MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2011, 63: 305 - 314

Tomasz Wołkowicz[1], Jolanta Szych[1], Sebastian Wardak[2]

Analiza podłoża genetycznego i mechanizmów rozprzestrzeniania się oporności na tetracyklinę populacji szczepów z rodzaju *Campylobacter* izolowanych w Polsce w latach 2007-2008*

[1] Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. *M. Jagielski*
[2] Laboratoria Analiz Lekarskich ALAB,
Kierownik: mgr *J. Czeszko*

W Polsce obserwowany jest gwałtowny wzrost odsetka szczepów *Campylobacter* opornych na tetracyklinę. Charakterystyka opornych szczepów wykazała duże ich zróżnicowanie, obejmujące zarówno poziom oporności na ten lek, sekwencję nukleotydów genu *tetO* warunkującego tę oporność, jak i pochodzenie filogenetyczne badanych szczepów. W pracy potwierdzono także istotną rolę horyzontalnego rozprzestrzeniania się oporności, która w sytuacji tak dużej różnorodności szczepów opornych, może powodować dalsze bardzo szybkie narastanie oporności *Campylobacter* na tetracyklinę.

Zakażenie pałeczkami *Campylobacter* jest jedną z najczęstszych przyczyn biegunki u ludzi w krajach rozwiniętych (6). W Europie, w 2009 roku, zarejestrowano prawie 200 tysięcy przypadków zakażeń o etiologii *Campylobacter* (5) co stanowiło najpoważniejszy czynnik etiologiczny biegunek pochodzenia bakteryjnego. W Polsce, mimo stale notowanego wzrostu, co roku wykrywa się zaledwie kilkaset przypadków zakażeń pałeczkami z rodzaju *Campylobacter* (w latach 2009-2010 zarejestrowano odpowiednio 359 i 375 przypadków (www.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld). Jednak wyniki badań przeprowadzonych przez Wardaka i wsp. (21) sugerują, iż Polska nie jest krajem wolnym od tego patogenu a taki stan rzeczy związany jest przede wszystkim z brakiem rutynowej diagnostyki w kierunku zakażenia pałeczkami *Campylobacter* w naszym kraju.

W terapii zakażeń wywołanych przez pałeczki z rodzaju *Campylobacter* istotne miejsce zajmują antybiotyki z grupy tetracyklin. Z przeprowadzonych w Polsce badań lekowrażliwości pałeczek *Campylobacter* wynika, iż oporność na ten lek bardzo szybko narasta (16, 25, 26) i obecnie już około 40% szczepów wykazuje oporność na ten antybiotyk (24). Odsetek ten, choć wysoki, jest niższy niż obserwowany w Kanadzie czy Hiszpanii gdzie oporność

* Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2010-2011 jako projekt badawczy nr 0473/B/P01/2010/38

na tetracyklinę stwierdzono u odpowiednio 50% i 72% izolowanych szczepów (8, 13). Oporność bakterii z rodzaju *Campylobacter* na tetracyklinę związana jest z występowaniem genu oporności *tet*(O) zlokalizowanego zazwyczaj na plazmidzie koniugacyjnym (4, 11, 19). Gen ten koduje białko oddziaływujące z rybosomem bakterii i uniemożliwiające w ten sposób efektywne związanie się z nim cząsteczki antybiotyku. Znacznie rzadziej oporność na tetracyklinę może być wynikiem występowania w komórce bakteryjnej pomp aktywnie usuwających z niej antybiotyk.

Celem badań była analiza podłoża genetycznego i mechanizmów rozprzestrzeniania się oporności na tetracyklinę populacji szczepów z rodzaju *Campylobacter* izolowanych w Polsce w latach 2007-2008.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy, hodowla i przechowywanie szczepów. Badaniom poddano 94 izolaty *Campylobacter jejuni*, wyhodowane od różnych pacjentów, wykazujące obniżoną wrażliwość na tetracyklinę. Szczepy te zostały wyizolowane w latach 2007-2008 z próbek kału od osób chorych w: Laboratorium Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH, w laboratoriach stacji sanitarno-epidemiologicznych oraz w laboratoriach szpitalnych. Hodowlę prowadzono na podłożu Columbia agar z dodatkiem 5% krwi baraniej (Oxoid), w atmosferze mikroaerofilnej, w temperaturze 42˚C. Warunki mikroaerofilne uzyskiwano z zastosowaniem generatorów CampyGen (Oxoid). Szczepy przechowywano w zamrożeniu w -70˚C w bulionie BHI z dodatkiem 20% glicerolu.

Oznaczanie gatunku szczepów. Identyfikację badanych szczepów prowadzono jak opisano uprzednio (24).

Określanie lekowrażliwości. Lekowrażliwość badanych szczepów określano metodą oznaczania najmniejszego stężenia hamującego wzrost bakterii (MIC) przy użyciu pasków z gradientem antybiotyku E-test (BioMerieux). Szczepy zawieszano w roztworze soli fizjologicznej (Polfarma) do gęstości zawiesiny równej 0,5 MacFarlanda, następnie posiewano wymazówką na podłoże Mueller-Hintona z dodatkiem 5% krwi baraniej (BioMerieux) i nakładano pasek antybiotykowy z tetracykliną. Wyniki odczytywano po 24 godzinnej inkubacji w temperaturze 42˚C w warunkach mikroaerofilnych. Zgodnie z wytycznymi CLSI (3), za oporne uważano szczepy wykazujące MIC tetracykliny ≥16 mg/l. Do dalszych badań wybrano także trzy szczepy wykazujący nieco niższe wartości MIC tetracykliny (dwa szczepy posiadające MIC = 4mg/l oraz jeden szczep wykazujący MIC = 12mg/l).

Wykrywanie obecności genu *tetO*. Gen *tetO* był wykrywany w reakcji PCR z zastosowaniem pary starterów *tetO* F i *tetO* R zaproponowanych przez Bacon i wsp. (1).

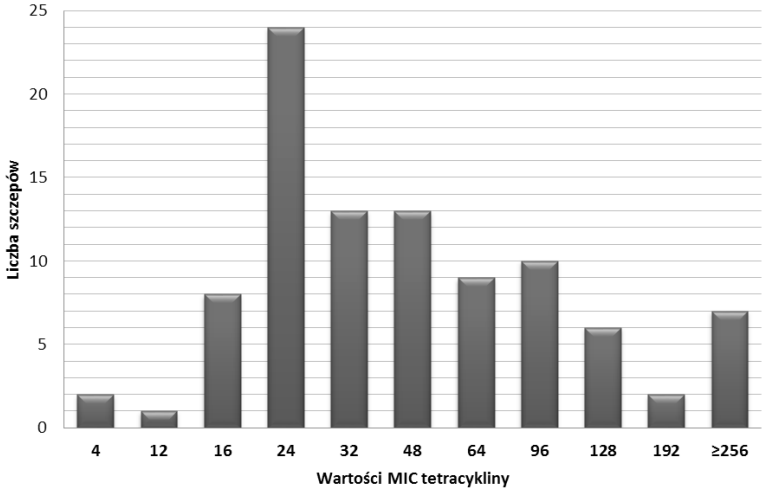
Izolacja plazmidowego DNA. Izolację plazmidowego DNA wykonywano metodą lizy alkalicznej zgodnie z metodyką *Sambrook* i wsp. (17) z uwzględnieniem modyfikacji *Pratt* i wsp.(14). Wyizolowany DNA w formie CCC rozdzielano w 0,7% żelu agarozowym w buforze TAE. Jako kontrolę poprawności wykonania izolacji plazmidowego DNA oraz jako marker wielkości zastosowano opisany uprzednio szczep *C. jejuni* 13/06 posiadający plazmid wielkości około 45 kpz (22). Elekroforegramy dokumentowano przy użyciu programu GelScan wersja v.1.13. firmy Kucharczyk T.E. (Polska).

REA-PFGE. Izolację całkowitego DNA do analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych przeprowadzonej za pomocą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym wykonywano zgodnie z wytycznymi CAMPYNET (http://www.svs.dk/campynet) z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *Sma*I. Elektroforezę pulsacyjną prowadzono w aparacie CHEF-DR II (Bio Rad Laboratories). Elekroforegramy dokumentowano przy użyciu programu GelScan wersja v.1.13. firmy Kucharczyk T.E. (Polska), a następnie analizowano przy użyciu oprogramowania komputerowego Gel Compar II Software v. 3.10 firmy Applied Maths, (Belgia). Zgodnie z kryteriami zaproponowanymi przez *Tenovera* i wsp. (20), izolaty bakteryjne zaliczano do określonego profilu PFGE, jeżeli nie obserwowano różnic w ich wzorach restrykcyjnych.

Sekwencjonowanie genu *tetO*. Sekwencjonowanie fragmentu genu *tetO* przeprowadzono dla 8 szczepów wykazujących najwyższy poziom oporności na tetracyklinę (wartość MIC tetracykliny szczepów o numerach 37/07, 184/07, 11/08, 78/08, 111/08, 140/08 wynosiła ≥256, a szczepów o numerach 107/07 i 136/08 była równa 192 mg/l) oraz jednego szczepu posiadającego gen *tetO* lecz wykazującego niski poziom oporności (szczep o numerze 184/08). Fragment genu *tetO* został zamplifikowany zgodnie z procedurą zaproponowaną przez *Bacon* i wsp. (1). Produkt reakcji PCR oczyszczono za pomocą zestawu QIAquick PCR Purification Kit (QiaGen). Sekwencjonowanie wykonano w firmie Genomed. Sekwencje analizowano za pomocą programu Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na rycinie 1 przedstawiono rozkład wartości MIC tetracykliny wobec badanych szczepów. Stopień oporności na tetracyklinę wykazuje bardzo duże zróżnicowanie. Jedynie 3 szczepy wykazywały obniżony stopień wrażliwości na ten lek wynoszący 4 i 12 mg/l. Większość szczepów wykazywała średni poziom oporności, z czego aż wobec 24 szczepów (25%

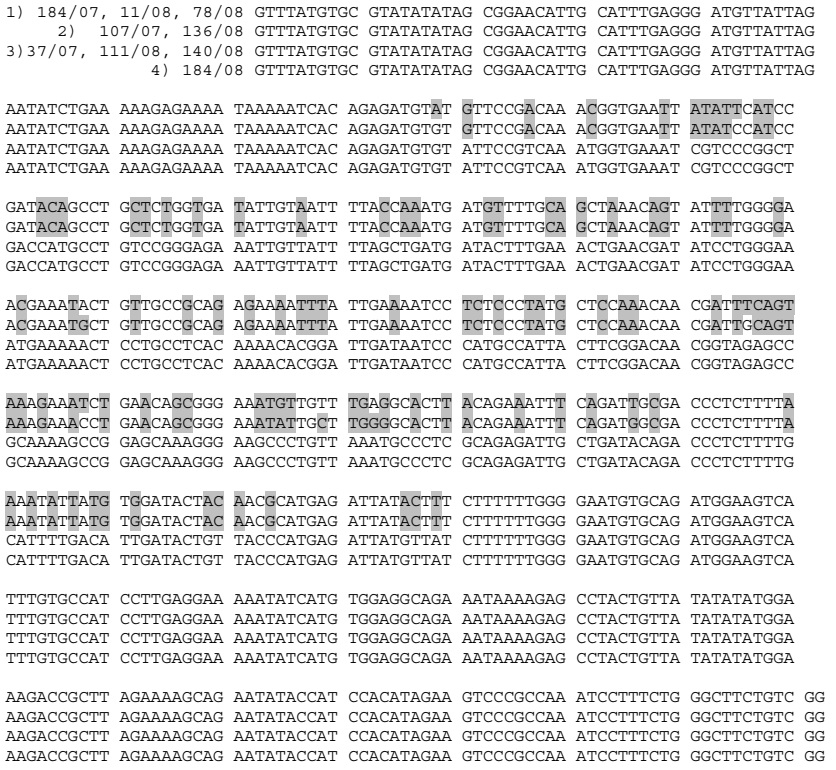


Rycina 1 Rozkład wartości MIC tetracykliny badanej populacji szczepów opornych.

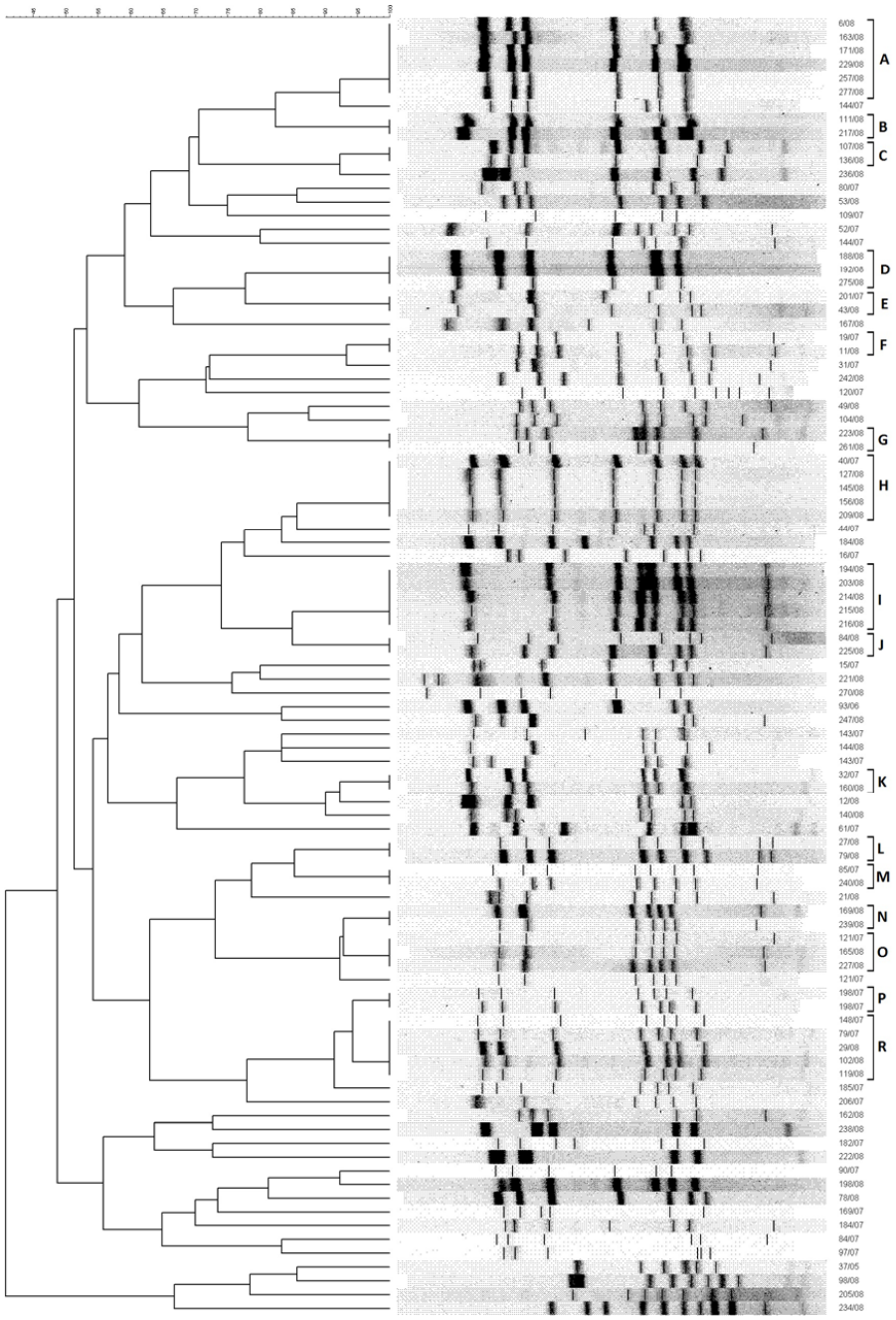
wszystkich badanych szczepów) wartość MIC tetracykliny była równa 24 mg/l. W przypadku 7 szczepów stwierdzono bardzo wysoki stopień oporności wynoszący ≥256 mg/l.

U wszystkich badanych szczepów wykryty został gen *tetO* natomiast obecność plazmidów stwierdzono u 65 (70%) szczepów. U większości tych szczepów wykazano obecność dużego plazmidu o wielkości około 45 kpz.

Sekwencjonowanie fragmentu genu *tetO* wykazało, że trzy szczepy (184/07, 11/08, 78/08) wykazujące bardzo wysoki poziom oporności na tetracyklinę (MIC ≥ 256mg/l) posiadały identyczną sekwencję badanego fragmentu genu *tetO* wykazując jednocześnie zaledwie 81% identyczności z sekwencjonowanym fragmentem genu *tetO* szczepu prezentującego niski poziom oporności na tetracyklinę (ryc. 2.). Podobne wyniki uzyskano dla dwóch szczepów posiadających MIC tetracykliny równe 192mg/l (szczepy 107/07, 136/08), a analiza sekwencji wykazała jedynie kilka pojedynczych substytucji (przekładających się na pojedyncze substytucje aminokwasowe w kodowanym białku) w porównaniu z opisanymi powyżej trzema szczepami wysokoopornymi. Analiza wykonana z użyciem programu BLAST wykazała bardzo wysoki poziom identyczności (98-100%) obydwu opisanych sekwencji z opublikowanymi wcześniej sekwencji genu *tetO* (GenBank: AY394561.1). Pozostałe trzy



Rycina 2. Alignment sekwencji fragmentu genu *tetO* szczepu 184/08 – ścieżka 4 wykazującego niski poziom oporności oraz wybranych 8 szczepów prezentujących wysoki poziom oporności na tetracyklinę – ścieżki 1-3.



Rycina 3. Analiza pokrewieństwa genetycznego tetracyklinoopornych szczepów *Campylobacter* przeprowadzona za pomocą metody REA-PFGE.

szczepy wykazujące bardzo wysoki poziom oporności na tetracyklinę (MIC ≥ 256mg/l) oraz szczep wykazujący niski poziom oporności posiadały identyczną sekwencję fragmentu genu *tetO* i, tak jak to opisano powyżej, była ona w zaledwie 81% podobna zarówno do pozostałych analizowanych sekwencji jak i do sekwencji genu *tetO* opublikowanych przez innych autorów (GenBank: AY394561.1). Analiza z użyciem programu BLAST wykazała wyższe podobieństwo (90-92% identyczności przy 88-89% pokryciu sekwencji) do sekwencji genów oporności na tetracyklinę bakterii z rodzaju *Streptococcus* czy *Clostridium* (GenBank: AJ295238.3; FM164392.1).

Badanie wzajemnego pokrewieństwa metodą REA-PFGE wykazało duże zróżnicowanie subpopulacji szczepów opornych na tetracyklinę (Ryc. 3). Wśród 94 badanych szczepów wyróżniono 62 profile genomowego DNA. W badaniu wykryto także 17 grup szczepów wykazujących identyczny wzór prążków (jedną grupę liczącą 6 szczepów, trzy grupy liczące 5 szczepów, trzy grupy liczące 3 szczepy i dziesięć par szczepów).

W celu określenia czasu i stopnia rozprzestrzenienia się w populacji badanych tetracyklinoopornych szczepów określonych klonów przeanalizowano wyniki badania REA-PFGE pod kątem daty i miejsca wyhodowania szczepu. Najliczniejsza grupa 6 szczepów (oznaczona jako A) obejmowała 5 szczepów z drugiej połowy i jeden szczep z początku 2008 roku. Szczepy te zostały wyhodowane w Warszawie, Katowicach oraz w Bielsku-Białej. Jedna z grup liczących 5 szczepów (grupa R) zawierała szczepy izolowane tak w roku 2007 jak i 2008, a pochodziły one zarówno ze stacji sanitarno-epidemiologicznej w Bielsku-Białej jak i Kielc. W przypadku drugiej grupy liczącej 5 szczepów (grupa I) wszystkie szczepy pochodziły z końca 2008 roku. Cztery z nich zostały wyhodowane w Bielsku-Białej (z czego trzy pochodziły od członków jednej rodziny) a jeden w Nowej Soli. Trzecia grupa 5 szczepów (grupa H) zawierała 4 szczepy z drugiej połowy 2008 roku i jeden z początku 2007 roku. Najwcześniej wyhodowany z powyższych szczepów wyhodowano od mieszkańca Milanówka natomiast pozostałe szczepy wyhodowano w Katowicach i Bielsku-Białej. W przypadku pozostałych, mniej licznych grup szczepów, wyniki analizy dały podobne rezultaty gdyż wśród szczepów o tym samym profilu PFGE występowały zarówno szczepy izolowane w podobnym czasie i miejscu jak i izolowane w różnych latach.

DYSKUSJA

Oporność pałeczek z rodzaju *Campylobacter* na tetracyklinę osiągnęła w Polsce niepokojący poziom sięgający 40% (24). Określenie wartości MIC tetracykliny wobec szczepów opornych na ten lek wskazuje jednak na bardzo duże różnice stopnia oporności poszczególnych izolatów. Może to być spowodowane zarówno obecnością różnych mechanizmów oporności na tetracyklinę jak i różnym stopniem eksprymowania odpowiednich genów oporności. Najważniejszym mechanizmem oporności pałeczek *Campylobacter* na tetracyklinę jest obecność białka ochraniającego rybosomy bakterii przed działaniem antybiotyku, kodowanego przez gen *tetO* (4, 11, 19). W obecnych badaniach gen *tetO* został wykryty we wszystkich badanych szczepach co potwierdza istotną rolę ekspresji tego genu w generowaniu oporności na tetracyklinę. Według danych piśmiennictwa, gen *tetO* najczęściej występuje na dużym (wielkości około 45 kpz) plazmidzie koniugacyjnym. Ponieważ obecność plazmidów o podobnej wielkości potwierdzono u 70% badanych w pracy szczepów należy przyjąć możliwość transferu genu *tetO* z plazmidu na chromosom bakteryjny lub integracji całego

plazmidu z chromosomalnym DNA. Niższą częstość występowania plazmidowo kodowanego genu *tetO* wykazali *Lee* i wsp. (10) oraz *Gibreel* i wsp. (8) (odpowiednio 47% i 67% szczepów). Natomiast *Wardak* i wsp. wyizolowali plazmidy aż z 96% badanych izolatów *C. jejuni* i *C. coli* wyhodowanych od ludzi chorych w Polsce (26).

Stopień oporności na tetracyklinę wynikający z ekspresji genu *tetO* może mieć różne podłoże. Wykazany brak różnic w sekwencji fragmentu genu szczepów wysokoopornych i szczepu wykazującego niski poziom oporności, wskazuje, że różnice we wrażliwości szczepów nie wynikały jedynie z budowy genu *tetO*. Uzyskane wyniki nie potwierdzają równocześnie wyników uzyskanych przez *Gibreel* i wsp. (8), którzy sugerowali istnienie siedmiu specyficznych substytucji nukleotydowych (skutkujących substytucjami w składzie aminokwasowym kodowanego białka) odpowiedzialnych za nadawanie wysokiego poziomu oporności na tetracyklinę.

Wyniki sekwencjonowania potwierdziły występowanie dużych różnic w sekwencji genu *tetO* (przekładających się na znaczne różnice w składzie aminokwasowym kodowanego białka) szczepów o wysokim poziomie oporności na tetracyklinę. Owe znaczne różnice świadczą równocześnie o różnym pochodzeniu tego genu u różnych przedstawicieli populacji pałeczek *Campylobacter*. Istnienie wielu niezależnych źródeł genów oporności może być bardzo ważnym czynnikiem odpowiedzialnym za tak szybkie narastanie oporności na ten lek. Sugerowało by to także bardzo istotną rolę horyzontalnego transferu genu w rozprzestrzenianiu się tego zjawiska.

Potwierdzenie roli horyzontalnego rozprzestrzeniania się genów oporności na tetracyklinę przeprowadzono w oparciu o analizę wzajemnego pokrewieństwa opornych szczepów za pomocą metody REA-PFGE. Metoda REA-PFGE jest uważana za dobrze różnicującą i przydatną w badaniu wielu rodzajów patogenów, w tym pałeczek z rodzaju *Campylobacter* (7, 12, 23, 27). Badanie to wykazało duże zróżnicowanie subpopulacji szczepów opornych na tetracyklinę (na 97 badanych szczepów dało się wyróżnić 62 różne profile). Tak duże zróżnicowanie wewnętrzne populacji pałeczek *Campylobacter* potwierdzają także badania innych autorów (18).

Serichantalergs i wsp. (18) zauważyli, iż szczepy wykazujące podobieństwo w badaniu metodą REA-PFGE wykazywały identyczny wzór oporności na antybiotyki. Jednak charakterystyczną cechą zaobserwowanego horyzontalnego mechanizmu rozprzestrzeniania się różnych wersji genu *tetO* jest nie tylko wysokie zróżnicowanie subpopulacji szczepów opornych lecz także fakt, że klony tego samego szczepu mogą wykazywać różny poziom oporności w zależności od pozyskanego genu oporności. Dokładna analiza wyników określania wzajemnego pokrewieństwa badanych szczepów jak i miejsca i czasu ich wyhodowania wykazała także istnienie kilku klonów stabilnie utrzymujących się w „polskiej populacji" pałeczek *Campylobacter*. W poniższym badaniu, porównanie stopnia oporności na tetracyklinę szczepów prezentujących identyczny wzór prążków w badaniu REA-PFGE wykazało, iż w przypadku 9 grup blisko ze sobą spokrewnionych szczepów wykazywały one identyczny poziom oporności lub różnice te mieściły się w obrębie 1 rzędu dwukrotnego rozcieńczenia antybiotyku. Takie wyniki mogłyby wskazywać na oczywistą rolę klonalnego rozprzestrzeniania się oporności. Jednakże w przypadku 4 grup szczepów identycznych w badaniu REA-PFGE różnice w poziomie oporności na tetracyklinę były rzędu 1,5 – 2,5 dwukrotnych rozcieńczeń antybiotyku. W przypadku innych dwóch par szczepów wykazujących bardzo bliskie pokrewieństwo genomowego DNA różnice w poziomie oporności

były jeszcze większe. W pierwszej parze dla jednego szczepu MIC tetracykliny wynosił 24 mg/l a dla drugiego aż ≥256 mg/l. W drugiej parze różnica ta była jeszcze większa gdyż w przypadku pierwszego szczepu MIC tetracykliny wynosił12 mg/l a drugiego aż ≥256 mg/l. Rozbieżności między wynikami badania lekooporności i badania PFGE, potwierdzające istotną rolę także horyzontalnego rozprzestrzeniania się oporności w populacji pałeczek *Campylobacter* są zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów (2, 9, 15).

PODSUMOWANIE

W populacji pałeczek z rodzaju *Campylobacter* izolowanych w Polsce obserwowany był od wielu lat stały wzrost odsetka szczepów opornych na tetracyklinę. Najważniejszym czynnikiem warunkującym oporność badanych szczepów na tetracyklinę jest gen *tetO*. Dokładna charakterystyka szczepów opornych, wyizolowanych w latach 2007-2008 wskazała na ich duże zróżnicowanie, zarówno pod względem poziomu oporności jak i ich wzajemnego pokrewieństwa. W powyższym badaniu wykazano także obecność różnych wersji genu *tetO* u różnych izolatów. Potwierdzono także istotną rolę horyzontalnego przekazywania genu oporności za pomocą plazmidów. Efektem tego zjawiska są duże różnice w wartościach MIC tetracykliny. Najważniejszym i zarazem najgroźniejszym skutkiem tak dużego zróżnicowania populacji szczepów opornych jak i dużej łatwości przekazywania genów oporności do niespokrewnionych, więc często także wrażliwych szczepów pałeczek *Campylobacter*, może być dalszy, bardzo gwałtowny wzrost ich oporności na ten lek w Polsce.

T. Wołkowicz, J. Szych, S. Wardak

Analysis of the genetic background and mechanisms of dissemination of resistance to tetracycline of the polish population of *Campylobacter* strains isolated in Poland in years 2007-2008

SUMMARY

In Poland, constant rise of number of Campylobacter strains resistant to tetracycline is observed in Poland. Analysis of the resistant strains showed their strong diversity, including both the different levels of resistance to this drug, large differences in the sequence of the resistant gene *tetO*, and diverse phylogenetic origin. The study also confirmed the important role of horizontal spread of resistance which, in the event of such a large diversity of resistant strains, can cause further very rapid escalation of resistance of *Campylobacter* to tetracycline.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bacon D. J., Alm R. A., Burr D. H.* i inni. Involvement of a Plasmid in Virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. Infect Immun 2000; 68: 4384-90
2. *Cardinale E., Rose V., Perrier Gros-Claude J.D.* i inni. Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. isolated from poultry and humans in Senegal J Appl Microbiol 2006;100:209-17

3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline M45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa; 2006
4. *Connell SR, Trieber CA, Dinos GP* i inni. Mechanism of Tet(O)-mediated tetracycline resistance. EMBO J 2003;22:945-53
5. European Food Safety Authority, European Centre Disease Prevention and Control. Scientyfic report of EFSA and ECDC. TheEuropean Union Summary Report on Trends and Soursces of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. EFSA Journal 2011; 9:2090
6. *Friedman C R, Nejmann J, Wegener HC, Tauxe RV*. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, [W:] Nachamkin I, Blaser M J. *Campylobacter*, wydanie II, Washington, DC, ASM Press 2000: 121-38
7. *Fitzgerald C, Stanley K, Andrew S, Jones K*. Use of pulse-field gel electrophoresis and *flagellin* gene typing in identifying clonal groups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in farm and clinical environments. Appl Environ Microbiol 2001; 67:1429-36
8. *Gibreel A, Tracz DM, Nonaka L* i inni. 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. 2004;48:3442-50
9. *Han K, Jang SS, Choo E* i inni. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. Int J Food Microbiol 2007;114:50-9
10. *Lee CY, Tai CL, Lin SC, Chen YT*. Occurrence of plasmids and tetracycline resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from whole market chickens and clinical samples. Int J Food Microbiol 1994; 24:161-70
11. *Manavathu EK, Fernandez CL, Cooperman BS, Taylor DE*. Molecular studies on the mechanism of tetracycline resistance mediated by Tet(O). Antimicrob Agents Chemother 1990;34:71-7
12. *Nielsen EM, Engberg J, Fussing V* i inni. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. J Clin Microbiol 2000; 38:3800-10
13. *Prats G, Mirelis B, Llovet T* i inni. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:1140-5
14. *Pratt A i Korolik V*. Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. J Antimicrob Chemother. 2005;55:452-60
15. *Ronner AC, Borch E, Kaijser B*. Genetic profiling of *Campylobacter jejuni* strains from humans infected in Sweden or in Thailand, and from healthy Swedish chickens, studied by pulse-field gel electrophoresis (PFGE). Scand J Infect Dis 2005;37:579-84
16. *Rożynek E, Dzierżanowska-Fangrat K, Szczepańska B* i inni. Trends in antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolates in Poland (200-2007). Pol J Microbiol. 2009;58:111-5
17. *Sambrook J i Russel DW*. Molecular cloning – a laboratory manual, wydanie III, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA 2001
18. *Serichantalergs O, Pootong P, Dalsgaard A* i inni. PFGE, Lior serotype, and antimicrobial resistance patterns among *Campylobacter jejuni* isolated from travelers and US military personnel with acute diarrhea in Thailand, 1998-2003. Gut Pathogens 2010;2:15
19. *Taylor DE i Tracz DM*. Mechanisms of antimicrobial resistance in *Campylobacter*, [W] Ketley JM i Konkel ME. *Campylobacter*. Molecular and cellular biology, Norfolk, UK, Horizon Bioscience 2005:193-204
20. *Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV* i inni. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995;33:2233-9
21. *Wardak S, Duda U, Szych J*. Epidemiologiczna analiza zakażeń wywołanych przez pałeczki *Campylobacter sp*. wykrytych przez stację sanitarno-epidemiologiczną w Bielsku-Białej. Med Dośw Mikrobiol 2007;61:417-24

22. *Wardak S., Jagielski M*. Ocena przydatności wybranych metod genotypowych I fenotypowych do wewnątrzgatunkowego różnicowania pałeczek *Campylobacter jejuni* oraz *Campylobacter coli* izolowanych od ludzi I. Przydatność Biotypowania, określania profilu lekooporności i profilu plazmidowego oraz plazmidowego wzoru restrykcyjnego. Med Dośw Mikrobiol 2009;61:47-61
23. *Wardak S., Jagielski M*. Ocena przydatności wybranych metod genotypowych I fenotypowych do wewnątrzgatunkowego różnicowania pałeczek *Campylobacter jejuni* oraz *Campylobacter coli* izolowanych od ludzi II. Przydatność metod PFGE, ERIC-PCR, PCR-FLA-A-RFLP i MLST. Med Dośw Mikrobiol 2009;61:63-77
24. *Wardak S, Szych J*. Ocena wrażliwości na tygecyklinę klinicznych szczepów pałeczek *Campylobacter jejuni* opornych na tetracyklinę. Med Dośw Mikrobiol 2010; 62:345-50
25. *Wardak S, Szych J, Duda U*. Wrażliwość na antybiotyki i chemioterapeutyki szczepów pałeczek *Campylobacter sp.* izolowanych od ludzi w latach 2005-2006 w regionie bielsko-bialskim. Med Dośw Mikrobiol. 2007;59:43-9
26. *Wardak S, Szych J, Zasada AA, Gierczyński R*. Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* clinical isolates from Poland. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1123-5
27. *Zorman T, Heyndrickx M, Uzunovic-Kamberovic S, Smole Mozina S*. Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. Int J Food Microbiol 2006;110:24-33

Otrzymano: 23 XI 2011 r.
Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24,
Zakład Bakteriologii, NIZP-PZH,
e-mail: twolkowicz@pzh.gov.pl