

# TERMOFIILSETE KAMPÜLOBAKTERITE UURINGUD EESTIS 2000–2010

Mati Roasto<sup>1\*</sup>, Kadriin Meremäe<sup>1</sup>, Kristi Praakle-Amin<sup>1</sup>, Ari Hörman<sup>3</sup>, Terje Elias<sup>1</sup>, Merike Lillenberg<sup>1</sup>, Andres Elias<sup>1</sup>, Toomas Kramarenko<sup>2</sup>, Liidia Häkkinen<sup>2</sup>, Piret Põltsama<sup>2</sup>, Mihkel Mäesaar<sup>2</sup>, Priit Elias<sup>1</sup>, Marja-Liisa Hänninen<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Eesti Maaülikool, veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut, Kreutzwaldi 62, 51014 Tartu, e-mail: [mati.roasto@emu.ee](mailto:mati.roasto@emu.ee)

<sup>2</sup>Veterinaar- ja Toidulaboratoorium, Kreutzwaldi 30, 51006 Tartu

<sup>3</sup>Soome Kaitseväge, PL 919, 00131 Helsingi

<sup>4</sup>Helsingi Ülikool, loomaaarstiteaduskond, toiduhügieeni ja keskkonnatervise osakond, Agnes Sjöbergin katu 2, P.O. Box 66, 00014 Helsingi, Soome

**ABSTRACT.** This article summarizes research within *Campylobacter* spp. in Estonian food chain in 2000 to 2010 in Estonia and Mati Roasto's PhD thesis: *Campylobacter* spp. in poultry and raw poultry meat products in Estonia with special reference to subtyping and antimicrobial susceptibility. Proportion of *Campylobacter* positive samples on fresh chicken meat was 11.2% in 2000 to 2010 in Estonia. Analysis of seasonality of *Campylobacter* positive samples indicated that the seasonal peak of *Campylobacter* on chicken meat was from June to October. Studies showed high serotype and genotype diversity among *Campylobacter* isolates from raw retail poultry meat in Estonia. The serotype distribution did not show association with the origin of the sample. The genotyping of the 70 *Campylobacter* isolates showed *KpnI* to be more discriminatory, yielding 34 PFGE types compared to 29 obtained by *SmaI*. PFGE with the enzymes *KpnI* and *SmaI* for digestion proved to be discriminatory, repeatable and reproducible. In our study the majority of the isolates sharing a similar PFGE genotype originated from one country. Antimicrobial susceptibility studies of *Campylobacter* strains resulted in high resistance patterns for several antimicrobials. High MICs of both erythromycin and ciprofloxacin pose a problem and because erythromycin is considered as a first-line choice of treatment for human *C. jejuni* infections, the resistance has an important public health impact. Multidrug resistance in Estonian broiler chicken isolates was one of the highest reported in latest studies of broiler chicken *Campylobacter* isolates all over the world. Our findings in 2005 and 2006 suggest that the use of fluoroquinolones may select multiresistant strains since resistance to erythromycin, gentamicin or oxytetracycline was exceptional without simultaneous resistance to fluoroquinolones.

**Keywords:** *Campylobacter jejuni*, Contamination, Broiler chicken meat, Susceptibility to antimicrobials, Molecular typing

## Sissejuhatus

*Campylobacter* spp. on paljudes riikides põhiline inimeste bakteriaalsete enteraalsete haigestumiste põhjustaja. Euroopa ja kogu maailma industriaalriikides on inimestel kampülobakteritest põhjustatud haigestumuste

arv pidevalt suurenenud ning mitmete kirjandusallikate andmeil ületab kampülobakterite leid soolestiku talitlushäirete puhul sageli patogeensete ešerihhiate, šigelade ja salmonellade leiu. Ameerika Ühendriikides registreeritakse inimestel igal aastal ligikaudu 2.5 miljonit kampülobakterioosi juhtumit ja Euroopa Liidu liikmesriikides üle kaheksa tuhande ametlikult registreeritud/tõestatud haigusjuhtumi (Friedman *et al.*, 2000; Hänninen *et al.*, 2003; Bhaduri ja Cottrell, 2004; Rosenquist *et al.*, 2009; EFSA 2010). Perekond *Campylobacter* esindajad kuuluvad sugukonda *Campylobacteraceae* ja tänapäeval on teada 17 kampülobakterite liiki ning 6 alamliiki (Euzéby, 2006). Inimeste maosoletrakti infektsioonidega on kõige rohkem seotud *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsalaensis* ja *C. hyointestinalis* ning ühtekokku 12 kampülobakterite liiki on inimestele patogeensed (Hänninen *et al.*, 2000; Gorkiewicz *et al.*, 2002; Abbott *et al.*, 2005). Enamik termofiilsete kampülobakteritega seonduvatest infektsioonidest on põhjustanud *C. jejuni* ja *C. coli*. Kuigi enamasti on tegemist iseenesest mööduva kõhulahtisusega, võivad nad inimestel esile kutsuda ka raske haigestumise, pikaajalise töövõimetuse ja mõnikord võib kampülobakterioos või sellest põhjustatud sekundaarne infektsioon lõppeda inimese surmaga. Patsiendid, keda on tabanud *C. jejuni* või *C. coli* infektsioon, võivad haigestuda nii sümptomaatilisel kui põdeda haigust asümptomaatilisel. Termofiilsetest kampülobakteritest põhjustatud infektsiooni sümptomid on kõrge palavik, kõhuvalu ja kõhulahtisus, mis on sageli verine. Haigusele iseloomulikke sümptomeid võib täheldada mitme päeva kuni mitme nädala jooksul. Sooletrakti välise infektsioonina või kroonilise järelhaigusena võivad tekkida bakterieemia, artriidid, bursiidid, meningiit, endokardiit, peritoniit, pankreatiit, kuseteede infektsioonid, abort, neonataalne sepsis. Tuhande intestinaalinfektsiooni kohta esineb bakterieemiat pooleteisel korral ja kõrgeim tõenäosus haigestuda on vanematel inimestel. Immuunpuudulikkusega patsientidel võivad esineda püsiv kõhulahtisus ja bakterieemia ning nende ravi võib osutuda väga raskeks. *C. jejuni* on ka arvatavasti Guillain-Barre sündroomi (GBS) põhjustajaks, mis iseloomustub perifeerse närvisüsteemi paraluütilise kahjustusega ehk osalise halvatusena. Hinnanguliselt umbes ühel kolmandikul Guillain-Barre sündroomiga patsientidel tekivad vastavale haigusele omased sümptomid üks kuni kolm nädalat pärast *C. jejuni* põhjustatud enteriiti. Kampülobakteritest tingitud haigu-

sed esinevad peamiselt sporaadiliste juhtudena, enamasti suvel ja on põhjustatud eeskätt toiduainete ebapiisavast kuumtöötlemisest. Suuremad haiguspuhangud on alguse saanud haigustekitajatega saastunud joogivee, toorpiima ja linnuliha tarbimisest (Frost *et al.*, 2002; Hänninen ja Kärenlampi 2004; Kuusi *et al.*, 2005). Linnuliha on kõige suurem tähtsus toidupõhise kampülobakterioosi tekkes ja seda on tõestanud mitmed teadusuuringud (Domingues *et al.*, 2002; Schönberg-Norio *et al.*, 2004; Wingstrand *et al.*, 2006; EFSA 2009; Rosenquist *et al.*, 2009). Potentsiaalseteks nakkusallikateks tuleb lugeda ka teisi tooreid ja loomse päritoluga toitu (Schönberg-Norio *et al.*, 2004; Stafford *et al.*, 2006). Käesolev artikkel annab ülevaate Mati Roasto doktori tööst (Roasto 2008), mille koostamise käigus selgitati kampülobakterite esinemist Eestis kodulindudel ja tooretel linnulihatoodetes; teostati isoleeritud kampülobakterite tüvede sero- ja genotüüpiseerimine ning määrati *Campylobacter* spp. tüvede tundlikkus antibiootikumidele. Täiendavalt antakse ülevaate viimastel aastatel läbi viidud termofiilsete kampülobakterite uuringutest Eestis.

### Metoodika

Uuritav materjal oli põhiliselt nii Eestis toodetud, aga ka Eestisse imporditud toored linnulihatooted. Antibiootikumidele tundlikkuse määramiseks valitud tüved pärinesid linnuliha ja broilerite umsoole proovidest.

Uuringute tegemiseks koguti ja analüüsiti aastatel 2000–2010 ühtekokku 1,965 broilerilihaproovi ning 1,302 umsoolesisaldise-/fekaalproovi. Linnulihaproovid analüüsiti Eesti Maaülikooli toiduhügieeni osakonnas, Veterinaar- ja Toidulaboratooriumis ning Helsingi Ülikooli toiduhügieeni ja keskkonnatervise osakonnas. Broileritelt pärit umsoolesisaldise ja fekaalproovid analüüsiti Eesti Maaülikooli toiduhügieeni osakonna laboratooriumis. Toore linnuliha proovid asetati vedelikukindlasse steriilsesse kilekotti ning transportimiseks kasutati külmakotti, kus temperatuur oli ligikaudu +7°C. *Campylobacter* spp. avastamiseks kasutati NMKL meetodit (NMKL Method, vol. 119), mis sisaldab eelrikastamist Prestoni puljongis. Proov (25 g) kaaluti, asetati steriilsesse kilekotti ning lisati 250 ml Prestoni rikastuspuljongit (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England). Proove muljuti ja loksutati 60 sekundi jooksul. Uuritav materjal valati steriilsesse Shotti söötmepudelis, mis suleti õhukindlalt ja inkubeeriti mikroaeroobsetes tingimustes temperatuuril  $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$  24 tundi. Rikastussöötmetest külvati materjal 10 µl aasaga selektiivagarile (CCDA, *Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar*, Oxoid). Petri tassid inkubeeriti mikroaeroobsetel anaerostaadis, millesse paigutati kampülobakterite optimaalseks kasvuks vajaminevat gaasilist keskkonda tootvad reagentide kotid (CampyGen™, Oxoid). Inkubeerimine toimus temperatuuril  $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$  juures 48 tundi. Kampülobakterite tüüpilised pesad külvati puhaskultuuri saamiseks *Brucella* agarile ehk antibiootikumivabale *Campylobacter* söötmele (Oxoid). Tasse inkubeeriti mikroaeroobsetes tingimustes tempe-

ratuuril  $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$  24 tundi. Kontrolltüveks oli kõikide analüüsietappide juures *C. jejuni* ATCC 29428. Pärast *Brucella* agaril inkubeerimist tehti kinnitustestid. Liikuvust määrati faas-kontrast mikroskoobi abil. *Brucella* agaril kasvavast värskest külvist võeti baktermass, mis segati peptoonpuljongiga (kampülobakterid kaotavad vees kiiresti liikumisvõime) ning mikroskoobiga tehti kindlaks bakterite liikuvus. Kampülobakterid liikusid kiirete pöörlevate liigutustega. Oksüdaastest tehti komertsiaalsete oksüdaas-tikkudega (Oxoid). Katalaastest viidi läbi 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ga. Termofiilsete kampülobakterid on oksüdaas- ja katalaaspositiivsed. Täiendavalt tehti värvimine Grami järgi, mis kampülobakterite puhul oli negatiivne. Kampülobakterid olid väikesed S- või V-kujuliselt kõverdunud kepid (sageli meenutavad lendavat kajakat). Kontrolliti kasvu esinemist aeroobsetes tingimustes: veriagarile (Oxoid) kanti CCDA agarilt tüüpilised pesad ning inkubeeriti temperatuuril 37°C 24 tundi. Kampülobakterite puhul kasv aeroobsetes tingimustes puudus. Biokeemiline identifitseerimine tehti kampülobakterite tüvede liigilise koosluse määramise eesmärgil. Teostati hipuraat-test ja nalidiksiinhappe tundlikkuse test. Hipuraatide hüdroolüüs: aasatais kampülobakterite kolooniaid emulgeeriti 0.4 ml naatriumhipuraadi lahuses ning inkubeeriti termostaatkapis üleöö temperatuuril 37°C. Lahust segati ning seejärel lisati ettevaatlikult (segunemise vältimiseks) 0.2 ml nin-hüdrini lahust ja inkubeeriti vesivannil kümme minutit. Positiivse reaktsiooni korral muutus lahus tumesiniseks ja negatiivse reaktsiooni korral helesiniseks. *C. jejuni* andis positiivse reaktsiooni ning *C. coli* ja *C. lari* negatiivse reaktsiooni. *Brucella* agaril säilitati külve umbes ühe nädala jooksul temperatuuril +4°C mikroaeroobses keskkonnas. Puhaskultuur (vähemalt üks koloonia igast positiivsest proovist) säilitati glütserooli puljongis (15% [v/v] glütserooli 1%-ses [w/v-mahukaal] proteoos-peptoonis) temperatuuril -70°C. Värsked umsoolesisaldiseproovid võeti tapamajas broilerite algtootlemise liinilt. Proovimaterjal võeti umsoolest steriilses 10 µl külviaasaga ja asetati seejärel tuubi, mis sisaldas 10 ml Preston rikastuspuljongit (Oxoid, Basingstoke, UK). Proovidega tuubid asetati külmakasti +4°C juurde ja toimetati laborisse nii kiiresti kui võimalik. Analüüsides alustati proovivõtmisega samal päeval ja esimene etapp oli proovimaterjaliga tuubide asetamine termostaatkappi, kus neid inkubeeriti mikroaeroobsetes tingimustes 42°C juures 24 tundi. Fekaalproovide analüüsi järgnevad etapid kattuvad eespool esitatud linnuliha-proovide laboratoorse analüüsidesga.

*Campylobacter jejuni* serogruppide määramisel passiivse hemaglutinatsiooni meetodiga (Denka Seiken Co., LTD, Jaapan) koosnes analüüsimine neljast etapist: sensibiliseeritud bakteriaalse antigeeni lahuse valmistamisest, fikseeritud punaliblede ettevalmistamisest, sensibiliseeritud rakkude ettevalmistamisest ja passiivsest hemaglutinatsioonireaktsioonist ehk PHA-testist (*passive hemagglutination*).

*Campylobacter jejuni* ja *Campylobacter coli* DNAtüüpiseerimine tehti, kasutades pulseeriva välja geel-elektroforeesi (PFGE). PFGE analüüsiks kasvatati sü-

gavkülmast võetud kampülobakterite isolaate ühe ööpäeva jooksul *Brucella* agaril (Oxoid) ning seejärel tehti ümberkülv *Brucella* agarile ning plaate inkubeeriti ööpäeva jooksul mikroaeroobsetes tingimustes temperatuuril 37°C. Endogeense nukleaasi inaktiveerimiseks töödeldi bakterirakud formaldehüüdiga ning DNA valmistati ette varasemalt avaldatud meetodikatele (Maslow *et al.*, 1993; Hänninen *et al.*, 1998) kirjeldatu kohaselt. DNA lõhustati *SmaI* ja *KpnI* ensüümidega 20 ühikut proovi kohta (New England Biolabs Inc.). DNA fragmendid eraldati 1%-ses agarosgeelis, mis asetati 0.5 X TBE puhvrisesse (45 mmol Tris, 45 mmol boorhape, 1 mmol EDTA) 200 V juures ning restriksiooni fragmendid eraldati 19 tunni jooksul pulsatsioonisagedustega 1–30 sekundit ja 1–25 sekundit, vastavalt ensüümile (*SmaI* ja *KpnI*). DNA fragmentide eraldamiseks kasutati *Gene Navigator* aparati (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden). Genotüüpide hindamisel kasutati arvutipõhist tarkvara (*BioNumerics*, versioon 3.0; *Applied Maths*, Kortrijk, Belgia) ning visuaalset analüüsi. Omavahel tihedalt seotud genotüüpideks loeti genotüübid, mis erinesid üksteisest 1–3 fragmendi võrra.

Tundlikkuse määramiseks antibakteriaalsete ainete suhtes kasutati aastatel 2002 ja 2003 kogutud isolaatide puhul Kirby-Baueri disk-difusiooni meetodit ning epsilomeeter testi (*E-test*, AB Biodisk, Solna, Sweden) ning hinnati inhibitsioonitsooni ulatust. Aastatel 2005 ja 2006 ja hiljem kogutud tüvede antibiootikumide tundlikkuse määramisel kasutati minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramise VetMIC™-testi (*National Veterinary Institute; Uppsala, Sweden*). Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramine toimus Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi tööjuhendi alusel (Tööjuhend 4DB-TJ-16, 2005). Antibiootikumidele tundlikkuse määramisel kasutati kontrolltüvena *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni (MIC) määramise töökäik koosnes erinevatest etappidest, millest olulisemad olid sügavkülmutatud tüvede väljakülvid *Brucella* agarile; bakttersuspensioonide valmistamine; bakttersuspensioonide külvamine VetMIC™ mikroplaatidele; bakttersuspensioonide puhtuse ja tiheduse kontroll ja MIC arvu määramine. Resistentuse määramisel, kasutades Kirby-Baueri disk-difusiooni meetodit ja epsilomeeter-testi, kasutati järgnevaid inhibitsiooni tsooni diameetreid (mm) ja MIC tundlikkuse piire: ampitsilliin  $\leq 13$  mm ja MIC  $\geq 32$  µg/ml, tsiprofloksatsiin  $\leq 26$  mm ja MIC  $\geq 4$  µg/ml, erütromütsiin  $\leq 26$  mm ja MIC  $\geq 32$  µg/ml, gentamütsiin  $\leq 12$  mm, nalidiksiinhape  $\leq 26$  mm ja tetratsükliin  $\leq 31$  mm ja MIC  $\geq 16$  µg/ml (CLSI, 2004). Aastatel 2005 ja 2006 kasutati VetMIC™ testi ja isoleeritud *Campylobacter* tüvede antibiootikumidele tundlikkuse määramisel kasutati järgnevaid MIC tundlikkuse piire: ampitsilliin 32 µg/ml, enrofloxatsiin 1 µg/ml, erütromütsiin 16 µg/ml, gentamütsiin 8 µg/ml, nalidiksiinhape 32 µg/ml ja oksütetratsükliin 4 µg/ml (Tööjuhend 4DB-TJ-16, 2005). Kampülobakterite levimuse näitajate statistilisel töötlemisel kasutati Hii-ruut testi. Antibiootikumidele tundlikkuse määramise andmed registreeriti, kasutades MS Excel 2003 tarkvara (Microsoft Corpora-

tion; Redmond, WA, USA), ja andmete statistiline analüüs tehti tarkvarapaketi SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences 13.0 for Windows, SPSS Inc.; Chicago, IL, USA). Iga katseobjekti (resistentne või multiresistentne *Campylobacter* isolaat) tarvis määrati resistentsus binaarsel skaalal eraldi kõigi kuue antibiootikumi suhtes. Multiresistentsus defineeriti kui samaaegne resistentsus kolme või enama sõltumatu antibiootikumi suhtes. Uurimaks paarikaupa seoseid üksikute resistentsuste vahel ning seoseid üksikute resistentsuste ja multiresistentsuse vahel, hinnati Spearmani astakorrelatsioonikordajate ning šansside suhete väärtused. Antibiootikumidele resistentsuse tasemete võrdlemisel multiresistentsete ja mitte multiresistentsete tüvede vahel kasutati Mann-Whitney testi.

## Tulemused ja arutelu

### Linnuliha toodete saastatus

Aastatel 2000 ja 2002 uuriti doktoritöös 279 värsket linnuliha proovi, millest 90 koguti Eesti väikese võimsusega ning 189 suure võimsusega lihakäitlemise ettevõtte toodangust. Eesti suure võimsusega lihakäitlemise ettevõtte toodangu proovid koguti Tartu linna turgudel. Kõikide antud perioodil kogutud proovide näol oli tegemist jahutatud toodetega, mida säilitati +4°C kuni +7°C juures. Aastatel 2000 ja 2002 võrreldi suure võimsusega Eesti lihakäitlemisettevõtte ning väikese võimsusega Eesti lihakäitlemisettevõtte linnuliha toodete saastatus termofiilsete kampülobakteritega. Analüüsi tulemused näitasid, et saastumise protsendid olid vastavalt 6.3% ja 35.6% ning seega oli Eesti väikese võimsusega lihakäitlemisettevõtte toodang võrreldes Eesti suure võimsusega lihakäitlemisettevõtte linnuliha toodanguga oluliselt ( $P < 0.001$ ) rohkem saastunud. Suure võimsusega käitlemisettevõtetel olid heade tootmistavade rakendamiseks paremad tingimused ning rakendati efektiivseid kvaliteedi kontrollimise programme. Kõrged kontaminatsiooninäitajad Eesti väikese võimsusega käitlemisettevõtte toodangus olid seotud toodete mitmete ristsaastumisvõimalustega. Ristsaastumise näitena võiks esitada rümpade automaatsete jahutusüsteemide asemel kasutatud ebahügieenilised jahutusveevannid, mis võimaldasid saastunud jahutusvee kaudu mikroobse kontaminatsiooni levikut. Eelneva tõestamiseks võeti uurimise käigus väikese võimsusega käitlemisettevõtetest rümpade loputusvee proovid ning laboratoorse analüüsi tulemusena selgus, et kõik proovid ( $n = 10$ ) olid termofiilsete kampülobakteritega saastunud. Lisaks eeltoodule oli väikese võimsusega käitlemisettevõtetes hügieeni-probleemiks ka manuaalsete protseduuride kasutamine automaatsete süsteemide asemel. Eesti suure võimsusega linnuliha käitlemisettevõtte omanduses olid mitmed linnufarmid ning head hügieenitavad kasutusel nii farma-, tapamaja- kui tootmise tasandil. Vesijahutuse asemel õhkjahutuse kasutamine tapamajades võimaldab oluliselt alandada jahutatud linnuliha toodete saastumise määra enterobakteritega (Sanchez *et al.*, 2002; Rosenquist *et al.*, 2003). Efektiivsete kvaliteedikontrolliprogrammide ning rümpade õhkjahutuse kasutamine või-

maldab oluliselt vähendada kontaminatsiooni kampülobakteritega, mida ilmekalt tõestavad ka antud uurimuse tulemused. Antud perioodil läbi viidud uuringus leiti samuti, et broilerite rümbad ja tiivatükid osutusid oluliselt ( $P < 0.001$ ) rohkem saastunuks (28% ja 31.3%) kui broilerite rinna- ja kintsutükid (0% ja 0%). Tiivatükidel on nahapind kurrulisem ja sulefolliikulid suuremad, mis loob bakteritele loputamise järel nahapinnale püsijäämiseks soodsamad võimalused. Avatud sulefolliikulid, nahakurrud ja -kriimustused võimaldavad kampülobakteritel nahapinnale kinnituda ning püsima jääda ka pärast intensiivset rümpade loputamist (Chantarapanont *et al.*, 2003). Folliikulite sulgumisel jahutamisprotseduuri jooksul on tõenäoline, et folliikulitesse jäävad püsima ka mõned sinna eelnevalt sattunud mikroorganismid.

Aastatel 2002 ja 2003 uuriti kokku 630 linnuliha-proovi. Eesti päritoluga toodete proove oli 416 (66%) ning importtoodangu proove 214 (34%). Laboratoorseks uurimiseks võeti erinevaid jahutatud ja külmutatud linnulihatoodeteid: kanarümbad, -tiivad, -hakkliha, rinna- ja kintsutükid ning kalkunikoivad. Eesti päritolu toodetest osutus kampülobakterite suhtes positiivseteks 36 proovi (8.7%) ning importtoodetest 34 (15.9%). Eesti päritoluga tooted olid jahutatud ning välismaise päritoluga tooted külmutatud. Külmutamise protsessis kampülobakterid enamasti hukuvad, mõned saavad subletaalseid kahjustusi, kuid säilitavad eluvõime. Kampülobakteritele subletaalseid kahjustusi põhjustavad tegurid on madal temperatuur, osmootne stress ning toitainete puudus (Humphrey, 1994). Külmutatud importtoodete kõrgemad saastumise näitajad võrreldes Eesti päritolu jahutatud linnulihatoodetega, on tingitud tõenäoliselt kõrgest algkontaminatsioonist. Mida kõrgem on linnuliha bakteritega algsaastatus, seda tõenäosem on, et külmutõõtlemine ei hävita kõiki kampülobaktereid. Eesti jahutatud linnulihatoodete saastumise protsent (9.1%) on madalam kui enamikus arenenud riikides, kus kontaminatsiooni näitajad ulatuvad isegi üle viiekümne protsendi (Dominguez *et al.*, 2002). Toore ja külmutatud linnuliha ostmine jaekaubandusest ning selle tarbimine pärast ebapiisavat kuumtõõtlemit on oluline riskifaktor spo-

raadilise *Campylobacter* infektsiooni tekkes (erinevuse määr = 2.42;  $P = 0.042$ ) (Kapperud *et al.*, 1992).

Efektiivsete kvaliteedikontrolliprogrammide ning tapamajades rümpade õhkjahutuse rakendamine tingib madalama kampülobakteritega saastumise, mida tõestavad ka antud uurimistöö tulemused. Võrreldes Eesti toodetega olid importtooted rohkem saastunud ning, tuginedes eeltoodud tulemuste analüüsile, võib kinnitada, et kodumaiste linnulihatoodete tarbimine on ohutum, kasjuures tõhustada tuleb importtoodete ja nende tootjate kontrolli.

Aastatel 2005 ja 2006 koguti ja analüüsiti kokku 716 Eesti päritolu jahutatud broileriliha proovi. Termofiilsete kampülobakterite suhtes osutus positiivseks 45 proovi (6.3%). Kõige rohkem saastunud proove esines juulist oktoobrini, mil uuriti 386 proovi ja kampülobakterite suhtes osutus positiivseteks neist 37 (9.6%). Ülejäänud kuudel kogutud proovide analüüsimisel selgus, et linnulihaproovide saastumine termofiilsete kampülobakteritega oli väga madal või ei esinenud kampülobaktereid uuritud proovides üldse.

*Campylobacter* spp. esinemise tulemused Eesti broileriliha proovides aastatel 2000–2010 on esitatud tabelis 1. Selgub, et ühtekokku 11.2% broilerilihaproovidest olid *Campylobacter*-positiivsed. Uuringud aastate lõikes näitavad, et suurem linnuliha *Campylobacter* spp. saastumine esines aastatel 2000 (35.6%), 2003 (28.8%) ja 2004 (29.8%). Edasiselt toimus *Campylobacter*-positiivsete proovide osakaalu vähenemine 5.9%-lt 2005. aastal kuni 2.2%-ni 2007. aastal ning mõningane suurenemine aastatel 2008 kuni 2010, kui 4.9–8.3% proovidest olid *Campylobacter*-positiivsed. *Campylobacter* spp. kontaminatsiooni esines kõige rohkem juulist septembrini (joonis 1), kui ühtekokku 24.2% proovidest olid kontamineeritud. Perioodidel aprill kuni juuni ning oktoober kuni detsember leiti kampülobaktereid vastavalt 2.9% ja 9.5% proovidest. Kõige vähem *Campylobacter*-positiivsed proove esines ajavahemikus jaanuar kuni märts, kui 2.6% proovidest olid kontamineeritud. Aastatel 2000–2010 isoleeritud tüvedest 97.7% oli detekteeritud, kui *C. jejuni* ( $n = 216$ ), 1.8%, kui *C. coli* ( $n = 4$ ), ja 0.5% moodustas *C. lari* ( $n = 1$ ).

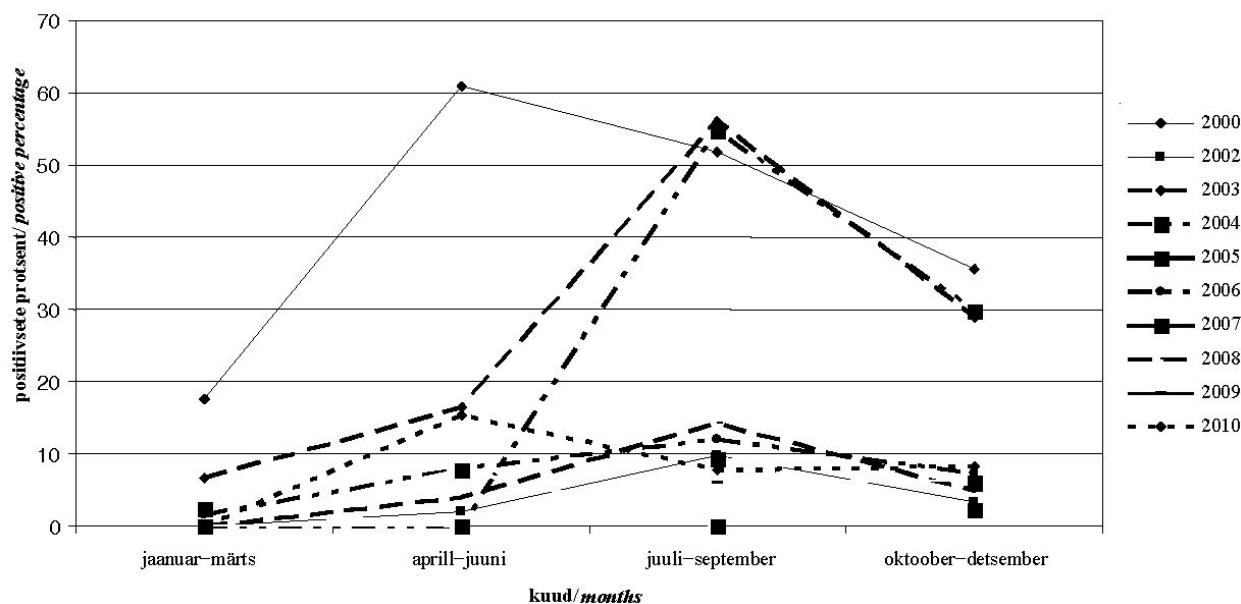
**Tabel 1.** *Campylobacter* spp. esinemine broileriliha proovides Eestis

**Table 1.** Occurrence of *Campylobacter* spp. broiler chicken meat samples in Estonia

Aasta/year	Positiivsete proovide arv/proovide arv kokku (positiivsete %)				Kokku/Total
	jaanuar–märts	aprill–juuni	juuli–september	oktoober–detsember	
2000	3/17 (17.6)	14/23 (60.9)	15/29 (51.7)	0/21 (0)	32/90 (35.6)
2002	0/87 (0)	2/97 (2.1)	12/124 (9.7)	1/131 (0.8)	15/439 (3.4)
2003	2/30 (6.7)	13/79 (16.5)	19/34 (55.9)	21/48 (43.8)	55/191 (28.8)
2004	0/2 (0)	0/6 (0)	71/130 (54.6)	14/147 (9.5)	85/285 (29.8)
2005	2/85 (2.4)	0/121 (0)	13/140 (9.3)	16/177 (9.0)	31/523 (5.9)
2006	1/62 (1.6)	5/62 (8.1)	8/66 (12.1)	0/3 (0)	14/193 (7.3)
2007*	0/8 (0)	1/13 (7.7)	0/13 (0)	0/12 (0)	1/46 (2.2)
2008**	0/26(0)	1/26 (3.9)	4/28 (14.3)	0/22 (0)	5/102 (4.9)
2009*	0/4 (0)	0/13 (0)	1/17 (5.9)	2/14 (14.3)	3/48 (6.3)
2010*	0/8 (0)	2/13 (15.4)	1/13 (7.7)	1/14 (7.1)	4/48 (8.3)
Kokku/Total	8/305 (2.6)	13/453 (2.9)	144/594 (24.2)	56/589 (9.5)	221/1,965 (11.2)

\*\* Euroopa Liidu võrdlusalusuuringus uuritud värsked broilerilihaproovid/Fresh broiler meat samples analysed within European Union baseline study

\* Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi zoonootiliste haigustekitajate seires uuritud värsked broilerilihaproovid/Fresh broiler meat samples analysed within state monitoring program for zoonotic agents in Estonian Veterinary and Food Laboratory



**Joonis 1.** Linnuliha *Campylobacter* kontaminatsiooni hooajaline varieeruvus  
**Figure 1.** Seasonality of *Campylobacter* contamination on poultry meat

### Kampülobakterite sero- ja genotüüpiline jaotumus

Eestis jaekaubandusest kogutud toorest linnulihast isoleeritud *Campylobacter* spp. tüved osutusid sero- ja genotüüpselt jaotuselt mitmekesiseks (tabel 2). 54-st *Campylobacter jejuni* tüvest identifitseeriti 11 erinevat serotüüpi, millest 9 seonduis eelkõige Eesti toodetest isoleeritud ning 5 importtoodetest isoleeritud tüvedega. Serotüüpilise jaotumuse ja toodete päritolu (müügipunktide) vahel ei esinenud selget seost. Töös kasutatud serospetsiifilise seerumiga (Denka Seiken Co., LTD, Jaapan) osutusid 12 tüve mitte serotüüpiseeritavateks ning kolm tüve kuulusid kompleks-serotüüpi. Kõige rohkem tüvesid (54%) kuulus serotüüpidesse O:1,44; O:21 ja O:55, vastavalt 28%, 13% ja 13%. Eesti päritolu toodetest identifitseeriti kaheksa erinevat *Campylobacter jejuni* serotüüpi, üks kompleksserotüüp ning kolm tüve osutusid mitte serotüüpiseeritavateks. Broilerli-

lihast identifitseeriti kõige rohkem *Campylobacter jejuni* tüvesid, mis kuulusid serotüüpidesse O:1,44 (32%) ning O:21 (19%). Tüved, mis kuulusid serotüüpi O:1,44, isoleeriti Eesti, Taani, Ameerika Ühendriikide, Ungari ja Soome päritoluga linnulihast ning seega on antud serotüübil ulatuslik geograafiline levik. Erinevates riikides tehtud varasemad uuringud (Nielsen *et al.*, 1997; Vierikko *et al.*, 2004; Devane *et al.*, 2005 ja Miller *et al.*, 2005) on samuti tõestanud isoleeritud kampülobakterite tüvede kuulumise serotüüpi O:1,44. Ungari päritolu kalkuniliha isoleeritud *Campylobacter jejuni* tüved (n = 17) jaotusid kolme erinevasse serotüüpi: O:55 (29%), O:1,44 (18%) ning O:18 (12%). Serotüüpidesse O:2, O:4-kompleks ning O:12, mis eelnevate uuringute alusel on osutunud omaseks nii lindudele kui inimestele, kuulus meie uuringute alusel kokku 13% kampülobakterite isolaatidest.

**Tabel 2.** Eesti jaekaubandusest pärit toorest linnulihast isoleeritud *Campylobacter jejuni*\* (n = 54) serotüüpide ja *Campylobacter* spp.\*\* PFGE genotüüpide jaotumus

**Table 2.** Distribution of *Campylobacter jejuni*\* serotypes and *Campylobacter* spp.\*\* (n = 70) PFGE genotypes isolated from raw retail poultry from Estonia

Riik/Country	Serotüüp (konkreetses serotüübi arvukus)/ Serotype (number of certain serotype)	Pulsotüüp/Pulsotype	
		SmaI	KpnI
Taani/Denmark	O:1,44 (4); O:21 (3); O:41 (1)	6, 7, 23	6, 7, 23, 31, 32
Soome/Finland	O:1,44 (1)	26	26
USA	O:1,44 (1); MT <sup>b</sup> (2)	4, 5, 10	4, 5, 22
Ungari/Hungary	O:1,44 (3); O:18 (2); O:55 (5); MT <sup>b</sup> (7)	1, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 35
Eesti/Estonia	O:1,44 (6); O:2 (2); O:4-kompleks (2); O:11 (1); O:12 (3); O:21 (4); O:27 (1); O:38 (1); O:55 (2); MT <sup>b</sup> (3)	1, 2, 3, 8, 9, 10, 11, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 29	1, 2, 3, 8, 9, 10, 11, 21, 22, 24, 25, 27, 29, 30, 33, 34, 36

\*n = 54; \*\*n = 70

<sup>a</sup>alla joonitud PFGE genotüüpi isoleeriti erinevatest riikidest pärit linnulihast/underlined PFGE type has been detected in poultry originated from more than one country

<sup>b</sup>MT – mitte tüüpiseeritav/nontypeable

70 *Campylobacter*'i isolaadi genotüüpiseerimine andis 29 *SmaI* ning 34 *KpnI* PFGE tüüpi, mis osutas restriktsooniensüümi *KpnI* suuremale genotüüpiseerimise võimele. Veelgi enam osutas *KpnI* kasuks fakt, et viie *Campylobacter*'i isolaadi DNA ei lõhustunud üldse *SmaI* ensüümi kasutades. Üldiselt võib öelda, et erinevate riikide toodangust isoleeritud kampülobakterite tüved ei kattunud genotüüpiliselt koosluselt üksteisega, välja arvatud *SmaI* PFGE-tüüp 1, millesse kuulusid nii Eesti kui Ungari tüved, ning *KpnI* PFGE-tüüp 22, millesse kuulusid nii Eesti kui Ameerika Ühendriikide toodangust pärit kampülobakterite tüved. Enamik tüvedest, mis kuulusid samasse PFGE genotüüpi, pärinesid konkreetse riigi toodetest. Makrorestriktsooni kombinatsioon andis 37 PFGE-tüüpi, millest 33 koosnesid *C. jejuni* (89%), kaks *C. coli* (5.5%) ning kaks *Campylobacter* spp. isolaatidest (5.5%). Uuringutega leiti, et ühte PFGE-tüüpi kuulunud kampülobakterite tüved kuulusid sageli erinevatesse serotüüpidesse ning vastupidi.

### Kampülobakterite tüvede tundlikkus antibiootikumidele

Antud uurimistöös tehti kampülobakterite antibiootikumidele tundlikkuse määramine aastatel 2002 ja 2003 isoleeritud ning aastatel 2005 ja 2006 isoleeritud tüvedega. Mainitud varasemal perioodil (aastatel 2002 ja 2003) isoleeritud kampülobakterite tüvedega ( $n = 70$ ) tehti antibiootikumide tundlikkuse määramine ampitsilliini, erütromütsiini, gentamütsiini, nalidiksiinhappe, tetratsükliini ning tsiprofloksatsiini suhtes. Resistentsete tüvede protsent ampitsilliinile, erütromütsiini, nalidiksiinhappele, tetratsükliinile ja tsiprofloksatsiini oli vastavalt 19.4%, 16.6%, 44.4%, 22.2% ja 44.4%. Linnulihast isoleeritud kampülobakterite tüved olid absoluutselt tundlikud vaid gentamütsiini. Kahte erinevasse antibiootikumirühma kuuluvate antibiootikumide suhtes esines tüvede üheaegne resistentsus põhiliselt

kombinatsioonis nalidiksiinhape/tsiprofloksatsiin ja tetratsükliin (22.2%). Uurimisperioodil 2002 a ja 2003 a ei isoleeritud ühtegi multiresistentset tüve (resistentne vähemalt kolme erinevasse rühma kuuluva antibiootikumi suhtes). Disk-difusiooni ja *E*-testi tulemused katusid niivõrd, et kõik tüved, mis osutusid tundlikuks disk-difusiooni testiga, osutusid tundlikeks ka *E*-testi tulemuste alusel.

Aastatel 2005 ja 2006 isoleeritud *Campylobacter*'i tüvede antibiootikumi tundlikkuse määramisel olid tulemused märksa murettekitavamad, sest 36 isolaati (27.5%) osutusid multiresistentseteks ehk olid resistentsed kolme või enama erinevasse rühma kuuluva antibiootikumi suhtes. Ühe või rohkema antibiootikumi suhtes esines resistentsus 104 isolaadil (79.4%). Kaksikümmend isolaati (15.3%) osutusid resistentseteks kolme erinevasse rühma kuuluva antibiootikumi suhtes, 13 isolaati (10%) nelja erinevasse rühma kuuluva antibiootikumi suhtes ning kolm isolaati olid resistentsed kõigi testitud antibiootikumide suhtes. Resistentsust antibiootikumidele eraldi hinnates selgus, et kõige rohkem oli resistentsed tüvesid enrofloktsatsiini ja nalidiksiinhappe suhtes, kus vastavalt 73.3% ja 75.6% kampülobakterite tüvedest osutus resistentseteks. Järgnesid tetratsükliini (32.1%), erütromütsiini (19.8%), gentamütsiini (19.1%) ning ampitsilliini (7.6%) suhtes resistentseks osutunud tüved. Võrreldes mitte multiresistentsete tüvedega oli multiresistentsete *C. jejuni* tüvede antibiootikumide suhtes resistentsuse tase nalidiksiinhappe ja enrofloktsatsiini korral oluliselt kõrgem (Mann-Whitney test,  $p = 0.026$ ). Resistentsus teistele antimikroobsetele ühenditele ei olnud multiresistentsete ja mitte multiresistentsete tüvede võrdluses oluliselt erinev ( $p > 0.05$ ). Seega, aastatel 2005 ja 2006 toimunud uuringud osutasid võimalusele, et fluorokinolonide kasutamine linnukasvatustes võib esile kutsuda multiresistentsete tüvede tekke.

**Tabel 3.** Broilerilihast 2005. ja 2006. aastal isoleeritud *C. jejuni* tüvede ( $n = 131$ ) antibiootikumidele tundlikkus

**Table 3.** Antimicrobial sensitivity of *C. jejuni* isolates ( $n = 131$ ) from broiler chickens collected in 2005 and 2006 in Estonia

Antibiootikum/ antimicrobial <sup>a</sup>	Antibiootikumi kontsentratsioon/ antimicrobial concentration range (µg/ml) VetMIC™Camp	Tundlikkuse piir/ breakpoint* (µg/ml)	Resistentsete tüvede arv/No. of resistant strains (%)
Am	0.5–64	32	10 (7.6)
Ef	0.03–4	1	96 (73.3)
Em	0.12–16	16	26 (19.8)
Gm	0.25–8	8	25 (19.1)
Nal	1–128	32	99 (75.6)
Tc	0.25–32	4	42 (32.1)

<sup>a</sup>a ntibiootikum/antimicrobial: Am, Ampitsilliin/Ampicillin; Ef, Enrofloktsatsiin/Enrofloxacin; Em, Erütromütsiin/Erythromycin; Gm, Gentamütsiin/Gentamicin; Nal, Nalidiksiinhape/Nalidixic acid; Tc, Oksütetratsükliin/Oxytetracyclin

\*piirväärtus, alates millest loetakse *Campylobacter* isolaat resistentseks/breakpoints between susceptible and resistant isolates

Kampülobakterite antibiootikumidele resistentsete tüvede tundlikkuse määramise uurimuse tulemused on olulised, sest kemoterapeutikumi valik bakteriaalse infektsiooni korral sõltub diagnoosist ja tekitaja antibiootikumitundlikkusest. Õige kemoterapeutikumi annustamine ja raviskeemist kinnipidamine on mikrobiaalse nakkuse ravi ning polüresistentsete mikroobitüvede tekke välti-

mise alus. Teadustööde tulemusena on selgunud, et morfiiisel kampülobakteritel on unikaalne võime muuta resistentseks kinoloonrühma preparaate suhtes (Gootz *et al.*, 1991). Uuringute tulemusi aluseks võttes soovitati lindude haiguste profülaktikas mitte kasutada söötades antibiootikume, kusjuures eriti taunitavaks peeti kinoloonrühma antibiootikumide kasutamist.

Profülaktilistel eesmärkidel antibiootikumide kasutamine lindude söödasegudes on Euroopa Liidus keelatud, kuna on leitud, et nende sisaldumine söödasegudes põhjustab bakterite polüresistentsete tüvede teket. Antud uurimuse tulemused osutasid kaudselt faktile, et lindude söödasegudes kasutatakse antibiootikume, mida kinnitab eeskätt aastatel 2005 ja 2006 lindude roojast ja linnulihatoodetest suurel arvul resistentsete tüvede isoleerimine. Riiklikku seiret korraldavatele veterinaarinspektoritele peaksid uurimuse tulemused selgitama loomakasvatusestevõttes antibiootikumide kasutamise põhimõtteid ning olema aluseks antibiootikumide jääkainete määramise proovivõtu plaanide koostamisel.

Uurimistöö tulemusena leiti, et tuleb tõhustada veterinaar- ja humaanmeditsiini spetsialistide koostööd rahva tervishoiu parendamisel. Head hügieenitavad peavad leidma rakendamist nii tootmise, jaekaubanduse kui tarbija tasandil, mis võimaldab paljude enteraalsete haiguste ennetamist. Tõrjeprogrammide rakendamisel on vajalik kõikide linnufarmide pidevad uuringud ning lindude tapmise eelselt tuleb välja selgitada linnukarjade tabandumine. Lindlates tuleb rakendada väga rangeid bioohutuse võtteid. Ristsaastumise ja *Campylobacter* spp. kontaminatsiooni vähendamise või vältimise eesmärgil tuleb kampülobakterite suhtes negatiivsed karjad tappa eraldi positiivsetest ning soovitatavalt tapmispäeva esimesel poolel kampülobakterite suhtes negatiivsed ning teisel poolel positiivsed karjad. Kodulindude tapamajades tuleb suuremat tähelepanu pöörata sellele, et tapmisele järgnevad protseduurid minimeeriks soolesisaldise sattumise rümpadele. Üks võimalus oleks nt tapaliinide töökiiruse vähendamine ning kasutatava puhata loputusvee koguse suurendamine. Oluline võimalus kontaminatsiooni vähendamiseks oleks ka intensiivsema ning pikemaajalise rümpade õhkjahutamise kasutamine.

Väga oluline on antud uurimistöö informatsiooni edastamine turustamisotstarbelise toidutoorme ja toidu käitlejatele, kes on kohustatud muutma või täiendama tehnoloogilisi skeeme ja leidma teisi lahendusi, et vältida tarbijale potentsiaalselt ohtliku tooraine või toidu turustamist.

### Kokkuvõte ja järeldused

Eesti väikese võimsusega ettevõtte linnuliha toodang oli võrreldes suure võimsusega ettevõtte toodanguga oluliselt ( $P < 0.001$ ) rohkem kampülobakteritega saastunud. Lindude rümpad ja tiivatükid (vastavalt 28% ja 31.3%) olid rinna- ja kintsutükidega (0% ja 0%) võrreldes oluliselt sagedamini saastunud.

Eesti päritolu jahutatud linnulihatoodete saastumine termofiilsete kampülobakteritega oli 9.1%, kusjuures külmutatud importtoodetel ulatus see näitaja 15.9%-ni. Imporditud linnuliha kõrgem saastumine võis olla tingitud algtootmise kõrgest kontaminatsioonist termofiilsete kampülobakteritega.

Võrreldes Tallinnast kogutud proovidega osutusid Tartu turgudel võetud linnulihaproovid termofiilsete kampülobakteritega oluliselt rohkem saastunuteks. Selline erinevus võis olla tingitud proovide laboratooriumi

misses toimetamise erinevatest transpordiaegadest. Tartust võetud proovid toimetati analüüsimiseks laboratooriumisse praktiliselt kohe pärast proovide võtmist, kuid Tallinnast võetud proovid analüüsiti Helsingi Ülikooli toidu- ja keskkonnahügieeni laboris, mis tähendas mitmete tundide võrra pikemat aega analüüsi alguseni.

Hooajaliselt isoleeriti Eestis müüdnud toorestelt linnulihatoodetelt termofiilseid kampülobaktereid kõige sagedamini juunist kuni novembrini.

Meie termofiilsete kampülobakterite uuringud, mis sellises ulatuses olid Eesti veterinaarmeditsiini esimesed, peavad jätkuma, et täiendavate uuringutega selgitada välja *Campylobacter* spp. levimust ja esinemissagedust põllumajandusloomade karjade tasandil. Uuringute jätkumine on vajalik ka edasiste *Campylobacter* spp. kontaminatsiooni suundumuste väljaselgitamisel.

Võttes kokku termofiilsete kampülobakterite uuringud aastast 2000 kuni 2010, võib järeldada, et võrreldes enamike Euroopa Liidu liikmesriikide vastavate näitajatega on Eesti broileriliha *Campylobacter* spp. saastatus viimastel aastatel olnud märkimisväärselt madal. Sarnaselt Taani, Norra, Rootsi ja Soomega esineb Eesti linnuliha *Campylobacter* kontaminatsioonimäärades selge hooajaline erinevus ning termofiilsete kampülobakterite esinemise kõrghooajaks võib pidada ajavahemikku juulist kuni septembrini. Kõige enam domineerib *Campylobacter* spp. tüvede seas *C. jejuni*.

Uuringutest saadud tulemused osutasid toiduainetest isoleeritud kampülobakterite tüvede sero- ja genotüüpilise mitmekesisusele. Olulist seost serotüüpilise jaotumuse ja proovide päritolu vahel antud uuringutes ei leitud. Seitsmekümne *Campylobacter*'i isolaadi genotüüpiseerimine näitas, et restriksiooniensüüm *KpnI* on võrreldes *SmaI*-ga suurema genotüüpide eraldamisvõimega. Nimelt andis restriksiooniensüüm *KpnI* meie uuringutes 34 PFGE-tüüpi võrreldes *SmaI* restriksiooniensüümi 29 genotüübiga. PFGE analüüs *KpnI* ja *SmaI* ensüümidega tõestas head kampülobakterite isolaatide tüüpiseerimise ning katsete korratavuse võimet. Selge seos oli genotüüpilise jaotumuse ja proovide päritolu vahel, kuid genotüüpide ja geograafilise piirkonna seotus vajab ulatuslikumaid uuringuid.

Antud uurimuse tulemused näitasid toiduainetest isoleeritud kampülobakterite tüvede kõrget resistentust praktiliselt kõikide uuringus kasutatud antimikroobsete ühendite suhtes. Kõrged minimaalsed inhibeerivad kontsentratsioonid (MIK) makroliidide ja fluorokinoloonide suhtes osutavad tõenäoliselt võimalikele tervishoiualastele probleemidele, tingituna asjaolust, et erütromütsiin ja teatud fluorokinoloonid on inimeste kampülobakteritest põhjustatud infektsioonide ravis esimesi valikpreparaate. Uuringutulemuste eriti muretekitavaks faktiks tuleb aga pidada multiresistentsete kampülobakterite tüvede kõrget arvu, 36 isolaati ehk 27,5% isoleeritud kampülobakterite tüvedest osutus multiresistentseks. Aastatel 2005 ja 2006 toimunud uuringud osutasid selgelt faktile, et fluorokinoloonide kasutamine võib esile kutsuda multiresistentsete tüvede tekke.

*Campylobacter* spp. antibiootikumidele tundlikkuse uuringud peavad jätkuma, et selgitada välja resistentisu-

se suundumusi ning seonduvaid resistentsusmehhanisme ja võimalusi termofiilsete kampülobakterite resistentsuse/multiresistentsuse vähendamiseks Eestis.

### Ettepanekud

Antud uuringutega jõuti järeldusele, et on veel mitmeid valdkondi, mis vajaksid enam tähelepanu. Vajalik on jätkata uuringutega linnufarmide tasandil ning leida teaduslikud põhjendused saastumisastme muutustele erinevatel aastaajadel ning aastatel. *Campylobacter* spp. kontrolli programmi loomisel ja rakendamisel tuleks lähtuda Põhjamaade senisest kogemusest. Põhjamaades rakendatavate *Campylobacter* spp. kontrolli programmide üldine tähelepanu on suunatud bioohutuse tagamisele linnufarmide tasandil, et vältida karjade nakatumist. Teise olulise strateegiana tuleks rakendada lindude logistilist tapmist ehk *Campylobacter* positiivsed karjad tapetakse kas päeva lõpul või täiesti eraldi päevadel. Positiivsetest karjadest pärit lindude rümbad tuleks kuumtöödelda või rakendada nende töötlemisel vähemalt viienädalast rümpade külmutamist. Inimestel esinevate *Campylobacter* spp. nakkusjuhtude arvu vähendamiseks või infektsiooni ennetamiseks, samuti *Campylobacter* infektsiooni suundumuste alaste teadmiste hankimisel tuleks veterinaarmeditsiini spetsialistidel arendada koostööd humanmeditsiini teadlaste ning kliinistidega. Patogeenide multiresistentsed tüved peegeldavad pikema perioodi jooksul toimunud antibiootikumide kasutamist, mis antud uuringutes andsid arvukalt multiresistentsid isolaate. Multiresistentsete isolaatide ulatuslik esiletulek on suur risk inimeste tervisele ning limiteerib kampülobakteritest põhjustatud infektsioonide ravimisel antibiootikumterapia rakendamist. Eestis on toiduloomade tasandil vaja rakendada senisest märksa karmimat antibiootikumide kasutamise poliitikat, seda eriti fluorokinolonide osas. Jätkata tuleb mikroobide antibiootikumidele tundlikkuse uuringutega, et määrata kampülobakterite resistentsuse tekke tendentse, resistentsuse mehhanisme ning võimalusi toidupatogeenide resistentsuse vähendamiseks Eestis. Rakendada tuleb *Campylobacter* spp. teaduspõhist riskihindamist, riskiohjamist ja riskikommunikatsiooni ning seda kogu toidutootmise ahela ulatuses.

### Tänuavaldused

Käesolev töö on valminud Eesti Maaülikooli veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituudi toiduhügieeni osakonna, Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi ja Helsingi Ülikooli toiduhügieeni ja keskkonnatervise laboratooriumides. Uurimistööd on finantseerinud Eesti Teadusfond (grant nr 4,979), Eesti Maaülikool (baasfinantseerimise projekt nr 8-2/T5081VLVL05, EMÜ doktorikool) ja Euroopa Sotsiaalfond Eestis, projekt nr 8-2/T5138VLVL.

### Kirjandus

- Abbott, S.L., Waddington, M., Lindquist, D., Ware, J., Cheung, W., Ely, J., Janda, J.M. 2005. Description of *Campylobacter curvus* and *C. curvus*-like strains associated with sporadic episodes of bloody gastroenteritis and Brainerd's diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, p. 585–588.
- Bhaduri, S., Cottrell, B. 2004. Survival of Cold-Stressed *Campylobacter jejuni* on Ground Chicken and Chicken Skin during Frozen Storage. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, p. 7103–7109.
- Chantarapanont, W., Berrang, M., Frank, J.F. 2003. Direct microscopic observation and viability determination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin. *Journal of Food Protection*, 66, p. 2222–2230.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fourteenth informational supplement M100-S14, vol. 24, no. 1. CLSI, Wayne, PA.
- Domingues, C., Gomez, I., Zumalacarregui, J. 2002. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *International Journal of Food Microbiology*, 72, p. 165–168.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2009. Assessing Health Benefits of Controlling *Campylobacter* in the Food Chain. EFSA Scientific Colloquium Summary Report. ISBN: 978-92-9199-134-1.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010. Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in the European Union in 2008.
- Euzeby, J.P. 2006. Dictionnaire de bacteriologie veterinaire. <http://www.bacdico.net>.
- Friedman, C.R., J. Neimann, H.C. Wegener, Tauxe, R.V. 2000. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* in the United States and other industrialized nations, In: I. Nachamkin and M.J. Blaser (Eds.) *Campylobacter*, 2nd ed., ASM Press, Washington, USA, p. 121–138.
- Frost, J.A., Gillespie, J.A., O'Brien, S.J. 2002. Public Health implications of *Campylobacter* outbreaks in England and Wales, 1995–1999: epidemiological and microbiological investigations. *Epidemiology and Infection*, 128, p. 111–118.
- Gootz, T.D., Martin, B.A. 1991. Characterization of high-level quinolone resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, p. 840–846.
- Gorkiewicz, G., Feierl, G., Zechner, R., Zechner, E.L. 2002. Transmission of *Campylobacter hyointestinalis* from pig to human. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, p. 2601–2605.
- Hänninen, M.-L., Pajarre, S., Klossner, M.-L., Rautelin, H. 1998. Typing of human *Campylobacter jejuni* isolates in Finland by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, p. 1787–1789.
- Hänninen, M.-L., Perko-Mäkelä, P., Pitkälä, A., Rautelin, H., 2000. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in humans with domestically acquired infections and in chicken samples from the Helsinki area. *Journal of Clinical Microbiology*. 38, p. 1998–2000.
- Hänninen, M.-L., Haajanen, H., Pummi, T., Wermundsen, K., Katila, M.-L., Sarkkinen, H., Siittinen, I., Rautelin, H. 2003. Detection and typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and analysis of indicator organisms in three waterborne outbreaks in Finland. *Applied and Environment Microbiology*, 69, p. 1391–1396.



- Hänninen, M.-L., Kärenlampi, R. 2004. *Campylobacter* in waterborne epidemics in Finland. *Water Science and Technology*, 4, p. 39–45.
- Humphrey, T.J. 1994. Techniques for the isolation of *Campylobacter* from food and the environment. Report on a WHO. Consultation on epidemiology and control of campylobacteriosis. The Netherlands, p. 79–83.
- Kapperud, G., Skjerve, E., Bean, N.H., Ostroff, S.M., Lassen, J. 1992. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: results of a case-control study in southeastern Norway. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, p. 3117–3121.
- Kuusi, M., Nuorti, J.P., Hänninen, M.-L., Koskela, M., Jussila, V., Kela, E., Miettinen, I., Ruutu, P. 2005. A large outbreak of campylobacteriosis associated with a municipal water supply in Finland. *Epidemiology and Infection*, 133(4), p. 593–601.
- Maslow, J. N., A. M. Slutsky, and R. D. Arbeit. 1993. Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology, p. 563–572. In: D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (Eds.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- NMKL Method, vol. 119. *Campylobacter jejuncoli*. Detection in foods, 2nd ed. The Nordic Committee on Food Analysis.
- Roasto, M. *Campylobacter* spp. in poultry and raw poultry meat products in Estonia with special reference to subtyping and antimicrobial susceptibility. A thesis for applying for the degree of Doctor of Philosophy in Veterinary Medicine. Tartu 2008. ISBN: 978-9949-426-48-5.
- 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.
- 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, p. 1742–1750.
- Sanches, M.X., Fluckey, W.M., Brashears, M.M., McKee, S.R. 2002. Microbial profile and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in broilers processed in air-chilled and immersion-chilled environments. *Journal of Food Protection*, 65, 948–956.
- Schönberg-Norio, D., Takkinen, J., Hänninen, M.-L., Katila, M.L., Kaukoranta, S.S., Mattila, L., Rautelin, H. 2004. Swimming and *Campylobacter* infections. *Emerging Infectious Diseases*, 10(8), 1474–1477.
- Stafford, R.J., Schluter, P., Kirk, M., Wilson, A., Unicomb, L., Ashbolt, R., Gregory, J., the OzFoodNet Working Group. 2006. A multi-centre prospective case-control study of campylobacter infection in persons aged 5 years and older in Australia. *Epidemiology and Infection* Nov., 1–11, epub ahead of print.
- Tööjuhend 4DB-TJ-16 *Campylobacter jejuni/coli* tundlikkuse määramine antibakteriaalsete ainete suhtes VetMIC CAMP meetodil. Veterinaar- ja Toidulaboratoorium 2005.
- 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), p. 280–284.

### ***Campylobacter* spp. in estonian food chain in 2000–2010**

Mati Roasto\*, Kadriin Meremäe, Kristi Praakle-Amin, Ari Hörman, Terje Elias, Merike Lillenberg, Andres Elias, Toomas Kramarenko, Liidia Häkkinen, Piret Põltsama, Mihkel Mäesaar, Priit Elias, Marja-Liisa Hänninen

#### **Summary**

Nowadays, *Campylobacter jejuni* and *C. coli* are the most common registered bacterial causes of human intestinal infections in many developed countries. Several epidemiological studies have shown that handling or eating poultry is an important risk factor for acquisition of campylobacteriosis. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs, contains microbiological criteria for specific food/microorganism combinations and the implementing rules to be complied with by food business operators at all stages of the food chain. To date no criteria have been established for *Campylobacter* spp. in foodstuffs.

The objectives of the present study were: 1) To determine *Campylobacter* spp. in raw retail poultry meat in Estonia in order to provide data for understanding the significance of poultry as a potential source of human *Campylobacter* infection in Estonia, 2) To serotype and PFGE genotype *Campylobacter* isolates originating from raw retail poultry meat to understand the distribution and diversity of serotypes and PFGE genotypes in Estonia, 3) To determine the antimicrobial susceptibility of the isolated *Campylobacter* strains in order to compare it to respective levels in other EU countries and to understand the problem severity in Estonia.

In present study it was found: 1) The proportion of *Campylobacter* spp. positive samples on fresh chicken products was 11.2% from the total of 1965 samples in Estonia. Proportion of *Campylobacter* positive samples on fresh chicken products of Estonian origin was 9.1% compared to 15.9% obtained from imported frozen raw poultry products in 2002 and 2003.

Analysis of seasonality of *Campylobacter* positive samples indicated that the seasonal peak of *Campylobacter* on chicken meat was from June to October, 2) High serotype and genotype diversity among *Campylobacter* isolates from raw retail poultry meat in Estonia. The serotype distribution did not show association with the origin of the sample.

The genotyping of the 70 *Campylobacter* isolates showed *KpnI* to be more discriminatory, yielding 34 PFGE types compared to 29 obtained by *SmaI*. PFGE with the enzymes *KpnI* and *SmaI* for digestion proved to be discriminatory, repeatable and reproducible, 3) High resistance patterns of isolated *Campylobacter* spp. strains for several antimicrobials. Multidrug resistance in Estonian broiler chicken isolates was one of the highest reported in latest studies of broiler chicken *Campylobacter* isolates all over the world. Our findings in 2005 and 2006 suggest that the use of fluoroquinolones may select multiresistant strains since resistance to erythromycin, gentamicin or oxytetracycline was exceptional without simultaneous resistance to fluoroquinolones.

Finally, this study revealed that there are several areas where further studies are required. More studies to monitor the potential *Campylobacter* levels and the reasons for changes in contamination levels with time are needed in Estonia. Antimicrobial susceptibility studies need to be continued to find the trends in levels of *Campylobacter* resistance as well as the mechanisms for resistance and potential to decrease the *Campylobacter* resistance in Estonia. Research based risk assessment, risk management and risk communication has to be performed in Estonia in relation with *Campylobacter* spp. entire in food chain, and similar *Campylobacter* spp. control programs used in the Nordic countries could be applied in Estonia.