



TERMOFIILSETE KAMPÜLOBAKTERITE LEVIMUS, ARVUKUS JA RAVIMTUNDLIKKUS VÄRSKES KANALIHAS EESTI JAEMÜÜGI TASANDIL

THE PREVALENCE, COUNTS AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF THERMOPHILIC *CAMPYLOBACTER* SPP. IN FRESH CHICKEN MEAT AT ESTONIAN RETAIL LEVEL

Kadrin Meremäe¹, Mihkel Mäesaar^{1,2}, Toomas Kramarenko^{1,2}, Liidia Häkkinen², Mati Roasto¹

¹Eesti Maailikool, Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut, Toiduhügieeni osakond, Fr. R. Kreutzwaldi 56/3, Tartu 51014

²Veterinaar- ja toidulaboratoorium, Kreutzwaldi 30, Tartu 51006

Saabunud: 09.09.2015
Received:
Aktsepteeritud: 10.10.2015
Accepted:

Avaldatud veebis: 28.10.2015
Published online:

Vastutav autor: Kadrin
Corresponding author: Meremäe
e-mail: kadrin.meremae@emu.ee

Keywords: *Campylobacter*, chicken meat, prevalence, counts, seasonality, antimicrobial resistance.

Link: http://agrt.emu.ee/pdf/2015_2_meremae.pdf

ABSTRACT. Thermophilic *Campylobacter* spp. are one of the most common cause of acute gastroenteritis in European Union and the illness is frequently associated with the consumption of chicken meat. The aim of the present study is to give an overview about the prevalence, counts and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. in fresh chicken meat at the Estonian retail level. *Campylobacter* spp. was isolated in 77 (35%) of 220 meat samples. Altogether, 24 (20.3%) of Estonian origin, 41 (50%) of Lithuanian origin and 12 (60%) of Latvian origin chicken fresh meat samples were positive for *Campylobacter* at Estonian retail level. The highest counts of *Campylobacter* spp., on average 2600 CFU g⁻¹, were detected in the chicken meat of Lithuanian origin followed by on average 1600 CFU g⁻¹ and 660 CFU g⁻¹ in samples of Latvian and Estonian origin, respectively. The seasonal peak of *Campylobacter* contamination was between June and September. A total of 36 isolates (36.7%) of 98 were susceptible to all the tested antimicrobials. The highest proportion of isolates (41 isolates, 41.8%) was resistant to fluoroquinolones. Multiresistance was detected in 5 (5.1%) isolates. In conclusion, compared to fresh chicken meat products of Lithuanian and Latvian origin, the prevalence, counts and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in fresh chicken meat of Estonian origin were lower. Therefore we suppose that the risk of occurrence of *Campylobacter* human infection by consuming domestic chicken meat is lower than by consuming imported chicken meat.

© 2015 Akadeemiline Põllumajanduse Selts. Kõik õigused kaitstud. 2015 Estonian Academic Agricultural Society. All rights reserved.

Sissejuhatus

Termofiilsed kampülobakterid on inimestel sagedased akuutsete gastroenteriitide põhjustajad paljudes riikides (EFSA, 2014). Üldjuhul on tegemist kergekujulise haigusega, mille põhitunnuseks on kõhulahtisus ja palavik, kuid tõsisematel juhtudel võib sellest tulenevalt esineda ka artriiti, bakterieemiat, meningiiti, endokardiiti, jne. Rahvatervise seisukohalt on *C. jejuni* ja *C. coli* kui võimalikud haigestumise põhjustajad kampülobakterite liikidest kõige olulisemad. Kampülobakterenteriiti seostatakse kõige enam kampülobakteritega saastunud linnuliha, toorpiima ja joogivee tarbimisega (Calciati jt, 2012; Taylor jt, 2013;

Jacopanec jt, 2008; Mazick jt, 2006). Kirjanduse andmetel omab värske kanaliha kõige suuremat tähtsust kampülobakterenteriidi tekkes ning sellest tingituna on linnuliha adekvaatne kontroll kampülobakterenteriidi ennetamises üks kõige olulisemaid rahvatervishoiu strateegiaid (Roasto jt, 2015; Rosenquist jt, 2009; Wingstrand jt, 2006). Linnuliha saastumine termofiilsete kampülobakteritega osutab reeglina faktille, et haigustekitajatest on saastunud nii toidu algtootmise ja töötlemise tasand kui ka sellele järgnevat käitlemise etapid ehk kogu kanaliha tootmise ahel (Ma jt, 2014; Meremäe jt, 2010). Farmi tasandil on perekonna *Campylobacter* liigid nii sise- kui väliskeskkonnas

laialdaselt levinud, mistõttu võivad nii linnud kui loomad olla kampülobakterite asümptomaatilisteks kandjateks. Kampülobakterite kolonisatsioon kanadel levib enamasti nn horisontaalse ülekande kaudu, näiteks sööda, joogivee, näriliste, putukate ja inimtegevuse teel (Saleha, 2004). Tapamaja tasandil on reeglina kampülobakterite allikaks tapalindude soolesisaldis, mis võib algtöötlemise käigus sattuda rümbalt rümbale või rümbalt töövahenditele ja seadmetele (Ma jt, 2014; Stern ja Robach, 2003). Nii võib linnuliha saastumine kampülobakteritega aset leida nii tapamaja tasandil rümpade käitlemisel kui edasisel liha töötlemisel. Kampülobakterite leviku ennetamiseks ning saastumise olemasolul nende arvukuse vähendamiseks on võimalik rakendada väga erinevaid meetmeid alates elementaarsete bioohutusmeetmete rakendamisest farmi tasandil, hügieeninõuete täitmisest kõikides toidu tootmise ja käitlemise etappides kuni tehnoloogiliste lahendusteni tapamaja tasandil, näiteks rümpade efektiivse õhkjahutamise kasutamine jne. (Roasto jt, 2015; Rosenquist jt, 2009). Siiski võib kampülobakterite ülekande toimuda ka jaemüügi tasandil ristsaastumise kaudu, mistõttu täies ulatuses kampülobakterid kanalihalas tootmise ahelas alati elimineerida ei õnnestu. Värske kanalihalas saastumise korral kampülobakteritega on rahvatervise probleemiks ka antibiootikumidele resistentsed kampülobakterite tüved (Ma jt, 2014; Roasto jt, 2007). Resistentsete bakterite esinemine ja ringlemine toidu tootmise ahelas ning jõudmine tarbijani võib kujutada tõsist ohtu inimese tervisele. Sellisel juhul võib haigestunud inimese ravi eesmärgipärase antibiootikumiga tavapärasest pikeneda või isegi ebaõnnestuda (Travers, Barza, 2002). Bakterite resistentsuse (sh multiresistentsuse) esinemine kanalihalas tootmise ahelas peegeldab otseselt antibiootikumide laialdast kasutamist farmi tasandil kas profülaktilistel või ravi eesmärkidel pikema perioodi vältel (Ma jt, 2014; Smith jt, 2007). Seepärast teadusuuringud, mis aitavad välja selgitada nii kampülobakterite levimust kui antibiootikumresistentsust toidu tootmise ahelas, äärmiselt vajalikud. Käesoleva töö eesmärgiks on anda ülevaade aastatel 2012–2014 teostatud termofiilsete kampülobakterite teadusuuringutest Eestis, et hinnata *Campylobacter* spp. levimust, arvukust ja tundlikkust antibiootikumidele värskes kanalihalas ning anda värske kanalihalas seonduvalt kvalitatiivne riskihinnang.

Materjal ja meetodika

Campylobacter spp. levimus ja arvukus

Uurimustöös analüüsiti 220 nahka sisaldavat värske kanalihalas proovi, mis koguti Eesti jaemüügi tasandil aastal 2012. Kogutud proovidest moodustasid Eesti, Läti ja Leedu tooted vastavalt 53,6%, 37,3% ja 9,1%. Nii Eesti kui Leedu päritolu tooteid koguti aastaringselt igal kuul, kuid Läti päritolu tooted olid uurimisperioodil turul kättesaadavad vaid vahemikus september kuni detsember 2012. Kogutud proovid olid tootjapoolsetes originaalpakendites, mis välistas proovide transpordist ja jaekaubandusest tingitud ristsaastumise. Proovide kogumisel oli eeltingimuseks kahjustamata pakend

ning proovide kiire analüüsilaborisse toimetamine. Proovid toimetati laborisse külmakastides.

Termofiilsete kampülobakterite tuvastamiseks värskes kanalihalas kasutati EVS-EN ISO 10272-1:2006 meetodit ning arvukuse loendamiseks ISO/TS 10272-2:2006 meetodit, mida on põhjalikumalt kirjeldatud Mäesaar jt (2015; 2014) poolt. Lühidalt, 10 grammi kanalihalas proovi asetati steriilsesse Stomacheri kilekotti, millesse lisati 90 ml steriilset puhverdatud peptoonvett. Seejärel töödeldi proove 1 minuti jooksul Stomacher segistis. Edasiselt kanti 0,1 ml 10^{-1} ja 10^{-2} lahjendust mCCDA agariga (modified CCDA, Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar, Oxoid) Petri tassidele ja inkubeeriti mikroaeroobsetes tingimustes (CampyGenTM, Oxoid) 44–48 tundi temperatuuridel $41,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Paralleelselt eeltoodule kanti 10 g liha-proovi ka steriilsesse Shoti söötme pudelisse, kuhu lisati 90 ml Boltoni rikastuspuljongit (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). Neid proove inkubeeriti mikroaeroobsetes tingimustes 4–6 tundi temperatuuril $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ juures ja 44 \pm 4 tundi temperatuuril $41,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ juures. Seejärel kanti 10 μl rikastuspuljongit mCCDA agarile ja inkubeeriti mikroaeroobsetes tingimustes (CampyGenTM, Oxoid) 44–48 tundi temperatuuril $41,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Vastavalt ISO standardile, kampülobakterite tüüpilised kolooniad mCCDA agaril külvati edasi puhas-kultuuri saamiseks ja tõestuskatsete (kampülobakterite liikuvuse määramine, Gram'i järgi värvimine, biokeemilised testid) tegemiseks Columbia vereagarile (Oxoid), mida inkubeeriti 24 tundi temperatuuril $41,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Puhaskultuur säilitati glütserooli puljongis (15% [v/v] glütserooli 1%-ses [w/v-mahukaal] proteoospeptoonis) temperatuuril -82°C . Katsed viidi läbi Eesti Maaülikooli toiduhügieeni osakonnas.

Campylobacter spp. liigilise kuuluvuse määramine

Campylobacter jejuni, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*'e, ja *C. fetus* subsp. *fetus*'e identifitseerimiseks ja eristamiseks kasutati konventsionaalset PCR-meetodit, mida on põhjalikult kirjeldatud Wang jt (2002) poolt.

Campylobacter tüvede antibiootikumidele tundlikkus

Campylobacter tüvede antibiootikumi tundlikkuse uuringusse kaasati 98 isolaati, millest 36 (36,7%) olid Eesti, 46 (46,9%) Leedu ja 16 (16,3%) Läti päritolu. Tegemist oli kanalihalas ($n=517$) isoleeritud tüvedega, mis koguti 2012. aastal nii Eesti Maaülikooli toiduhügieeni osakonnas läbi viidud uuringu kui ka Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi riikliku monitooringu käigus. Termofiilsete kampülobakterite tuvastamiseks kasutati EVS-EN ISO 10272-1:2006 meetodit. Kogutud tüvede ($n=126$) antibiootikumide tundlikkuse määramisel kasutati minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramise VetMICTM-testi (National Veterinary Institute; Uppsala, Sweden), mida on põhjalikumalt kirjeldatud meie teadusuuringus Mäesaar jt (2015) poolt. Uuringud teostati 2013. ja 2014. aastal. Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) määramiseks testiti *Campylobacter* isolaate erütromütsiini, tsiprofloksatsiini, tetratsükliini, streptomütsiini, gentamütsiini ja nalidiksiin-

happe suhtes. Selleks võeti aasatäis (1 µl) Columbia vere-agaril (Oxoid) välja kasvanud *Campylobacter* puhas-kultuuri ning kanti edasi 10 ml katioonidega rikastatud ja 5% verd sisaldavasse Mueller-Hinton (CAMHB) puljongisse (Oxoid; Basingstoke, Hampshire, England) ning inkubeeriti temperatuuril $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 20 tundi. Tulemuseks saadi kasvu tihedus ligikaudu 10^8 PMÜ ml⁻¹. Pärast inkubeerimist kanti lahjendatud baktersistensioon Vet-MIC™ mikroplaadi aukudesse. Mikroplaate inkubeeriti temperatuuril $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 40–48 tundi ning seejärel loeti tulemused. Isolaatide antibiootikumidele tundlikkuse hindamisel võeti aluseks The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) soovitusi (2013^{a,b}). *C. jejuni* oli antibiootikumidele resistentne, kui MIC väärtused olid järgmised: erütromütsiin >4 µg/ml, tsiprofloksatsiin >1 µg/ml, tetratsükliin >2 µg/ml, streptomütsiin >2 µg/ml, nalidiksiinhape >16 µg/ml ja gentamütsiin >1 µg/ml. *C. coli* oli antibiootikumidele resistentne, kui MIC väärtused olid järgmised: erütromütsiin >16 µg/ml, tsiprofloksatsiin >1 µg/ml, tetratsükliin >2 µg/ml, streptomütsiin >4 µg/ml, nalidiksiinhape >32 µg/ml ja gentamütsiin >2 µg/ml.

Statistiline analüüs

Andmete töötlemisel kasutati MS Excel 2010 tarkvara (Microsoft Corporation; Redmond, WA, USA) ja andmete statistiline analüüs tehti tarkvarapaketi R. Kampülobakterite levimus- ja arvukusnäitajate statistilisel töötlemisel kasutati Kruskal-Wallis testi ja Hii-ruut testi. Kampülobakterite antibiootikumidele tundlikkuse andmete töötlemisel kasutati statistikaprogrammi The Statistical Package for Social Sciences 13.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

Tulemused ja arutelu

Campylobacter spp. levimus ja arvukus

Eesti Teadusagentuuri grandiprojekti (nr 9315) ja Põllumajandusministeeriumi rakendusuringute projekti (leping nr T13057VLTH) raames uuriti ühtekokku 220 värske kanaliha proovi. Uurimustulemused näitasid, et

Campylobacter spp. isoleeriti ühtekokku 77 (35%) Eesti jaemüügi tasandil kogutud värske kanaliha proovist (tabel 1). Nende hulgas oli Eesti päritolu *Campylobacter*-positiivseid kanaliha proove 24 (20,3%), Leedu päritolu 41 (50%) ja Läti päritolu proove 12 (60%). Sellest järeldub, et päritolu arvestades oli termofiilsete kampülobakterite kontaminatsioon 2012. aastal Eesti jaemüügi tasandil kogutud kanaliha toodetes erinev. Võrdluseks, aastatel 2000–2010 Eestis läbi viidud *Campylobacter* spp. levimusuuringus (Roasto jt, 2011) oli 1965 liha proovidest *Campylobacter*-positiivseid kokku 221 (11,3%), mis on oluliselt madalam näitaja, kui 2012. aastal. Siiski ka aastatel 2000–2010 esines kampülobakterite kontaminatsioonimäärades suuri varieeruvusi aastate lõikes. Meie varasemates uuringutes (Roasto jt, 2011; Meremäe jt, 2010) oli aastatel 2000 ja 2003–2004 kampülobakterite esinemine kanalihaproovides vastavalt 35,6%, 28,8% ja 29,8%, kuid ajavahemikus 2005–2010 varieerus *Campylobacter*-positiivsete proovide osakaal vahemikus 2,2–8,3%. Juhtudel, kus uurimismaterjaliks on olnud nahaga linnulihatooded, on alust eeldada ka *Campylobacter*-positiivsete proovide suuremat osakaalu. Seda kinnitab ka Soomes läbi viidud uuring, kus kampülobakterite levimus nahaga linnuliha toodetes oli oluliselt kõrgem (30,4%) kui nahata tükkilihas (9,4%) või rinnafilee (4,7%) (Katzav jt, 2008). Kirjanduse andmete põhjal võib siiski tõdeda, et võrreldes Eestiga on teistes riikides (näiteks Lätis, Leedus, Soomes, Rootsis) *Campylobacter* spp. levimus toores linnulihas oluliselt kõrgem varieerudes 42,2% kuni 56,3% (Kovalenko jt, 2013; Bunevičienė jt, 2010; Suzuki, Yamamoto, 2009). Ka käesolevas uuringus selgus, et Eesti turul müügil olevad Leedu ja Läti päritolu kanaliha importtoodet olid Eesti toodetest enam saastunud ehk *Campylobacter*-positiivsete toodete proportsioon oli vastavalt 50% ja 60%. Andmete statistilise töötlemise tulemusel saame väita, et importtoodet olid oluliselt ($p < 0,001$) rohkem saastunud termofiilsete kampülobakteritega kui Eesti päritolu toodet (20,3%). Sarnasele järeldusele on jõutud ka meie varasemates teadustöodes (Roasto jt, 2015; 2011).

Tabel 1. Kampülobakterite levimus ja arvukus värske kanaliha proovides (Roasto jt, 2015; Mäesaar jt, 2014)

Table 1. The prevalence and total counts of *Campylobacter* spp. in fresh chicken meat samples (Roasto et al., 2015; Mäesaar et al., 2014)

| Päritolumaal / <i>Origin of country</i> | Positiivsete proovide arv / proovide üldarv (% positiivseid) <i>Number of positive/total number of samples (% positive)</i> | Positiivsete proovide usaldusvahemik (95% CI) <i>95% confidence intervals of positive samples</i> | Keskmine bakterite arvukus proovides (\log_{10} PMÜ g ⁻¹) <i>The average number of bacteria in samples (\log_{10}CFU g⁻¹)</i> | Usaldusvahemik arvukuses (95% CI) <i>95% confidence intervals in total counts</i> |
|--|---|---|--|---|
| Eesti/ <i>Estonia</i> | 24/118 (20,3) | 14%–29% | 660 (2,8) | 190–1120 |
| Leedu/ <i>Lithuania</i> | 41/82 (50) | 39%–61% | 1600 (3,2) | 372–2814 |
| Läti/ <i>Latvia</i> | 12/20 (60) | 39%–78% | 2600 (3,4) | 919–4261 |
| Kokku/ <i>Total</i> | 77/220 (35) | 29%–42% | 1600 (3,2) | 782–2390 |

Kampülobakterite levimusest on veelgi olulisem kampülobakterite arvukus tootes, millest otseselt sõltub, kui suurt riski kujutab potentsiaalselt saastunud toote tarbimine inimese tervisele. Meie uuringus selgus, et kampülobakterite arvukus värske kanaliha proovides oli keskmiselt 1600 PMÜ/g⁻¹ (tabel 1), varieerudes vahemikus 782–2390 bakterit/grammis. Kõrgeim kampülobakterite arvukus (2600 PMÜ g⁻¹) oli loendatud Läti päritolu proovides, millele järgnesid

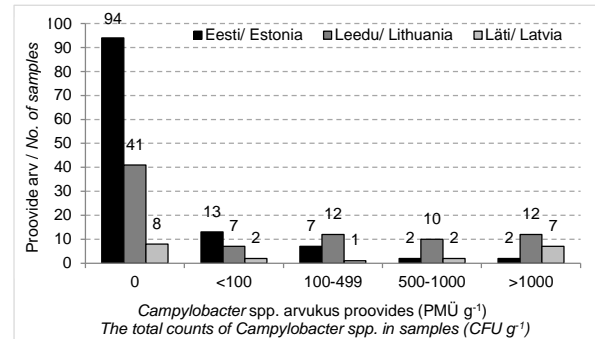
Leedu päritolu toodet, keskmiselt 1600 PMÜ g⁻¹. Eesti päritolu kanaliha toodetes oli keskmine kampülobakterite arvukus 660 PMÜ g⁻¹, mis oli oluliselt ($p < 0,001$) madalam kui importtoodetes. Inimese haigestumise esilekutsumiseks arvatakse piisav olema ligikaudu 500 kampülobakteri esinemine tootes (Keener jt, 2004), sõltudes bakteritüve virulentsusest, inimese vastupanuvõimest jne. Siiski EFSA (2013; 2011) andmetel on risk inimese tervisele suurim

kampülobakterite arvukuse esinemisel >1000 PMÜ g^{-1} toote kohta.

Joonis 1 annab ülevaate värskes kanaliha *Campylobacter* spp. loendamise tulemustest. Tulemustes selgus, et ühtekokku 143 proovis (65% proovidest) kampülobaktereid ei tuvastatud, kuna proovid andsid nii kampülobakterite tuvastamisel kui loendamisel negatiivse tulemuse. Kokku 22 (10%) värskes kanaliha proovi sisaldas kampülobaktereid vähem kui 100 PMÜ g^{-1} (kajastades negatiivse loendamise, kuid kampülobakterite suhtes positiivse tuvastamise tulemust). Siiski, 20 (9,1%) proovi sisaldas kampülobaktereid vahemikus 100–499 PMÜ g^{-1} ja 14 (6,4%) proovi vahemikus 500–1000 PMÜ g^{-1} . Rohkem kui 1000 PMÜ g^{-1} sisaldas 21 (35%) proovi, neist 2 (1,7%) Eesti, 12 (14,6%) Leedu ja 7 (35,0%) Läti päritolu proovi. Kuigi varasemalt on Leedus teostatud uuring (Bunevičienė jt, 2010) leidnud kampülobakterite keskmiseks arvukuseks 110 PMÜ g^{-1} , siis meie uuring kinnitas oluliselt kõrgemaid kontaminatsioonimäärasid Leedu päritolu toore linnuliha proovide hulgas. Käesolevas uuringus leiti ka statistiliselt oluline erinevus kampülobakterite levimusnäitajates ja arvukuses nii Eesti ja Leedu ($p < 0,001$) kui ka Eesti ja Läti ($p < 0,001$) päritolu toodete vahel. Mida kõrgem kampülobakterite arvukus värskes kanaliha pinnal esineb, seda suurem on tõenäosus kampülobakterite ülekanndamiseks toidu töötlemise ja tarbimise ahelasse kujutades seeläbi ohtu tarbijate tervisele. EFSA (2011) andmetel on võimalik kampülobakteritest tulenevaid rahvatervise riske vähendada 50% ulatuses, kui kampülobakterite arvukus kana tapapartiide kaela- ja rinnakunahal on <1000 PMÜ g^{-1} , ning koguni 90% ulatuses, kui see arvukus on <500 PMÜ g^{-1} . Hansson jt (2007) leidsid, et isegi kõige paremini planeeritud ja detailne tõrjeprogramm ei garanteeri *Campylobacter* spp. täielikku elimineerimist kanaliha tootmise ahelas, kuna kampülobaktereid leidub laialdaselt kõikjal keskkonnas. Kui rakendatakse rangeid bioohutuse meetmeid, on siiski farmi tasandil võimalik saavutada oluliselt madalamaid *Campylobacter* spp. kontaminatsiooni tasemeid (Rosenquist jt, 2009). Tööstuse tasandil on võimalik ohtusid minimeerida kampülobakterite arvukuse vähendamisega rümpade pinnal, neid kas külmu- või kuumtööteldes (Rosenquist jt, 2003). Selleks, et vähendada *Campylobacter* spp. esinemissagedust kogu kanaliha tootmise ahelas, on oluline ettevõtte tasandil efektiivsete kvaliteediprogrammide (HACCAP printsiipide), heade hügieeni- ja tootmistavade ning bioohutuse meetmete järjekindel rakendamine (Meremäe jt, 2010) ning vajadusel ohje meetmete korrigeerimine (Ma jt, 2014).

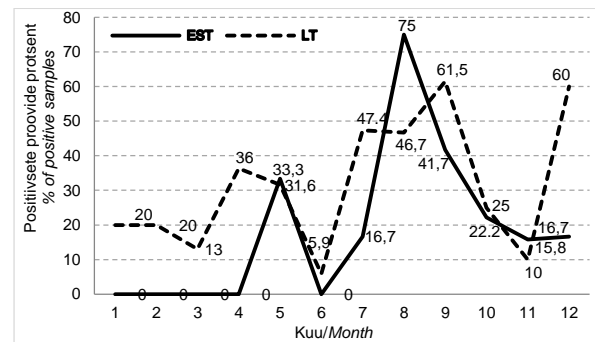
Uurimustulemustest selgus, et värskes kanaliha *Campylobacter* spp. levimusnäitajates esines 2012. aastal selge hooajaline varieeruvus (joonis 2). Kampülobakterite levimuses esines kõrghooaeg juunist kuni septembrini, kui *Campylobacter* spp. kontaminatsioonimäärad varieerusid vahemikus 16,7–75%. Eestis teostatud varasemad uuringud aastatel 2000–2010

(Roasto jt, 2011; Meremäe jt, 2010) kui teised samalaadsed mujal maailmas teostatud teadusuuringud (Horrocks jt, 2009; Rautelin, Hänninen, 2000) kinnitavad *Campylobacter* spp. levimust eeskätt suvekuudel. Seda seletatakse kampülobakterite sooja- ja niiskuselembusega.



Joonis 1. *Campylobacter* spp. arvukus värskes kanalihas (Mäesaar jt, 2014)

Figure 1. *Campylobacter* spp. counts in fresh chicken meat (Mäesaar et al., 2014)



Joonis 2. *Campylobacter* spp. kontaminatsiooni hooajaline varieeruvus Eesti (EST) ja Leedu (LT) kanalihas (Roasto jt, 2015)

Figure 2. Seasonality of *Campylobacter* spp. contamination in Estonian (EST) and Lithuanian (LT) origin chicken meat (Roasto et al., 2015)

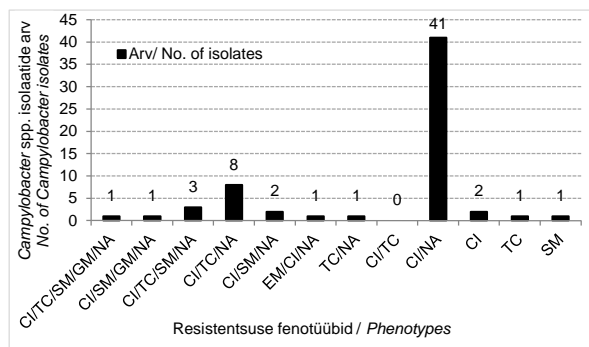
Campylobacter spp. liigiline kuuluvus

Campylobacter spp. liigilise kuuluvuse uuringusse kaasati ühtekokku 98 tüve, milledest 36 olid Eesti, 46 Leedu ja 16 Läti päritolu, mis olid isoleeritud värskes kanaliha proovidest aastal 2012. Uuringutulemused näitasid, et 89% nendest kampülobakterite isolaatidest olid määratletud kui *C. jejuni* ja 11% juhtudel oli tegemist *C. coli*'ga. Nii Eesti kui Läti päritolu *Campylobacter* tüved osutusid kõik *C. jejuni*'ks. Leedu päritolu tüvedest kokku 35 (76,1%) osutusid *C. jejuni*'ks ning 11 (23,9%) *C. coli*'ks. Ka meie varasemad teadusuuringud on kinnitanud, et *C. jejuni* on Eesti kanaliha tootmise ahelas kõige enam isoleeritud liik (Roasto jt, 2011; Meremäe jt, 2010), mis on kooskõlas ka teiste riikide samalaadsete uuringutega (Ma jt, 2014; Bunevičienė jt, 2010).

Campylobacter spp. tüvede ravimtundlikkus

Campylobacter spp. tüvede antibiootikumidele tundlikkuse uuringusse, mis viidi läbi Eesti Teadusagentuuri grandiprojekti (nr 9315) ja Põllumajandusministeeriumi rakendusuuringu projekti (leping nr

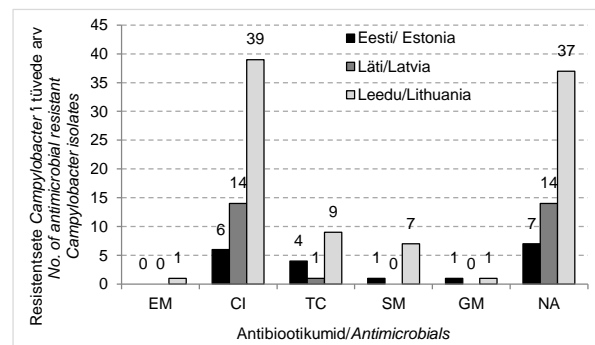
T13057VLTH) raames, kaasati liigilise kuuluvuse määramisel valimisse kuulunud 98 kanaliha päritolu tüve. Käesolevas uuringus ei esinenud olulisi erinevusi ($p > 0,05$) *C. jejuni* ja *C. coli* resistentsusfenotüüpide vahel. Tulemuses selgus, et kokku 36 isolaati (36,7%) osutus tundlikuks kõikide testitud antibiootikumide suhtes. Kõige enam esines kampülobakteri isolaatide seas resistentsust tsiprofloksatsiini ja nalidiksiinhappe suhtes ehk ühtekokku 41 isolaati (41,8%) olid fluoro-kinolonide suhtes resistentsed (joonis 3). Võrreldes Eestis teostatud varasemate uuringutega aastatel 2005–2007 (Roasto jt, 2007) ja aastatel 2002–2004 (Praakle-Amin jt, 2007), kui *Campylobacter* spp. resistentsus fluoro-kinolonidele oli vastavalt 74,5% ja 66%, on 2012.–2014. aasta uurimisperioodil see näitaja siiski mõnevõrra madalam. Uuringus leiti, et kokku kaheksa isolaati (8,2%) olid resistentsed tsiprofloksatsiini/tetratsükliini/nalidiksiinhappe suhtes. Kolm isolaati (3,1%) olid resistentsed samaaegselt tsiprofloksatsiini/tetratsükliini/nalidiksiinhappe/streptomütsiini suhtes. Kaks isolaati (2,1%) olid resistentsed nii kombinatsiooni tsiprofloksatsiini/streptomütsiini/nalidiksiinhappe suhtes kui ka ainult tsiprofloksatsiini suhtes.



Joonis 3. Kanaliha *Campylobacter* spp. isolaatide resistentsusprofiilid (Mäesaar jt, 2015). Antibiootikumid: EM – erütromütsiin, CI – tsiprofloksatsiin; TC – tetratsükliin, SM – streptomütsiin, GM – gentamütsiin, NA – nalidiksiinhape
Figure 3. Antimicrobial resistance patterns of *Campylobacter* spp. isolates in chicken meat samples (Mäesaar et al., 2015). Antimicrobial agents: EM – erythromycin, CI – ciprofloxacin, TC – tetracycline, SM – streptomycin, GM – gentamicin, NA – nalidixic acid

Uuringutulemused näitasid, et Eesti, Läti ja Leedu päritolu *Campylobacter* spp. tüvedel oli antibiootikumidele tundlikkus erinev (joonis 4). Eesti ja Läti päritolu *Campylobacter* spp. tüved osutusid tundlikuks vastavalt erütromütsiini ning erütromütsiini/streptomütsiini/gentamütsiini suhtes. Samas resistentsust ühe või mitme antibiootikumi suhtes esines 7 (19,4%) Eesti, 41 (89,1%) Leedu ja 14 (87,5%) Läti päritolu tüvel. Andmete statistilise töötlemise tulemustest järeldati, et *Campylobacter* spp. resistentsust ühe või enama antibiootikumi suhtes esines Eesti päritolu kanalihalt isoleeritud tüvedel oluliselt ($p < 0,05$) vähem kui Leedu või Läti tüvede hulgas. Võrdluseks, Ma jt (2014) uuring näitas, et kõik 259 (100%) uuritud *Campylobacter* spp. isolaati osutusid resistentseks vähemalt ühe antibiootikumi suhtes, ja nendest tüvedest, mis olid isoleeritud umbsoolest, rümpadelt ja kanalihalt, olid 95,7–100%

resistentsed tsiprofloksatsiini suhtes. EFSA (2013) andmetel on murettekitavaks olukorraks *Campylobacter* spp. tüvede kõrge resistentsus tsiprofloksatsiini suhtes. Joonisel 4 selgub, et käesolevas uuringus oli 6 (16,7%) Eesti tüve, 14 (87,5%) Läti ja 39 (84,8%) Leedu tüve resistentsed tsiprofloksatsiini suhtes. Ka nalidiksiinhappe suhtes esines kõrge resistentsus eeskätt Läti (14 tüve, 87,5%) ja Leedu tüvede (37 tüve, 80,4%) seas, millele järgnesid Eesti tüved (7 tüve, 19,4%). Multiresistentsust kolme või enama samasse gruppi mittekuulva antibiootikumi suhtes esines kokku 5 (5,1%) *Campylobacter* spp. tüvel, neist üks (2,8%) Eesti ja neli (8,7%) Leedu päritolu. Eestis teostatud varasemas uuringus aastatel 2002–2003 multiresistentseid isolaate ei tuvastatud (Praakle-Amin jt, 2007), kuid aastatel 2005–2006 osutusid koguni 36 isolaati (27,5%) multiresistentseks (Roasto jt, 2007). Kirjanduse põhjal võib väita, et antibiootikumi resistentsuse kõrge esinemissagedus kanalihalt isoleeritud kampülobakterite seas viitab antibiootikumide pikaajalisele kasutamisele farmi tasandil (EFSA, 2014; Kovalenko jt, 2014; Roasto jt, 2007). See võib kujutada tõsist ohtu inimeste tervisele, sest farmi tasandil võivad resistentsed bakterid jõuda ka lihatoodete tarbimise tasandini. Seetõttu on väga oluline rakendada nii kontrolli kui ohje mehhanisme antibiootikumide kasutamise üle farmi tasandil lindude kasvatamisperioodi ajal.



Joonis 4. Ravimresistentsete *Campylobacter*i tüvede arv pärinedes erinevate riikide kanaliha proovidest (Mäesaar jt, 2015). Antibiootikumid: EM – erütromütsiin, CI – tsiprofloksatsiin, TC – tetratsükliin, SM – streptomütsiin, GM – gentamütsiin, NA – nalidiksiinhape
Figure 4. Number of antimicrobial resistant *Campylobacter* isolates originating from different countries (Mäesaar et al., 2015). Antimicrobial agents: EM – Erythromycin, CI – ciprofloxacin, TC – tetracycline, SM – streptomycin, GM – gentamicin, NA – nalidixic acid

Kokkuvõte ja järeldused

Uurimustulemused näitasid, et Eesti, Läti ja Leedu päritolu linnulihatooded on Eesti jaemüügi tasandil sageli kampülobakteritega saastunud. Võime väita, et võrreldes importtoodetega on Eesti päritolu värskes kanalihalt kampülobakterite levimus ja arvukus madalam. Kuigi kampülobakterite kontaminatsiooni kõrg-hooaeg Eestis on peamiselt soojadel suvekuudel, võib pidada inimeste kampülobakterenteriiiti haigestumise riski kanaliha tarbimisel ebaolulisest kuni keskmiseni, sõltudes sellest, kas tarbida kodumaist või imporditud

toodangut. Selleks, et hoida *Campylobacter* spp. levimus, arvukus ja antibiootikumidele resistentsus võimalikult madal, on oluline ohje meetmete efektiivne rakendamine kogu kanaliha tootmise ahelas alates farmist kuni tarbimiseni.

Autorid kinnitavad artikliga seotud huvide konflikti puudumist. The authors declares that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Tänuavaldused

Uurimustööd finantseeriti Põllumajandusministeeriumi rakendusuringute projektist "*Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* ja verotoksilise *Escherichia coli*-ga seonduvate toiduohutuse riskide hindamine Eestis" (leping nr T13057VLTH); Eesti Teadusagentuuri grandiprojektist 9315.

Kasutatud kirjandus

- Bunevičienė, J., Kudirkienė, E., Ramonaitė, S., Malakauskas, M. 2010. Occurrence and numbers of *Campylobacter* spp. on wings and drumsticks of broiler chickens at the retail level in Lithuania. – Veterinarija ir Zootechnika, 72, 9–14.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. – EFSA Journal 2014, 12(2), 3547.
- EFSA, European Food Safety Authority. 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.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2011. Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. – EFSA Journal 2011, 9(4), 2105.
- EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2013a: Antimicrobial wild type distribution of microorganisms. *C. jejuni*. <http://217.70.33.99/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=204>
- EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2013b: Antimicrobial wild type distribution of microorganisms. *C. coli*. <http://217.70.33.99/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=205>
- Calciati, E., Lafuente, S., De Simó, M., Balfagon, P., Bartolomé, R., Caylà, J. 2012. A *Campylobacter* outbreak in a Barcelona school. – Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 30, 223–224.
- Hansson, I., Plym Forshell, L., Gustafsson, P., Boqvist, S., Lindblad, J., Olsson Engvall, E., Andersson, Y., Vagsholm, I. 2007. Summary of the Swedish *Campylobacter* program in broilers, 2001 through 2005. – Journal of Food Protection, 70(9), 2008–2014.
- Horrocks, S.M., Anderson, R.C., Nisbet, D.J., Ricke, S.C. 2009. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. – Anaerobe, 15, 18–25.
- ISO 10272-1, 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method.
- ISO 10272-2, 2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 2: Colony-count technique.
- Jakopanec, J., Borgen, K., Vold, L., Lund, H., Forseth, T., Hannula, R., Nygård, K. 2008. A large waterborne outbreak of campylobacteriosis in Norway: The need to focus on distribution system safety. – BMC Infectious Diseases, 8 (128), 1–11.
- Katzav, M., Isohanni, P., Lund, M., Hakkinen, M., Lyhs, U. 2008. PCR assay for the detection of *Campylobacter* in marinated and non-marinated poultry products. – Food Microbiology, 25, 908–914.
- Keener, K.M., Bashor, M.P., Curtis, P.A., Sheldon, B.W., Kathariou, S. 2004. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. – Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3, 105–116.
- Kovalenko, K., Roasto, M., Liepinš, E., Mäesaar, M., Hörman, A. 2013. High occurrence of *Campylobacter* spp. in Latvian broiler chicken production. – Food Control, 29, 188–191.
- Kovalenko, K., Roasto, M., Šantare, S., Bērziņš, A., Hörman, A. 2014. *Campylobacter* species and their antimicrobial resistance in Latvian broiler chicken production. – Food Control, 46, 86–90.
- Ma, L., Wang, Y., Shen, J., Zhang, Q., Wu, C. 2014. Tracking *Campylobacter* contamination along a broiler chicken production chain from the farm level to retail in China. – International Journal of Food Microbiology, 181, 77–84.
- Mazick, A., Ethelberg, S., Møller Nielsen, E., Mølbak, K., Lisby, M. 2006. An outbreak of *Campylobacter jejuni* associated with consumption of chicken, Copenhagen, 2005. – Euro Surveillance, 11(5), 137–139.
- Meremäe, K., Elias, P., Tamme, T., Kramarenko, T., Lillenberg, M., Karus, A., Hänninen, M.-L., Roasto, M. 2010. The occurrence of *Campylobacter* spp. in Estonian broiler chicken production in 2002–2007. – Food Control, 21(3), 272–275.
- Mäesaar, M., Praakle, K., Meremäe, K., Kramarenko, T., Sögel, J., Viltrop, A., Muutra, K., Kovalenko, K., Matt, D., Hörman, A., Hänninen, M.-L., Roasto, M. 2014. Prevalence and counts of *Campylobacter* spp. in poultry meat at retail level in Estonia. – Food Control, 44 (22), 72–77.
- Mäesaar, M., Kramarenko, T., Meremäe, K., Sögel, J., Lillenberg, M., Häkkinen, L., Ivanova, M., Kovalenko, K., Hörman, A., Hänninen, M.-L., Roasto, M. 2015. Antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter* spp. isolated from broiler chicken meat of Estonian, Latvian and Lithuanian origin at Estonian

- retail level and from patients with severe enteric infections in Estonia. – *Zoonoses Public Health*, Jun. 6, 1–8.
- Praakle-Amin, K., Roasto, M., Korkeala, H., Hänninen, M.-L. 2007. PFGE genotyping and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* in retail poultry meat in Estonia. – *International Journal of Food Microbiology*, 114, 105–112.
- Rautelin, H., Hänninen, M.-L. 2000. *Campylobacters*: the most common bacterial enteropathogens in the Nordic countries. – *Annals of Medicine*, 32, 440–445.
- Roasto, M., Hörman, A., Meremäe, K., Kramarenko, K., Mäesaar, M. 2015. Food safety risk assessment of *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes* and Shiga toxin producing *Escherichia coli* in Estonia. Ministry of Agriculture applied study, Estonian University of Life Sciences, Institute of Veterinary Medicine And Animal Sciences, Department of Food Hygiene. pp. 6–57 (in Estonian).
- Roasto, M., Meremäe, K., Praakle-Amin, K., Hörman, A., Elias, T., Lillenberg, M., Elias, A., Kramarenko, T., Häkkinen, L., Pöltsama, P., Mäesaar, M., Elias, P., Hänninen, M.-L. 2011. *Campylobacter* spp. in Estonian food chain in 2000–2010. – *Agraarteadus*, 22(1), 31–39 (in Estonian).
- Roasto, M., Juhkam, K., Tamme, T., Hörman, A., Häkkinen, L., Reinik, M., Karus, A., Hänninen, M.-L. 2007. High level of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chickens in Estonia in 2005 and 2006. – *Journal of Food Protection*, 70(8), 1940–1944.
- Rosenquist, H., Boysen, L., Galliano, C., Nordentoft, S., Ethelberg, S., Borck, B. 2009. Danish strategies to Control *Campylobacter* in broilers and broiler meat: facts and effects. – *Epidemiology and Infection*, 137, 1742–1750.
- Rosenquist, H., Nielsen, N.L., Sommer, H.M., Norrung, B., Christensen, B.B. 2003. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. – *International Journal of Food Microbiology*, 83, 87–103.
- Saleha, A.A. 2004. Epidemiological study on the colonization of chickens with *Campylobacter* in broiler farms in Malaysia: possible risk and management factors. – *International Journal of Poultry Science*, 3(2), 129–134.
- Smith, J.L., Drum, D.J.V., Dai, U., Kim, J.M., Sanchez, S., Maurer, J.J., Hofacre, C.L., Lee, M.D. 2007. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. – *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1404–1414.
- Stern, N.J., Robach, M.C. 2003. Enumeration of *Campylobacter* spp. in broiler feces and in corresponding processed carcasses. – *Journal of Food Protection*, 66, 1557–1563.
- Suzuki, H., Yamamoto, S. 2009. *Campylobacter* contamination in retail poultry meats and by-products in the world: a literature survey. – *Journal of Veterinary Medicine and Science*, 71, 255–261.
- Taylor, E.V., Herman, K.M., Ailes, E.C., Fitzgerald, C., Yoder, J.S., Mahon, B.E., Tauxe, R.V. 2013. Common source of *Campylobacter* infection in the USA, 1997–2008. – *Epidemiology and Infection*, 141, 987–996.
- Travers, K., Barza, M. 2002. Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. – *Clinical Infectious Diseases*, Jun., 1(34), 131–134.
- Wang, G., Clark, C.G., Taylor, T.M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L.W.D.L., Rodgers, G. 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. – *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12), 4744–4747.
- Wingstrand, A., Neimann, J., Engberg, J., Nielsen, E.M., Gerner-Smidt, P., Wegener, H.C., Molbak, K. 2006. Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis, Denmark. – *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 280–284.

The prevalence, counts and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* spp. in fresh chicken meat at Estonian retail level

Kadrin Meremäe¹, Mihkel Mäesaar^{1,2}, Toomas Kramarenko^{1,2}, Liidia Häkkinen², Mati Roasto¹

¹ Estonian University of Life Sciences, Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Fr. R. Kreutzwaldi 56/3, 51014 Tartu, Estonia

² Estonian Veterinary and Food Laboratory, Kreutzwaldi 30, Tartu 51006, Estonia

Summary

The main aim of the present study is to give an overview about the prevalence, counts and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp. in fresh chicken meat at the Estonian retail level in 2012–2014. The detection and enumeration of *Campylobacter* spp. were carried out in accordance with the methods of EVS-EN ISO 10272-1:2006 and ISO/TS 10272-2:2006(E). Conventional multiplex PCR assay was used for identification and differentiation of *Campylobacter* species according to the method described in Wang *et al.* (2002). The VetMIC Camp method (National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden) was used in order to test 96 *Campylobacter* isolates against erythromycin, ciprofloxacin, tetracycline, streptomycin, gentamicin and nalidixic acid for MICs. Findings showed that *Campylobacter* spp. are widely present in fresh chicken meat at Estonian retail level. Table 1 shows the prevalence and total counts of *Campylobacter* spp. in chicken meat samples in 2012. *Campylobacter* spp. was isolated in 77 (35%) of 220 chicken meat samples. Altogether, 24 (20.3%) of Estonian origin, 41 (50%) of Lithuanian origin and 12 (60%) of Latvian origin investigated chicken meat samples were positive for *Campylobacter* at retail level. The highest total counts of *Campylobacter* spp., on

average 2600 CFU g⁻¹, were detected in the chicken meat samples of Lithuanian origin followed by on average 1600 CFU g⁻¹ and 660 CFU g⁻¹ in samples of Latvian and Estonian origin, respectively. Figure 1 shows the results of *Campylobacter* spp. enumeration in fresh chicken meat, which indicated that more than 1000 CFU g⁻¹ contained a total of 2 (1.7%) of Estonian, 12 (14.6%) of Lithuanian and 7 (35%) of Latvian origin products. Figure 2 gives an overview about the seasonality of *Campylobacter* spp. contamination on fresh chicken meat of Estonian (EST) and Lithuanian (LT) origin in 2012. High occurrence of *Campylobacter* spp. contamination was observed from June to September. *C. jejuni* was the most frequently (89%) isolated species followed by *C. coli* (11%). A total of 36 isolates (36.7%) of 98 were susceptible to all the tested antimicrobials. The highest proportion of isolates (41 isolates, 41.8%) was resistant to fluoroquinolones. Multiresistance, resistance to three or more unrelated antimicrobials, was detected in 5 (5.1%) isolates. Antimicrobial resistance phenotype of *Campylobacter* spp. isolates in chicken meat samples are shown in Figure 3.

A total of eight (8.2%) isolates were resistant to ciprofloxacin/tetracycline/nalidixic acid. A total of

three (3.1%) isolates were resistant ciprofloxacin/tetracycline/streptomycin/nalidixic acid. The combination of ciprofloxacin/streptomycin/nalidixic acid appeared in two (2.1%) isolates. The number of antimicrobial resistant *Campylobacter* isolates originating from different countries has shown in Figure 4, which showed that the antimicrobial resistance was less prevalent among *Campylobacter* isolates of Estonian origin compared to Lithuanian or Latvian origin. Resistance to one or more antimicrobials was detected in 7 (19.4%) of Estonian, 41 (89.1%) of Lithuanian and 14 (87.5%) of Latvian origin *Campylobacter* spp. isolates of chicken meat. In conclusion, compared to fresh chicken meat of Lithuanian and Latvian origin, the prevalence, counts and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in chicken meat of Estonian origin were lower. Therefore, we suppose that the risk of occurrence of *Campylobacter* human infection by consuming domestic fresh chicken meat is lower than for imported chicken meat. It is important to improve and strictly follow biosecurity, hygiene and other control measures in the whole chicken production chain for reducing the prevalence and counts of *Campylobacter* spp. in chicken meat.