environ Microbiol* 52:531-538.

Sahin, O., Q. Zhang, and T. Y. Morishita. (2003). Detection of *Campylobacter*, p. 183-193. In M. E. Torrence and R. E. Isaacson (eds.), *Microbial food safety in animal agriculture: current topics*. Iowa State Press, Ames, IA

Sails, A. D., B. Swaminathan and P. I. Fields. (2003). Utility of multilocus sequence typing as an epidemiological tool for investigation of outbreaks of gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 41 (10):4733-4739

Sails, A.D., Bolton, F.J., Fox, A.J., Wareing, D.R.A. and Greenway, D.L.A. (2002). Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Environmental Waters by PCR Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Appl and Environ Microbiol* 68(3):1319-1324.

Salama, S. M., F. J. Bolton and D. Hutchinson. (1990). Application of a new phagotyping scheme to *Campylobacters* isolated during outbreaks. *Epidemiol Infect* 104 (3):405-411

Saleha, A. A. (2002). Isolation and Characterization of *Campylobacter jejuni* from Broiler Chickens in Malaysia. *Intl J of Poultry Science* 1(4): 94-97.

Salihu, M. D., Junaidu, A.U., Magaji, A.A., Abubakar, M.B., Adamu, A.Y and Yahubu, A.S. (2009). Prevalence of campylobacter in poultry meat in Sokoto, Northwestern Nigeria. *J of Pub Health and Epidemiol* 1(2): 41-45.

Samuel, M.C., Vugia, D.J., Shallow, S., Marcus, R., Segler, S., McGivern, T., Kassenborg, H., Reilly, K., Kennedy, M., Angulo, F., Tauxe, R.V.; Emerging Infections Program FoodNet Working Group. (2004). Epidemiology of sporadic *Campylobacter* infection in the United States and declining trend in incidence, FoodNet 1996-1999. *Clin. Infect. Dis.* 38, Suppl 3, S165-174.

Schönberg-Norio, D., Takkinen, J., Hänninen, M.L., Katila, M.L., Kaukoranta, S.S., Mattila, L., et al. (2004). Swimming and *Campylobacter* infections . *Emerg Infect Dis.* 10(8):1474-7.

Schwan, P. (2010) Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in poultry and raw meat in the Can Tho Province, Vietnam. Degree Project. Swedish University of Agricultural Sciences.

Skirrow, M. B. and Benjamin, J. (1980). Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. *J. Clin. Pathol.* 33:1122.

Skirrow, M. B. and M. J. Blaser. "Clinical aspects of *Campylobacter* infection." *Campylobacter*. Eds. I. Nachamkin and M. J. Blaser. Washington, D.C. (2000). p.70-71

Skirrow, M.B. and Blaser, M.J. (1992). Clinical and epidemiological considerations. In: *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends* (I. Nachamkin, M.J. Blaser and L.S. Tompkins, Eds.), pp. 3-8. Am Soc for Microbiol, Washington, DC.

Slader, J., Domingue, G., Jorgensen F., McAlpine, K., Owen, R.J., Bolton, F.J. and Humphrey, T.J. (2002). Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. *Appl and Environ Microbiol* 68:713-719

Song, Y.C., Jin, S., Louie, H., Ng, D., Lau, R., Zhang, Y., Weerasekera, R., Al Rashid, S., Ward, L.A., Der, S.D., Chan, V.L. (2004). FlaC, a protein of *Campylobacter jejuni* TGH9011 (ATCC43431) secreted through the flagellar apparatus, binds epithelial cells and influences cell invasion. *Mol Microbiol.* 53(2):541-53.

Steinhauserová, I., Fojtíková, K., Matiašovic, J. (2001). The occurrence and typing of *Campylobacter coli* strains in pigs. *Folia Veterinaria* 45:3.

Stern, N.J. and J.E. Line. (2000). *Campylobacter* spp., pp. 1040-1056. In B.M. Lund, T.C. Baird-Parker and G.W. Gould, eds. *The Microbiological Safety and Quality of Food Volume II*. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland

Stern, N.J., Clavero, M.R., Bailey, J.S., Cox, N.A. & Robach, M.C. (1995). *Campylobacter* spp. in broilers on the farm and after transport. *Poultry Science* 74:937-941.

Szymanski, C.M., Michael, F.S., Jarrell, H.C., Li, J., Gilbert, M., Larocque, S., et al. (2003) Detection of conserved N-linked glycans and phase-variable lipooligosaccharides and capsules from *Campylobacter* cells by mass spectrometry and high resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 278:24509-20.

Tajada, P., Gomez-Graces, J. L., Alós, J. I., Balas, D., & Cogollos, R. (1996). Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 beta-lactam agents and combinations with beta-lactamase inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(8), 1924–1925.

Tajada, P., Gomez-Graces, J.L., Alos, J.I., Balas, D., Cogollos, R., (1996). Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* to 12 beta-lactam agents and combinations with beta-lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1924–1925.

Takkinen, J., Ammon, A., Robstad, O. and Breuer, T. (2003) European survey on *Campylobacter* surveillance and diagnosis 2001. *Euro Surveill.* 8:207-213.

Talukder, K. A., Aslam, M., Islam, Z., Azmi, I. J., Dutta, D. K., Hossain, S., Nur-E-Kamal, A., Nair, G. B., Cravioto, A., Sack, D. A., & Endtz, H. P. (2008). Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), 1485–1488.

Tang, Y., Sahin, O., Pavlovic, N., LeJeune, J., Carlson, J., Wu, Z., Dai, L. & Zhang, Q. (2017). Rising fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* isolated from feedlot cattle in the United States, *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 494.

Tauxe, R.V. (1992). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: *Campylobacter jejuni: Current Status and Future Trends* (I. Nachamkin, M.J. Blaser and L.S. Tompkins, Eds.), pp. 9-19. Am Soc for Microbiol, Washington, DC.

Thakur, S., Zhao, S., McDermott, P.F., Harbottle, H., Abbott, J., English, L., Gebreyes, W.A., White, D.G. (2010). Antimicrobial resistance, virulence, and genotypic profile comparison of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and retail meats. *Foodborne Pathog Dis.* 7(7):835-44.

Tribble, D.R., Baqar, S., Scott, D.A., Oplinger, M.L., Trespalacios, F., Rollins, D., Walker, R.I., Clements, J.D., Walz, S., Gibbs, P., Burg, E.F., Moran, A.P., Applebee, L., Bourgeois, A.L. (2010). Assessment of the duration of protection in *Campylobacter jejuni* experimental infection in humans. *Infect Immun* 78(4):1750-1759

Ursing, J. B., Lior, H. and Owen, R.J. (1994). Proposal of minimal standards for describing new species of the family *Campylobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:842-845.  
USDA (1998). *Microbiology Laboratory Guidebook* (3rd Ed). USDA/FSIS. Washington, DC.

van Asselt, E.D., Jacobs-Reitsma, W.F., van Brakel, R., van der Voet, H. and van der Fels-Klerx, H.J. (2008) *Campylobacter* Prevalence in the Broiler Supply Chain in the Netherlands. *Poultry Science* 87:2166–2172.

Veron, M., and Chatelain, R. (1973). Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Veron and designation of the neotype strain for the type species *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Veron. *Int J Syst Bacteriol* 23:122-134.

Wang, G., C. G. Clark, T. M. Taylor, C. Pucknell, C. Barton, L. Price, D. L. Woodward, and F. G. Rodgers. (2002). Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.* 40:4744-4747.

Wassenaar, T. M. and D. G. Newell. (2000). Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol* 66 (1):1-9

Wassenaar, T. M., Bleumink-Pluym, N. M. C. & Van der Zeijst, (1991) Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flaB* is required for invasion *EMBO Journal* 10, 2055-2061.

Wheeler, J. G., Sethi, D., Cowden, J. M., Wall, P. G., Rodrigues, L. C., Tompkins, D. S., Judson M. J. and Roderick, P. J. (1999). Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. *BMJ* 318(7190):1046-1050

Wieczorek, K., & Osek, J. (2013). Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *BioMed research international*, 2013, 340605.

Wieczorek, K., Wołkowicz, T., & Osek, J. (2018). Antimicrobial Resistance and Virulence-Associated Traits of *Campylobacter jejuni* Isolated From Poultry Food Chain and Humans With Diarrhea. *Frontiers in microbiology*, 9, 1508.

Wilson I. (2002). *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of raw retail chickens from different producers: a six year survey. *Epidemiol Infect* 129:635-45.

Wise, R., Hart, T., Cars, O., Streulens, M., Helmuth, R., Huovinen, P. & Sprenger, M. (1998) "Antimicrobial resistance is a major threat to public health", *British Medical Journal*, vol. 317, no. 7159, pp. 609-611.

Wysok, B., Wojtacka, J., Hänninen, M. L., & Kivistö, R. (2020). Antimicrobial Resistance and Virulence-Associated Markers in *Campylobacter* Strains From Diarrheic and Non-diarrheic Humans in Poland. *Frontiers in microbiology*, 11, 1799.

Yao, R., Burr, D.H., Doig, P. et al. (1994) Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Molecular Microbiology*. Dec;14(5):883-893.

Yildirim, M., Istanbuluoglu, E. and Ayvali, B. (2005). Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Thermophilic *Campylobacter* Species in Broiler Chickens. *Turk J Vet Anim Sci* 29:655-660.

Young, K.T., Davis, L.M., Dirita, V.J. (2007) *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 5:665-79.

Zhang, T., Luo, Q., Chen, Y. et al. (2016). Molecular epidemiology, virulence determinants and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spreading in retail chicken meat in Central China. *Gut Pathog* 8, 48.

Zhao, S., Tyson, G. H., Chen, Y., Li, C., Mukherjee, S., Young, S., Lam, C., Folster, J. P., Whichard, J. M., & McDermott, P. F. (2015). Whole-Genome Sequencing Analysis Accurately Predicts Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Campylobacter* spp. *Applied and environmental microbiology*, 82(2), 459–466.

Ziprin, R. L., C. R. Young, J. A. Byrd, L. H. Stanker, M. E. Hume, S. A. Gray, B. J. Kim, and M. E. Konkel. (2001). Role of *Campylobacter jejuni* potential virulence genes in cecal colonization. *Avian Dis.* 45:549-557.

Zweifel C, Zychowska M A and Stephan R (2004) Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology* 92: 45 - 53