

Metode izdvajanja i dokazivanja bakterija roda *Campylobacter* – metode genotipizacije (II. dio)



Marina Mikulić*, Andrea Humski, B. Njari, Dora Stojević, L. Jurinović, S. Špičić, Sanja Duvnjak i Ž. Cvetnić

Uvod

Fenotipske metode temelje se na određivanju fenotipskih svojstava. Metode za razlikovanje bakterijskih sojeva ispod razine vrste ili podvrste općenito su poznate kao genotipizacija bakterija. Ekspresija gena unutar istoga bakterijskog soja može varirati, ovisno, npr. o dostupnosti hranjivih tvari u podlogama za rast te stoga zbog različitih uvjeta fenotip neće biti isti. Suprotno tome, genotipizacija se temelji na puno stabilnijem markeru - DNK te utvrđuje genotip neovisno o genskoj ekspresiji. Metode genotipizacije mjere kromosomske razlike u relativno stabilnim genomskim strukturama. Razvojem novih metoda subtipizacije bakterijskih sojeva koje se temelje na molekularnim tehnikama moguće je riješiti dio nedostataka fenotipskih i metoda za serotipizaciju. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*; PFGE) važna je metoda genotipizacije koja se nalazi u uporabi od

80-tih godina prošlog stoljeća do danas. Nove metode genotipizacije bakterijskih sojeva temelje se na molekularnim tehnikama određivanja nukleotidnih sljedova specifičnih genskih lokusa. Metoda koja je zadnjih godina dobila na izrazitoj važnosti u istraživanjima *Campylobacter* (C.) vrsta jest MLST (engl. *MultiLocus Sequence Typing*), tj. tipizacija određivanjem sljedova nukleotida na više genskih lokusa, koja omogućuje istraživanja izvora i rezervoara uzročnika bolesti, njihovih odnosa te molekularne epidemiologije kampilobakterioze.

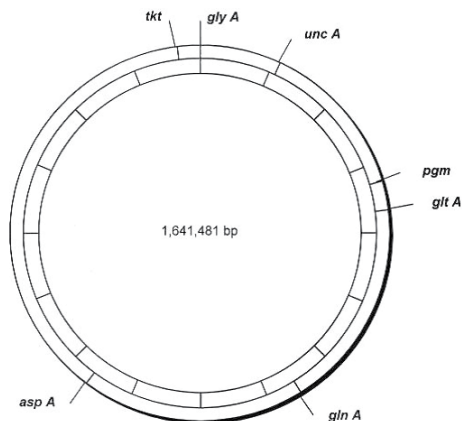
Tipizacija određivanjem sljedova nukleotida na više genskih lokusa

Razvojem molekularnih metoda genotipizacije uvidjelo se da su bakterije roda *Campylobacter* genomski vrlo raznovrsne što se očituje i u brzom

Dr. sc. Marina MIKULIĆ*, dr. med. vet., poslijedoktorandica, (dopisni autor, e-mail: mikulic@veinst.hr), dr. sc. Andrea HUMSKI, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, naslovna docentica, Dora STOJEVIĆ, dr. med. vet., znanstvena novakinja, dr. sc. Luka JURINOVIĆ, dipl. ing. biol., poslijedoktorand, dr. sc. Silvio ŠPIČIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, dr. sc. Sanja DUVNJAČ, mag. biol. mol., poslijedoktorandica, dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. med. vet., akademik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Bela NJARI, dr. med. vet., redoviti profesor, Veterinarski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

genomskoj prilagodbi tijekom infekcije ili kolonizacije.

Zbog spomenute genomske promjenjivosti kampilobakteri pokazuju odlike slabo klonalne populacije pa je moguće razlikovati linije (engl. *lineages*) srodnih bakterijskih izolata (Wassenaar i sur., 1998.). Određivanje redoslijeda nukleotidnih sljedova unutar DNK naziva se sekvenciranje. Dingle i sur. (2001.) opisali su metodu genotipizaciju *Campylobacter jejuni* na osnovi sekvenciranja sedam gena (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, i *uncA*) i dali joj kraticu MLST (engl. *MultiLocus Sequence Typing*).



Slika 1. Kromosomske lokacije sedam genskih lokusa koji se koriste pri sekvenciranju *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* pomoću MLST metode [Dingle i sur., 2001.].

Metoda genotipizacije se temelji na razlikama nukleotidnih sljedova (sekvenci) sedam konstitutivno eksprimiranih gena (engl. *housekeeping genes*) koji kodiraju enzime odgovorne za različite vidove intermedijarnog metabolizma bakterije. Ovisno o ispitivanom genskom lokusu početnice umnažaju genski produkt veličine od 450 do 550 parova baza. Svakom prepoznatom alelu u pubMLST *C. jejuni/C. coli* bazi podataka dodjeljuje se alelni broj te na osnovu kombinacije

sedam alelnih brojeva, baza prepoznaje jedan tip nukleotidnog slijeda, koji se označava kao ST (engl. *sequence type*) određenog broja, primjerice ST 45. Ispitivanje 194 izolata MLST metodom pokazalo je da je *Campylobacter jejuni* genetski različit i da ima značajke slabo klonalne populacije (Dingle i sur., 2001.). Smatra se da se populacijska struktura slabo klonalnih bakterija sastoji od klonalnih kompleksa (engl. *clonal complex*; CC) ili linija, unutar kojih su smješteni bakterijski izolati koji potječu od zajedničkog ishodišnog pretka (Holmes i sur., 1999.). Klonalni kompleksi predstavljaju grupu od dva ili više nezavisnih izolata koji dijele jednake alele na pet ili više genskih lokusa. Klonalni se kompleksi (CC), tj. linije, označavaju prema broju ST za koji se smatra da je ishodišni genotip kompleksa te nose oznaku - ST broj CC; primjerice ST 45 CC (Dingle i sur., 2001.). Klonalni kompleksi mogu se označavati i tako da nakon oznake CC slijedi broj ishodišnog genotipa, npr. CC 45 te će se radi boljeg razlikovanja između ST i CC ovaj način označavanja primjenjivati u daljnjem tekstu. Klasifikacija ST u klonalne komplekse omogućila je jednostavnije uspoređivanje izolata u različitim dijelovima svijeta (Manning i sur., 2003., Sails i sur., 2003., Dingle i sur., 2005.). Tipovi sekvenci (ST) smještaju se u odgovarajući klonalni kompleks analitičkim programom naziva BURST (engl. *Based Upon Related Sequence Types*) (Feil i sur., 2004., Spratt i sur., 2004.). BURST analiza najprije određuje grupe povezanih genotipova u populaciji, predstavljenih u pubMLST bazi podataka te pokušava prepoznati utemeljiteljski genotip, tj. ST, svake grupe. Algoritam potom predviđa potomke utemeljiteljskog genotipa, prikazujući rezultat u obliku radialnog dijagrama s predviđenim utemeljiteljem u središtu kruga. Definicija grupe polazi od pretpostavke da je svaki ST podudaran s drugim ST u grupi u odnosu pet ili više lokusa.

Povećano prepoznavanje i zanimanje za *Campylobacter coli* kao važnog uzročnika bolesti koje se prenose hranom dovelo je do proširenja MLST sheme i omogućilo genotipizaciju te bakterije i daljnje epidemiološke studije. Metoda koristi jednake ciljane alele, odnosno genske lokuse, opisane u MLST protokolu za *C. jejuni*, ali su razvijeni posebni parovi početnica koji se koriste prilikom umnažanja i sekvenciranja. Proučavajući izolate unutar spomenute baze uočava se da *C. coli* pokazuje manju varijabilnost od izolata *C. jejuni* (Dingle i sur., 2005.). Miller i sur. (2005.) razvili su proširenu shemu za sekvenciranje koja obuhvaća tri kampilobakter vrste od kliničkog značenja (*C. coli*, *C. lari* i *C. upsaliensis*), kao i četvrtu vrstu – *C. helveticus*, uz korištenje novih lokusa *adk* i *pgi*, koji mijenjaju lokuse *aspA* i *gltA* za *C. lari*, i *gltA* i *pgm* za *C. upsaliensis*, dok za *C. coli* i *C. helveticus* obuhvaćaju jednaki set od sedam genskih lokusa opisanih i u MLST metodi za *C. jejuni* prema Dingle i sur. iz 2001. godine. Korczak i sur. (2009.) razvili su optimiziranu shemu za sekvenciranje *C. jejuni* i *C. coli*, uz prošireno određivanje *flaA* i *flaB* gena korištenjem optimiziranih početnica za sekvenciranje te uz implementaciju internetski temeljene platforme za analizu podataka: IDNS™ - *Integrated Database Network System* (SmartGene, Švicarska). *Campylobacter* MLST baza podataka koristi dvije povezane baze podataka održavane putem softvera naziva - BIGSdb (engl. *Bacterial Isolate Genome Sequence Database*): prva je baza podataka za utvrđivanje profila sekvenci koja sadrži podatke o dobivenim alelnim sljedovima i MLST profilima, a druga baza analizira i pohranjuje epidemiološke podatke o prijavljenim izolatima (Jolley i Maiden, 2010.). Baza podataka je organizirana u dvije baze: 1. pubMLST *C. jejuni/coli* i 2. pubMLST NON-*jejuni/coli*, a koje koriste navedeni softver i navedene podatke. Baza pubMLST NON-*jejuni/coli* trenutno

sadrži podatke o alelnim sljedovima i MLST profilima bakterijskih vrsta: *C. concisus/curvus*, *C. fetus*, *C. helveticus*, *C. hyointestinalis*, *C. insulaenigrae*, *C. lanienae*, *C. lari*, *C. sputorum* i *C. upsaliensis* (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). Jolley i sur. (2012.) godine opisuju novu metodu genotipizacije: rMLST (engl. *ribosomal MLST*), a 2013. godine Maiden i sur. metodu cgMLST (engl. *core genome MLST*). Metoda rMLST koristi podatke sekvenciranja podrijetlom od 53 gena koji kodiraju bakterijske ribosomske proteinske podjedinice, a cgMLST metoda 1 343 genska lokusa. Trenutno predložena *C. jejuni/C. coli* cgMLST v.1.0 shema za analizu humanih izolata pokazuje visoku razlučivost i mogućnost korištenja tijekom praćenja bolesti i u svrhu istraživanja izbijanja bolesti (Cody i sur. 2017). U pubMLST *C. jejuni/coli* bazi podataka opisano je (pregledom podataka u svibnju 2017. godine) više od 8800 MLST i više od 15000 cgMLST profila te više od 790000 sekvenci.

Izolati *C. jejuni* koji pripadaju u CC 21 i CC 45 često su izdvojeni u slučajevima pojave kampilobakterioze u ljudi, a potvrđeni su i u izolatima podrijetlom od kokoši, stoke, divljih životinja i vodenih sustava. Pojedini genotipovi izolata do sada su dokazani samo u nekih vrsta životinja te nisu do sada zabilježeni kao izolati ljudskog podrijetla (Dingle i sur., 2002., Ragimbeau i sur., 2008.). Istraživanja populacijske strukture pokazuje da je populacija *C. jejuni* slabo klonalna te se sastoji od velikih klonalnih kompleksa, koji uključuju izolate podrijetlom iz različitih izvora, ili se možda radi o izolatu izdvojenog iz jednog specifičnog izvora, poput izolata podrijetlom iz pješčanih plaža koji nije zabilježen u drugim izvorima (Dingle i sur., 2001.). Istraživanja Manning i sur. (2003.) pokazalo je preklapanja između klonalnih kompleksa ljudskih i životinjskih izolata (CC 45, CC 21, CC 61, CC 48), ali i da je ST 403 CC utvrđen

samo u govedih i svinjskih izolata, dok su CC 61 i CC 42 bili zastupljeni u velikom broju govedih i ovčjih izolata, a CC 45 u izolatima podrijetlom iz peradi. Utvrđeni klonalni kompleksi u izmetu divljih ptica u studiji Hughes i sur. (2009.) na području Sjeverne Engleske bili su: CC 48, CC 45, CC 353, CC 42, CC 179, CC 177 i CC 1275. Na području Novog Zelanda istraživani su uzorci izmeta divljih ptica uzorkovani s dječjih igrališta te je usporedbom ST i CC izolata utvrđeno da postoji povezanost između *Campylobacter* ST i prve introdukcije ptičjih vrsta, posebno čvorka, iz Velike Britanije u Novi Zeland prije 140 godina, jer se daljnom genetskom analizom izolata iz ovih geografski udaljenih područja pokazalo da sadašnji genotipovi potječu od istog pretka (French i sur., 2009.). Proučavanje prisutnosti kampilobaktera u vodenim sustavima Novog Zelanda i rezultati primjene MLST metode upućuju na zaključak kako su vjerojatno rijeke zagađene izmetom divljih ptica, no i na postojanje specifičnih izolata, jer je novoutvrđeni CC 2381 zabilježen samo u rijekama Novog Zelanda (Carter i sur., 2009.). U istraživanju provedenom na farmi u Škotskoj uzorci podrijetlom od puževa golaća, muha i izmeta preživača s lokalne farme bili su pozitivni na *C. jejuni* i *C. coli*, a isti ST prepoznati su među izolatima podrijetlom iz muha i izmeta, dok su ST izolirani iz puževa golaća bili jedinstveni i prvi puta opisani (Sproston i sur., 2010.). Mikulić i sur. (2016.) po prvi puta opisuju ST i CC *C. jejuni* i *C. coli* na području Republike Hrvatske, a podrijetlom iz svježeg pilećeg mesa.

Gel elektroforeza u pulsirajućem polju

Gel elektroforeza u pulsirajućem polju metoda je relativno slična postupku standardne elektroforeze u gelu, osim što se napon periodično mijenja između tri smjera: jedan prolazi centralnom osi

gela, i dva prolaze kutom od 120° sa svake strane. Vrijeme pulsiranja jednako je za svaki od smjerova, što rezultira da DNK migrira naprijed u obliku mreže. Sam postupak traje dulje od uobičajene gel elektroforeze obzirom na veličinu odsječka i činjenicu da DNK ne napreduje pravocrtno unutar gela. Ova se metoda koristi da bismo razdvojili DNK u elementarne dijelove uporabom izmjeničnih električnih polja i pomaknuli DNK kroz tanki agarozni gel. Uzorak DNK odsječka u gelu nakon izlaganja električnoj struji jedinstven je za svaki bakterijski soji podtip (tzv. "otisak prsta"). Metodu su opisali Schwartz i Cantor (1984.) godine od kada se neprestano usavršava. PulseNet International je internetska baza koja sadrži podatke o izolatima laboratorija diljem svijeta. Svojim standardiziranim protokolima, uključujući PFGE protokole za *C. jejuni* i druge patogene, omogućuje usporedivost rezultata genotipizacije izolata različitih laboratorija. Nedostatci metode su: vremenska dugotrajnost, visoka razina tehničkog umijeća, povremeno otežana interpretacija dobivenih obrazaca te naposljetku činjenica da određene sojeve nije moguće tipizirati PFGE metodom.

Ostale metode genotipizacije

Metoda analize duljine polimorfizma restriksijskih odsječaka (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*; RFLP) koja koristi restriksijske endonukleaze koje cijepaju DNK gena za flagelin (*fla*) – tzv. *fla*-RFLP. Genski lokus bakterije *C. jejuni* za flagelin sadrži dva gena (*flaA* i *flaB*) te oba posjeduju očuvane i varijabilne regije, pogodne za genotipizaciju, što je omogućilo razvoj više protokola koji se temelje na genotipizaciji flagelina (Wassenaar i Newell, 2000.).

Da bi se ustvrdile razlike među sojevima u istraživanjima se koristi i RAPD (engl. *Random Amplified Polymorphic DNA*) metoda tipizacije (Açik

i Çetinkaya 2006., Tang i sur., 2016.). Kao markeri pritom se koriste DNK odsječci dobiveni PCR amplifikacijom nasumičnih segmenata genomske DNK korištenjem početnice nasumičnog slijeda nukleotida.

Ribotipizacija je metoda genotipizacije DNK u kojoj se restrikcijskim enzimima cijepaju cijeli ili dijelovi genskih lokusa koji kodiraju za 16S ili 23S rRNK. Postoji više mogućih načina izvođenja ove metode, a najčešća je elektroforeza u agaroznom gelu enzimski cijepane genomske DNK nakon čega slijedi Southern blot hibridizacija s probom specifičnom za rRNK gen (Wassenaar i Newell, 2000.).

Sekvenciranje cijelog genoma (engl. *Whole Genome Sequencing*; WGS) je laboratorijski postupak koji određuje redoslijed nukleotidnih sljedova u genomu organizma (primjerice bakterije) u jednom procesu te je stoga metoda genotipizacije koja omogućuje najbolje razlikovanje. Cjelokupni genom bakterije *C. jejuni* NCTC 11168 sekvenciran je 2000. godine, ima kromosom od 1 641 481 parova baza (30,6% G+C), što je relativno malo u odnosu na druge bakterije, a predviđalo se da kodira za 1 654 proteina i 54 stabilne RNK vrste, s prosječnom dužinom gena od 948 parova baza te je s 94,3% genoma koji kodira za proteine jedan od najgušćih sekvenciranih genoma. (Parkhill i sur., 2000.). Gundogdu i sur. (2007.) napravili su ponovnu reanotaciju i ponovnu analizu *C. jejuni* NCTC 11168. Reanotacija je smanjila broj kodirajućih sekvenci na 1 643. Metoda sekvenciranja cijelog genoma revolucionarni je alat u mikrobiologiji koji postupno zamjenjuje ostale metode genotipizacije. U kombinaciji s epidemiološkim metodama WGS je u mogućnosti identificirati kako izvore, tako i putove prijenosa tijekom istraga izbijanja bolesti. Međutim, analiza podataka i njihova međulaboratorijska usporedba ostaju trenutno izazov za većinu javnozdravstvenih laboratorija (Llarena i Rossi, 2016.).

Sažetak

Različite metode genotipizacije omogućuju razlikovanje bakterijskih sojeva ispod razine vrste ili podvrste. Gel elektroforeza u pulsirajućem polju (PFGE) neprestano se usavršava od 1980-tih godina i do danas je upotrebljavaju mnogi javnozdravstveni laboratoriji. Od ostalih metoda koriste se: metoda analize duljine polimorfizma restrikcijskih odsječaka (RFLP), metoda nasumično umnoženih poliformnih odsječaka (RAPD) i metoda ribotipizacije. Određivanje redoslijeda nukleotidnih sljedova unutar DNK naziva se sekvenciranje. Na osnovi sekvenciranja bazira se rad novih metoda tipizacije određivanjem sljedova nukleotida na više genskih lokusa poput MLST, rMLST i cgMLST. One istražuju odnose između bakterija roda *Campylobacter*, posebice *C. jejuni* i *C. coli*. Korisne su u istraživanju mogućih izvora i rezervoara uzročnika bolesti, njihovih odnosa te molekularne epidemiologije bolesti. Metoda sekvenciranja cijelog genoma (WGS) u mikrobiologiji revolucionarna je metoda za koju se smatra da će postupno zamijeniti ostale metode genotipizacije.

Gljučne riječi: *Campylobacter* spp., razlikovanje sojeva, tipizacija sekvenciranjem, PFGE

Literatura

1. AÇIK, M. N. and B. ÇETINKAYA (2006): Random amplified polymorphic DNA analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy cattle and sheep. *J. Med. Microbiol.* 55, 331-334.
2. CARTER, P. E., S. M. MCTAVISH, H. J. L. BROOKS, D. CAMPBELL, J. M. COLLINS-EMERSON, A. C. MIDWINTER and N. P. FRENCH (2009): Novel clonal complexes with an unknown animal reservoir dominate *Campylobacter jejuni* isolates from river water in New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6038-6046.
3. CODY, A. J., J. E. BRAY, K. A. JOLLEY, N. D. MCCARTHY and M. C. J. MAIDEN (2017): A core genome multi-locus sequence typing scheme for stable, comparative analyses of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* human disease isolates. *J. Clin. Microbiol.* doi: 10.1128/JCM.00080-17. (in print)
4. DINGLE, K. E., F. M. COLLES, D. FALUSH and M. C. J. MAIDEN (2005): Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 340-347.

5. DINGLE, K. E., F. M. COLLES, D. R. A. WAREING, R. URE, A. J. FOX, F. E. BOLTON, H. J. BOOTSMA, R. J. L. WILLEMS, R. URWIN and M. C. J. MAIDEN (2001): Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39, 14-23.
6. DINGLE, K. E., F. M. COLLES, R. URE, J. A. WAGENAAR, B. DUIM, F. J. BOLTON, A. J. FOX, D. R. WAREING and M. C. MAIDEN (2002): Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 949-955.
7. FEIL, E. J., B. C. LI, D. M. AANENSEN, W. P. HANAGE and B. G. SPRATT (2004): eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* 186, 1518-1530.
8. FRENCH, N. P., A. MIDWINTER, B. HOLLAND, J. COLLINS-EMERSON, R. PATTISON, F. COLLES and P. CARTER (2009): Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from wild-bird fecal material in children's playgrounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 779-783.
9. HOLMES, E. C., R. URWIN and M. C. J. MAIDEN (1999): The influence of recombination on the population structure and evolution of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Mol. Biol. Evol.* 16, 741-749.
10. HUGHES, L. A., M. BENNETT, P. COFFEY, J. ELLIOTT, T. R. JONES, R. C. JONES, A. LAHUERTA-MARIN, A. H. LEATHERBARROW, K. MCNIFFEY, D. NORMAN, N. J. WILLIAMS and J. CHANTREY (2009): Molecular epidemiology and characterization of *Campylobacter* spp. isolated from wild bird populations in Northern England. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3007-3015.
11. JOLLEY, K. A., C. M. BLISS, J. S. BENNETT, H. B. BRATCHER, C. BREHONY, F. M. COLLES, H. WIMALARATHNA, O. B. HARRISON, S. K. SHEPPARD, A. J. CODY and M. C. J. MAIDEN (2012): Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology* 158, 1005-1015.
12. JOLLEY, K. A. and M. C. J. MAIDEN (2010): BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 11, 1-11.
13. KORCZAK, B. M., M. ZURFLUH, S. EMLER, J. KUHN-OERTLI and P. KUHNERT (2009): Multiplex strategy for Multilocus Sequence Typing, *fla* Typing, and genetic determination of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates collected in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1996-2007.
14. LLARENA, A.-K. and M. ROSSI (2016): Use of whole-genome sequencing in the epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections: state-of-knowledge. (in print)
15. MAIDEN, M. C. J., M. J. J. VAN RENSBURG, J. E. BRAY, S. G. EARLE, S. A. FORD, K. A. JOLLEY and N. L. D. McCARTHY (2013): MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 728-736.
16. MANNING, G., C. G. DOWSON, M. C. BAGNALL, I. F. H. AHMED, M. WEST and D. G. NEWELL (2003): Multilocus sequence typing for comparison of veterinary and human isolates of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6370-6379.
17. MIKULIĆ, M., A. HUMSKI, B. NJARI, M. OSTOVIĆ, S. DUVNJAK and Ž. CVETNIĆ (2016): Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in chicken meat in Croatia and multilocus sequence typing of a small subset of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *Food Technol. Biotechnol.* 54, 475-481.
18. MILLER, W. G., S. L. W. ON, G. W. WANG, S. FONTANOZ, A. J. LASTOVICA and R. E. MANDRELL (2005): Extended multilocus sequence typing system for *Campylobacter coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. helveticus*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2315-2329.
19. PARKHILL, J., B. W. WREN, K. MUNGALL, J. M. KETLEY, C. CHURCHER, D. BASHAM, T. CHILLINGWORTH, R. M. DAVIES, T. FELTWELL, S. HOLROYD, K. JAGELS, A. V. KARLYSHEV, S. MOULE, M. J. PALLEN, C. W. PENN, M. A. QUAIL, M. A. RAJANDREAM, K. M. RUTHERFORD, A. H. VAN VLIET, S. WHITEHEAD and B. G. BARRELL (2000): The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403, 665-668.
20. RAGIMBEAU, C., F. SCHNEIDER, S. LOSCH, J. EVEN and J. MOSSONG (2008): Multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and *fla* short variable region typing of clonal complexes of *Campylobacter jejuni* strains of human, bovine, and poultry origins in Luxembourg. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7715-7722.
21. SAILS, A. D., A. J. FOX, F. J. BOLTON, D. R. WAREING and D. L. GREENWAY (2003): A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1383-1390.
22. SCHWARTZ, D. C. and C. R. CANTOR (1984): Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
23. SPRATT, B. G., W. P. HANAGE, B. LI, D. M. AANENSEN and E. J. FEIL (2004): Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 129-134.
24. SPROSTON, E. L., I. D. OGDEN, M. MACRAE, K. J. FORBES, J. F. DALLAS, S. K. SHEPPARD, A. CODY, F. COLLES, M. J. WILSON and N. J. C. STRACHAN (2010): Multi-locus sequence types of *Campylobacter* carried by flies and slugs acquired from local ruminant faeces. *J. Appl. Microbiol.* 109, 829-838.
25. TANG, J. Y. H., M. I. KHALID, S. AIMI, C. A. ABUBAKAR and S. RADU (2016): Antibiotic resistance profile and RAPD analysis of *Campylobacter jejuni* isolated from vegetables farms and retail markets. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6, 71-75.
26. WASSENAAR, T. M., B. GEILHAUSEN and D. G. NEWELL (1998): Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1816-1821.
27. WASSENAAR, T. M. and D. G. NEWELL (2000): Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1-9.

Methods for isolation and identification of bacteria of the genus *Campylobacter* - genotyping methods (Part II)

Marina MIKULIĆ, DVM, PhD, Post-doctoral Researcher, Andrea HUMSKI, DVM, PhD, Scientific Advisor, Assistant Professor, Dora STOJEVIĆ, DVM, Young Researcher, Luka JURINOVIĆ, MSc Biol., PhD, Post-doctoral Researcher, Silvio ŠPIČIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Sanja DUVNJAK, MSc Mol. Biol., PhD, Post-doctoral Researcher, Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Academician, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Bela NJARI, DVM, PhD, Full Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia

Distinction of bacterial strains below the species or subspecies level is made possible by diverse genotyping methods. Many public health laboratories use pulsed field gel electrophoresis (PFGE), which has been constantly improving since the 1980s. Other methods used include restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) method and ribotyping. The process of determining the order of nucleotides within DNA is called sequencing. Newly evolved methods based on multilocus sequence typing are MLST, rMLST

and cgMLST. These examine the relationships between bacteria of the genus *Campylobacter*, especially *C. jejuni* and *C. coli*. They are useful in investigating possible sources and reservoirs of disease, their connection and the molecular epidemiology of diseases. A new revolutionary method in microbiology is whole genome sequencing (WGS), and it is believed that this method will gradually replace other genotyping methods.

Key words: *Campylobacter* spp., strain differentiation, sequence typing, PFGE