



Latvijas Lauksaimniecības Universitāte
Veterinārmedicīnas Fakultāte
Pārtikas un vides higiēnas institūts

Latvia University of Agriculture
Faculty of Veterinary Medicine
Institute of Food and Environmental Hygiene

Kaspars Kovaļenko

**TERMOFĪLĀS KAMPILOBAKTĒRIJAS BROILERCĀĻU GAĻAS
RAŽOŠANAS ĶĒDĒ LATVIJĀ**

**THERMOPHILIC *CAMPYLOBACTER* IN BROILER CHICKEN
MEAT
PRODUCTION CHAIN IN LATVIA**

Promocijas darba
KOPSAVILKUMS
Dr. med. vet. zinātniskā grāda iegūšanai

SUMMARY
of doctoral thesis
for scientific degree Dr. med. vet.

**PROMOCIJAS DARBA IZSTRĀDE UN NOFORMĒŠANA LĪDZFINANSĒTA ESF
NACIONĀLĀS PROGRAMMAS „ATBALSTS LLU DOKTORA STUDIJU
ĪSTENOŠANAI” IETVARĀ, LĪGUMA NR. 044-08/EF2.D1.21**

**DEVELOPMENT AND DESIGN OF THE DOCTORAL THESIS WAS ESF CO-
FINANCED:
ESF PROJECT SUPPORT FOR IMPLEMENTATION OF DOCTORAL STUDIES AT
LLU, AGREEMENT NO 044-08/EF2.D1.21**

Jelgava 2013

Promocijas darbs izstrādāts:

LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Pārtikas un vides higiēnas institūtā;
Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta BIOR Molekulārās
bioloģijas laboratorijā;
Igaunijas Dabaszinātņu universitātes Veterinārmedicīnas un dzīvnieku zinātņu
institūtā, Tartu, Igaunijā.

Research has been carried out at the:

Institute of Food and Environmental Hygiene of the Faculty of Veterinary Medicine,
Latvia University of Agriculture;
Laboratory of Molecular Biology of the Scientific Institute of Food Safety, Animal
Health and Environment BIOR;
Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences of the Estonian University of
Life Sciences, Tartu, Estonia.

Promocijas darba zinātniskie vadītāji:**Scientific supervisors:**

Dr.med.vet., asociētais profesors **Edgars Liepiņš**

Dr.med.vet., asociētais profesors **Mati Roasto**

Oficiālie recenzenti:**Official reviewers:**

Dr.med.vet., asociētā profesore **Vita Antāne**

Dr.sc.ing., profesore **Līga Skudra**

Dr.med.vet., LLU BVZI *Sigra* vadošā pētniece **Inese Zītare**

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2013. gada 27. jūnijā, plkst. 11:00
LLU Veterinārmedicīnas fakultātē, Jelgavā, K.Helmaņa ielā 8, 1. auditorijā.

The defence of the doctoral thesis will take place 27 June 2013 at 11:00 am, lecture
room No 1, Faculty of Veterinary Medicine of the Latvia University of Agriculture,
K.Helmana iela 8, Jelgava.

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes
Fundamentālajā bibliotēkā, Jelgavā, Lielajā ielā 2 un http://llu.fb.llu.lv/promoc_darbi.html

The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of
Agriculture, Lielā iela 2, Jelgava and http://llu.fb.llu.lv/promoc_darbi.html

ISBN 978-9984-861-44-9 (online)

SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS	5
Promocijas darba uzdevumi:	6
Darba zinātniskā novitāte:	6
Pētījuma rezultātu aprobācija	7
MATERIĀLS UN METODES	8
Broilercāļu paraugu ievākšana	8
Iegūto broilercāļu paraugu sagatavošana	9
Kampilobaktēriju kultūru izolēšana un identifikācija	9
Izolēto kampilobaktēriju antimikrobiālās jutības noteikšana	10
Kampilobaktēriju skaita ierobežošana putnu gaļā, izmantojot dažādas iepakojuma gāzu vides	11
Kampilobaktēriju skaita ierobežošana, izmantojot ozonētu ūdeni	12
Datu statistiskā apstrāde	12
PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA	13
Kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu paraugos no diviem lielākajiem broilercāļu ražošanas uzņēmumiem Latvijā	13
Kampilobaktēriju skaita ierobežošana broilercāļu liemeņu paraugos	20
Kampilobaktēriju sugas broilercāļiem un to produkcijā divās lielākajās kautuvēs Latvijā	21
No divu Latvijas lielāko broilercāļu ražošanas uzņēmumu broilercāļiem izolēto kampilobaktēriju antimikrobiālā rezistence	24
SECINĀJUMI	26
IETEIKUMI PRAKSEI	27
ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES	27
PATEICĪBA	28

CONTENTS

INTRODUCTION	29
Objectives of the research.....	30
Scientific novelty.....	30
The research results and approbation.....	30
MATERIALS AND METHODS.....	32
Sampling.....	32
Preparation of the samples obtained from broilers.....	33
<i>Campylobacter</i> culture isolation and identification	33
Isolated <i>Campylobacter</i> antimicrobial susceptibility testing	34
Limiting the number of <i>Campylobacter</i> in broiler chicken meat by different packaging atmospheres.....	34
Limiting the number of <i>Campylobacter</i> on meat samples by using ozonated water ...	35
Statistical data processing.....	36
RESULTS AND DISCUSSION	37
Limiting the number of <i>Campylobacter</i> in broiler carcass samples.....	41
<i>Campylobacter</i> species in broiler production at the two largest slaughterhouses in Latvia.....	42
Antimicrobial resistance of <i>Campylobacter</i> isolated from broiler chicken fecal samples obtained from the two major broiler chicken meat producing companies.....	44
CONCLUSIONS	47
RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE	48
ACKNOWLEDGEMENTS.....	48
SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND THESES	49

IEVADS

Vārds *Campylobacter* (kampilobaktērijas) ir cēlies no grieķu valodas vārda „kampylos”, kas nozīmē izliekts. Pirmo reizi organismus, kas, iespējams, bija kampilobaktērijas, aprakstīja Teodors Ešerihss 1880. gadā ar diareju slima bērna fekāliju paraugā (Friedman et al., 2000).

Kaut gan līdz 20. gadsimta septiņdesmito gadu beigām bija vairāki ziņojumi par kampilobaktēriju izraisītu diareju, tikai vēlāk apzināja kampilobaktērijas kā svarīgu cilvēku patogēnu (Skirrow, 1977). Tas ir skaidrojams ar kampilobaktēriju jutīgumu un ierobežoto spēju augt laboratorijas apstākļos. Mūsdienās attīstītajās valstīs *Campylobacter jejuni* un *C. coli* ir visbiežāk sastopamais bakteriālais zarnu trakta infekcijas izraisītājs cilvēkiem (Hänninen et al., 2003). Eiropā, ASV, Kanādā un citās industrializētājās valstīs kampilobakteriozes gadījumu skaits cilvēkiem katru gadu pieaug, un tas kopš 1998. gada pārsniedz salmonelozes gadījumu skaitu (Friedman et al., 2000). Kampilobakterioze izraisa nopietnas sociālekonomiskās sekas Eiropas Savienībā, kur reģistrēto gadījumu skaits 2007. gadā pārsniedza 200000 (EFSA, 2009), bet 2010. gadā 212064 (EFSA, 2012). Cilvēku kampilobakterioze parasti ir sporādiska, kuras gadījumā enterīts ir viegls vai pašlimitējošs, un parasti nav nepieciešama antibiotiku terapija (Allos and Blaser, 1995). Kampilobakteriozes infekciozā deva ir apmēram 500 *Campylobacter jejuni* šūnu uzņemšana, ko uzskata par salīdzinoši zemu infekciozo devu (Black et al., 1988). Kampilobakteriozes klīniskās pazīmes novēro 2 līdz 10 dienas pēc primārās inficēšanās, kas raksturojas ar drudzi, galvassāpēm, muskuļu sāpēm, sliktu dūšu un asiņainu caureju. Saslimšanas gadījumi nav smagi un simptomi beidzas nedēļas laikā. Dažos gadījumos infekcija var izplatīties uz citiem orgāniem un var skart asinsrites un nervu sistēmu. Kampilobaktēriju infekcija var izraisīt pēc-infekcijas komplikācijas, tādas kā: Millera – Fišera (Miller-Fisher) sindromu, reaktīvo artrītu, Gijēna – Barē (Guillain Barré) sindromu. Gijēna – Barē sindroms raksturojas ar autoimūniem procesiem, kuru rezultātā tiek demialinizēti nervaudi, kā rezultātā rodas parēzes un paralīzes (Patterson, 1995).

Vairāki epidemioloģiskie pētījumi norāda, ka svarīgs riska avots kampilobakteriozes izraisīšanā ir putnu gaļas lietošana uzturā vai darbs ar to (Friedman et al., 2000; Kapperud et al., 2003; Schönberg-Norio et al., 2004; EFSA, 2012). Augļu un dārzeņu krusteniskā kontaminācija no putnu gaļas tiek uzskatīta par vērā ņemamu kampilobakteriozes avotu (Kapperud et al., 2003). Vairākos pētījumos ir pierādīts, ka putnu liemeņi ar termofīlajām kampilobaktērijām no putnu zarnu trakta tiek kontaminēti kaušanas laikā (Mead et al., 1995; Newell et al., 2001; Stern et al., 2003).

Ir zināms, ka kampilobaktērijas var veidot antimikrobiālo rezistenci un visbiežāk rezistences veidošanās ir saistīta ar nepareizu antimikrobiālo līdzekļu izmantošanu dzīvniekiem un cilvēkiem. *Campylobacter* spp. antimikrobiālā rezistence ir palielinājusies galvenokārt sakarā ar fluorokvinolonu, makrolīdu un tetraciklīnu lietošanu lauksaimniecības dzīvniekiem. Pastāv briesmas, ka pret antibiotikām

rezistentās kampilobaktērijas var izplatīties no dzīvnieka uz cilvēku ar pārtikas ķēdi (Jacobs-Reitsma 1997; Piddock et al., 2000), tādēļ ir jāsamazina kampilobaktēriju prevalence.

Latvijā šāda veida pētījumi par kampilobaktēriju sugu sastopamību un to īpašībām līdz šim nav veikti.

Tādēļ šī **darba mērķis** bija izpētīt termofīlo kampilobaktēriju sastopamību, sugu izplatību, antimikrobiālo jutību, kā arī ierobežošanas iespējas broilercāļu gaļas ražošanas ķēdē Latvijā.

Promocijas darba uzdevumi:

1. noteikt termofīlo kampilobaktēriju sastopamību broilercāļu gaļas ražošanas ķēdē;
2. noteikt izolēto kampilobaktēriju sugas, izmantojot multipleks PĶR;
3. noteikt izolēto kampilobaktēriju antimikrobiālo jutību;
4. izpētīt iepakojuma gāzu vides ietekmi uz kampilobaktēriju dinamiku broilercāļu gaļā;
5. izpētīt kampilobaktēriju skaita dinamiku broilercāļu gaļā pēc apstrādes ar ozonētu ūdeni.

Lai izpildītu uzstādītos uzdevumus, ir jāizpēta termofīlo kampilobaktēriju sastopamība, sugu izplatība, antimikrobiālā jutība, kā arī kampilobaktēriju ierobežošanas iespējas broilercāļu gaļas ražošanas ķēdē Latvijā.

Darba zinātniskā novitāte:

1. pirmo reizi Latvijā tika veikti pētījumi par termofīlo kampilobaktēriju sastopamību Latvijā audzētos broilercāļos, broilercāļu kaklu ādās un broilercāļu liemeņos;
2. noskaidrotas biežāk sastopamās kampilobaktēriju sugas Latvijā audzētos broilercāļos un to gaļā izmantojot molekulārās bioloģijas metodes;
3. noskaidrota Latvijā audzēto broilercāļu kampilobaktēriju antimikrobiālā rezistence;
4. noskaidrota iepakojuma atmosfēras ietekme uz kampilobaktēriju skaita dinamiku broilercāļu gaļā uzglabāšanas laikā;
5. noskaidrota ozonēta ūdens ietekme uz kampilobaktēriju skaita dinamiku broilercāļu gaļā uzglabāšanas laikā.

Pētījuma rezultātu aprobācija

Pētījuma rezultāti aprobēti šādās starptautiskās zinātniskās konferencēs:

Roasto M., Mäesaar M., Muutra K., Meremäe K., Kovalenko K., Kramarenko T. *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* prevalence in 2012. FOODBALT-2013 conference, 23-24 May, 2013, Tallinn, Estonia.

Kovalenko K., Roasto M., Mäesaar M., Meremäe K., Kramarenko T. *Campylobacter* spp. prevalence in the Baltic States broiler chicken production. IAFP's European Symposium on Food Safety, 14-17 May, 2013, Marseille, France.

Kovaļenko K., Roasto M., Liepiņš E. The effect of air temperature on occurrence of thermophilic *Campylobacter* spp. in Latvia broiler chicken production on day of sampling. International scientific conference "Animals. Health. Food Hygiene". 22-23 November, 2012, Jelgava, Latvia.

Kovaļenko K., Roasto M. High occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Latvia broiler chicken production. IAFP's European Symposium on Food Safety, 21-25 May, 2012, Warsaw, Poland.

Kovaļenko K., Roasto M., Ruzaiķe A., Liepiņš E. *Campylobacter* spp. occurrence on broiler chicken carcasses at retail level in Latvia. International scientific conference "Research for Rural Development", 18-20 May, 2011, Jelgava, Latvia

Kovaļenko K., Ruzaiķe A., Roasto M., Liepiņš E. Dynamics of *Campylobacter jejuni* in raw poultry meat depending on packaging atmosphere. International scientific conference "Animals. Health. Food Hygiene". 29th October, 2010, Jelgava, Latvia.

Darba apjoms: promocijas darbs noformēts uz 120 lappusēm ar 36 attēliem, 12 tabulām un sastāv no anotācijas, ievada, literatūras apraksta, darba metodikas, pētījuma rezultātiem, diskusijas, secinājumiem, ieteikumiem praksei un izmantotās literatūras.

MATERIĀLS UN METODES

Pētījumā izmantoti 2400 fekāliju, 240 kakla ādas un 240 broilercāļu liemeņu paraugi no klīniski veseliem 40 – 42 dienas veciem „Ross 308” šķirnes broilercāļiem (*Gallus gallus domesticus*), kas bija audzēti divās lielākajās Latvijas broilercāļu saimniecībās un kauti šo pašu saimniecību kautuvēs (uzņēmums „A” un uzņēmums „B”). Gaļas paraugi noņemti arī no iepriekšminēto gaļas ražošanas uzņēmumu broilercāļu liemeņiem divās tirdzniecības vietās Jelgavā.

Paraugu bakterioloģiskā izmeklēšana un izolātu antimikrobiālā rezistence noteikšana veikta Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Pārtikas un vides higiēnas institūta Pārtikas infekciju laboratorijā.

Izolēto kultūru molekulārā izmeklēšana tika veikta Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskā institūta „BIOR” Molekulārajā bioloģijas laboratorijā un Latvijas valsts auglīkopības institūta Molekulārās bioloģijas laboratorijā.

Kopumā promocijas darbs tika izstrādāts no 2010. gada janvāra līdz 2012. gada martam.

Broilercāļu paraugu ievākšana

Nepieciešamais/minimālais paraugu apjoms kampilobaktēriju sastopamības noteikšanai tika noteikts, vadoties pēc Eiropas Komisijas lēmuma 2007/516/EK „Par Kopienas finansiālo atbalstu dalībvalstīs plānotam pētījumam attiecībā uz *Campylobacter* spp. izplatību broileru saimēs un to antimikrobiālo rezistenci un *Campylobacter* spp. un *Salmonella* spp. izplatību broileru liemeņos” B daļas, kas nosaka primārā un sekundārā parauga lielumu Latvijā (EK, 2007).

Broilercāļu fekāliju paraugi tika iegūti divās lielākajās Latvijas broilercāļu kautuvēs pēc putnu kaušanas un eviscerācijas, ievietojot 100 zarnu komplektus (visas tievās zarnas un visas resnās zarnas) plastmasas maisos, pa 10 zarnu komplektiem katrā.

Broilercāļu kakla ādu paraugi tika iegūti reizi mēnesī divās lielākajās Latvijas kautuvēs („A” un „B”) pēc putnu liemeņu dzesēšanas cikla beigām un pirms liemeņa iepakojšanas.

Broilercāļu liemeņu paraugi (viss broilercāļa liemenis) tika iegādāts divos lielveikalos tīklos Jelgavā, kuros tika pārdoti broilercāļu liemeņi no uzņēmuma „A” un uzņēmuma „B”. Liemeņi tika pārdoti svaigi, nesaldēti.

Broilercāļu gaļas paraugu (broilercāļu muguriņas) ievākšana kampilobaktēriju skaita ierobežošanai broilercāļu gaļā, izmantojot ozonētu ūdeni, tika veikta „PF Ķekava” veikalā „Ķekava” Jelgavā. Visu paraugu ražotājs bija AS „PF Ķekava”.

Broilercāļu gaļas paraugu (broilercāļu stilbiņi) ievākšana kampilobaktēriju skaita ierobežošanai, izmantojot iepakojšanu dažādās iepakojuma gāzu vidēs, tika veikta veikalā „Maxima”. Visu paraugu ražotājs bija AS „PF Ķekava”.

Visus paraugus pēc to iegūšanas ievietoja termosomās, kurās temperatūra nepārsniedz +6°C un 1 līdz 4 stundu laikā nogādāja laboratorijā tālāko izmeklējumu veikšanai.

Iegūto broilercāļu paraugu sagatavošana

Lai novērstu paraugu kontamināciju, visus zarnu trakta komplektus pirms izmeklējumu veikšanas apstrādājām ar 70% etanola šķīdumu. No katra kopparauga viena zarnu trakta aklās zarnas sienu ar sterilu skalpeli aseptiski atvērām un zarnas saturu 10 µl apmērā ar 10 µl mikrobioloģisko adatu uznesām tieši uz mCCDA agara (Oxoid, Lielbritānija, CM0739B) un Karmali agara (Oxoid, Lielbritānija, CM0935B) kampilobaktēriju noteikšanai. Fekāliju kopparaugu ieguvām, apvienojot 10 µl fekāliju paraugus no 10 broilercāļu aklajām zarnām, tādējādi iegūstot 100 µl fekāliju kopparauga, kas tika rūpīgi samaisīts, un 10 µl no šī kopparauga ar mikrobioloģisko adatu uznesām uz mCCDA agara un Karmali agara kampilobaktēriju klātbūtnes noteikšanai.

Kakla ādas pēc nogādāšanas laboratorijā izņēmām no maisiņiem ar sterilu pinceti un 10g no katras kakla ādas atdalījām ar sterilām grieznēm un ievietojām 100 ml Boltona buljona (Oxoid, Lielbritānija, CM0983B), kas pirms tam bija iepildīts plastmasas maisiņā. Tā sagatavots paraugs tika ievietots Stomahera aparātā, kur paraugs tika homogenizēts. Pēc homogenizēšanas plastmasas maisiņu ar paraugu un Boltona buljonu aiztaisīja tā, lai paliktu 1-2cm liela gaisa sprauga maisiņa augšējā daļā un ievietoja termostātā +37°C temperatūrā uz 4 – 6 stundām, bet tad +41.5°C uz 44±4 stundām bagātināšanai. Pēc bagātināšanas no bagātināšanas buljona virsmas ar 10µl mikrobioloģisko adatu paņēmām buljonu un uznesām uz mCCDA agara, tad 10µl buljona uznesām arī uz Karmali agara.

Broilercāļu liemeņu paraugu sagatavošana mikrobioloģiskai izmeklēšanai bija šāda: broilercāļa liemenis ar visu maisiņu, kurā tas bija iepakots, tika novietots uz galda ar vēderu uz leju stabilā pozīcijā. Tad ar grieznēm maisiņš virs broilercāļa muguras tika pārgriezts, tādējādi atsedzot liemeņa muguru. Tad, izmantojot sterilus instrumentus (pinceti un skalpeli), tika atdalīti 10g vistas ādas. Iegūto ādas paraugu tālāk sagatavoja tieši tāpat kā broilercāļu kakla ādas paraugus.

Kampilobaktēriju kultūru izolēšana un identifikācija

Pēc paraugu uznešanas uz mCCDA un Karmali agara barotnēm, tās nekavējoties ievietojām anaerobajos traukos (Oxoid, Lielbritānija, HP0011A) kopā ar vides nodrošinātāju (Oxoid, Lielbritānija, CN0035), kas pārveidoja atmosfēru traukos, nodrošinot mikroaerobus apstākļus - 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂, tādējādi radot optimālu atmosfēru kampilobaktēriju augšanai. Pēc trauku aizvēršanas paraugus ievietojām termostātā +41.5°C temperatūrā un inkubējām 44±4 stundas. Pēc inkubēšanas kolonijas, kas uz mCCDA bija bāli pelēkas, bet uz Karmali agara caurspīdīgas, pārsējām uz Kolumbijas asins agara (CBA) (Oxoid, Basingstoke,

Hemšīra, Lielbritānija) un inkubējām 40-48 stundas mikroaerobos apstākļos +41.5°C temperatūrā.

Pēc primāro bioķīmisko testu veikšanas un mikroskopiskās izmeklēšanas 2-3 kolonijas ievietojam stobriņā ar Sirds – smadzeņu infūzijas buljonu (Brain-heart infusion broth, OXOID, Lielbritānija), kam bija pievienoti 5% glicerīna. Šie stobriņi nekavējoties pēc aizvēršanas tika ievietoti saldētavā -70°C temperatūrā.

Lai noteiktu izolēto kampilobaktēriju sugu, izmantojam koloniju multiplex polimerāzes ķēdes reakcija (Wang et al., 2002), kas ir balstīta uz vairāku gēnu vienlaicīgu noteikšanu. Lai noteiktu *Campylobacter* spp., izmantojam 23s rRNA gēnu, nosakot *C. jejuni* *hipO* gēnu, bet nosakot *C. coli* un *C. lari* *glyA* gēnu.

Sugas noteikšanai nejaušā secībā atlasījām 74 sasaldētas izolēto kampilobaktēriju kultūras (50 no saimniecības „A” un 24 no saimniecības „B”), ko atkausējām un 10µl no katra stobriņa uznesām uz Kolumbijas asins agara, un inkubējām 48 stundas 41.5°C temperatūrā, mikroaerobos apstākļos. Pēc inkubēšanas un DNS izdalīšanas visiem 74 atšķaidītajiem paraugiem, „BIOR” Molekulārās bioloģijas laboratorijā veicām koloniju multiplex PĶR, izmantojot Wang et al., 2002 aprakstīto metodi.

Pēc PĶR veikšanas 10µl katru parauga sajaucam ar 2µl DNS krāsošanas krāsvielas (6X DNA Loading Dye, Fermentas, Lietuva) un tad uznesam uz 1.5% agarozes gēla, kas pirms tam bija ievietots horizontālās elektroforēzes iekārtā (GE Heltcare, ASV). Agarozes gēls sastāvēja no agarozes (Sigma-Aldrich Corporation, ASV), EDTA bufera (MerckKGaA, Darmstad, Vācija) un etidija bromīda. Pēc gēla aizpildīšanas ar iekrāsoto paraugu uzsākām agarozes gēla elektroforēzi (30 minūtes, 120V, 130mA). Kad elektroforēzes cikls bija noslēdzies, agarozes gēlu ievietojam transluminatorā (Syngene, Lielbritānija), lai veiktu elektroforēzes izvērtēšanu un nofotografētu iegūto rezultātu.

Izolēto kampilobaktēriju antimikrobiālās jutības noteikšana

Pēc visu paraugu morfoloģiskās, bioķīmiskās izmeklēšanas nejaušā secībā izvēlētiem 60 kampilobaktēriju izolātiem (30 no katras saimniecības) noteicām antimikrobiālo rezistenci. Antimikrobiālās rezistences noteikšanai izmantoja *Vet MicCamp* ver.2 (SVA, Upsala, Zviedrija) minimālās inhibitorās koncentrācijas noteikšanas testu, kas balstīts uz buljona mikroatšķaidījuma metodi, kad nosaka minimālo antibiotisko līdzekļu inhibitoro koncentrāciju, pie kuras nenovēro kampilobaktēriju augšanu.

Pēc atkausēšanas paraugus uznesām uz Kolumbijas asins agara un plates ievietojam anaerobajos traukos ar vides radītāju. Paraugus inkubējām +41.5°C temperatūrā, 44±4 stundas. Pēc tam mikroskopiski noteicām baktēriju morfoloģiju un kustības.

Testa sagatavošanai izmantojam katjonu līdzsvarotu Millera Hintona buljonu (Cation Adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB), OXOID, Lielbritānija), kam pievienotas 5-10% lizētas zirgu asinis. Desmit ml sī šķīduma pievienojām 100µl fizioloģisko šķīdumu ar 10⁸ KVV/ml kampilobaktēriju suspensijas. Katru *Vet Mic*

Camp testa iedobīti piepildījām ar 100µl šāda maisījuma. Izmantojot šo testu, noteicām kampilobaktēriju antimikrobiālo rezistenci pret šādām antibiotikām: eritromicīnu, ciprofloksacīnu, tetraciklīnu, streptomcīnu, gentamicīnu un nalidiksīnskābi. Pēc visu iedobīšu aizpildīšanas testa plates ievietojām termostatā 37°C temperatūrā mikroaerobos apstākļos uz 48 stundām. Pēc inkubācijas perioda beigām rezultātus tika nolasījām, izmantojot tumšu fonu. Par rezistences robežu tiek uzskatīta pēdējā iedobe, kurā novēro baktēriju augšanu, kas var izskatīties gan kā gaišāks punkts iedobes dibenā, gan kā viegla barotnes saduļļošanās (SVARM, 2010).

Disku difūzijas metodi izmantojām kā kontroles metodi *Vet Mic Camp* testam. Ar disku difūzijas metodi noteicām antimikrobiālo rezistenci 10 kampilobaktēriju celmiem, kuriem paralēli veicām *Vet Mic Camp* testu. Šajā metodē rezistenci noteicām pret tiem pašiem antibiotiskajiem līdzekļiem kā *Vet Mic Camp* testā.

Kampilobaktēriju skaita ierobežošanas putnu gaļā, izmantojot dažādas iepakojuma gāzu vides

Pētījumam izmantojām 27 vistas gaļas paraugus (svaigi vīstu stilbiņi), kas tika iegādāti veikalā „Maxima”. Visu paraugu ražotājs bija a/s „PF Ķekava”.

Paraugu sagatavošana tika veikta LLU Veterinārmedicīnas fakultātes Pārtikas un Vides higiēnas institūta pārtikas infekciju laboratorijā šādā secībā:

Iepriekš izolētais *Campylobacter jejuni* celms tika atkausēts no -70°C līdz istabas temperatūrai. Desmit mikrolitru atkausētās barotnes ar mikropipeti pārnesa uz Kolumbijas asins agara (Columbia blood agar, OXOID, Anglija). Barotnes inkubējām vadoties pēc ISO 10272-2: 2006 metodes.

Parauga inokulēšanu ar kampilobaktērijām veicām no iepriekš iegūtās tīrkultūras, pagatavojot baktēriju un fizioloģiskā šķīduma suspensiju. 10 ml fizioloģiskā šķīduma atšķaidījām 10 µl kampilobaktēriju tīrkultūras, tādējādi iegūstot atšķaidījumu 10^{-3} KVV. Šo baktēriju suspensiju pievienojām visiem gaļas paraugiem, kas pirms tam bija ievietoti Stomahera maisīnā. Pēc tam divas minūtes paraugi rūpīgi tika „mīcīti”.

Vienam kontroles paraugam noteicām kontaminācijas pakāpi, izmantojot ISO 10272-2: 2006 metodi.

Pēc inokulācijas veikšanas gaļas paraugus nogādājām LLU Pārtikas tehnoloģijas fakultātē un iepakojām dažādās gāzu vidēs. Piecus no paraugiem iepakojām vakuumā, piecus paraugus MAP (gāzu maisījuma sastāvs – CO₂ = 43.8%, O₂ = 0.2%, N₂ = 57%) un piecus gaisa atmosfērā. Pēc iepakojšanas paraugus uzglabājām temperatūrā no +2°C līdz +4°C.

Ik pēc 48 stundām no paraugu sagatavošanas sākuma pārbaudījām visus trīs paraugu veidus, ņemot 10g ādas parauga un izmeklējot pēc ISO 10272-1:2006 un ISO 10272-2:2006 metodēm. Kopumā pētījums ilga 192 stundas.

Kampilobaktēriju skaita ierobežošana, izmantojot ozonētu ūdeni

No astoņpadsmit paraugiem četrus kontroles paraugus ievietojam sterilos, marķētos maisiņos un nekavējoties ievietojam $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūrā, nepakļaujot tos apstrādei ar ozonētu ūdeni.

No divu paraugu virsmām (ādas) noņemam virsmas noslaucījumus ar steriliem vates tamponiem no 1cm^2 liela laukuma. Izmantojot tiešo pārsēšanas metodi veicām uzskaitu uz mCCDA (Modificētā ogles cefoperazona dezoksiholāta agars) (Oxoid, Lielbritānija) – *Campylobacter* spp. klātbūtnes noteikšanai.

Atlikušos 12 paraugus uzskaitām uz speciāli eksperimentam sagatavotām stieplēm. Paraugus izvietojām tā, lai tie savā starpā nesaskartos un apstrādes laikā atrastos vienādā stāvoklī. Pēc paraugu izvietojšanas un sagatavošanas sekoja tūlītēja apstrāde ar ozonētu ūdeni.

Paraugu sagatavošanas laikā paralēli sagatavojām ozonētu ūdeni ar koncentrāciju 2.3 mg/l un ūdens temperatūru $7.2^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

Ozonētā ūdens sagatavošana noritēja šādi: Ozona ģeneratorā „SOZ-Yob-10g”, kura darbībā, pamatojoties uz ozona veidošanas augstsprieguma strāvas ietekmē, tiek saražots ozons, kuru pēc tam ar miksera 25UP palīdzību izšķīdina ūdenī, radot ar ozonu piesātinātu ūdeni.

Uz visiem divpadsmit paraugiem no vienāda attāluma nepārtraukti izsmidzināja ozonētu ūdeni, radot pēc iespējas līdzīgākus apstākļus dzesēšanas procesam gaļas pārstrādes uzņēmumos. Pirmos četrus paraugus ar ozonētu ūdeni apstrādāja 25 minūtes, nāamos četrus paraugus apstrādāja 35 minūtes, bet pēdējos četrus - 45 minūtes. Tūlīt pēc apstrādes visus paraugus noņēma un ievietoja marķētos, sterilos maisiņos, kurus nekavējoties aizkausēja.

Pēc apstrādes ar ozonētu ūdeni visi paraugi tika nogādāti uzglabāšanai $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperatūrā.

Mikrobioloģiskās analīzes tika veiktas pēc 120 stundu ilgas produktu uzglabāšanas, izmantojot ISO 10272-2 (2006) metodi.

Datu statistiskā apstrāde

Pētījuma rezultātu datu ievadei izmantojām datorprogrammu MS Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmonda, Vašingtona, ASV). Lai noteiktu Pīrsona korelāciju, veiktu korelācijas analīzi, Studenta t-testu, noteiktu vidējos rādītājus un standartklāvu, veicām datu statistisko analīzi, izmantojot Statistical Package R: A language and environment for statistical computing (Vīne, Austrija) datorprogrammu. Atšķirības rādītājos kā statistiski būtiskas pie būtiskuma līmeņa $\alpha=0.05$.

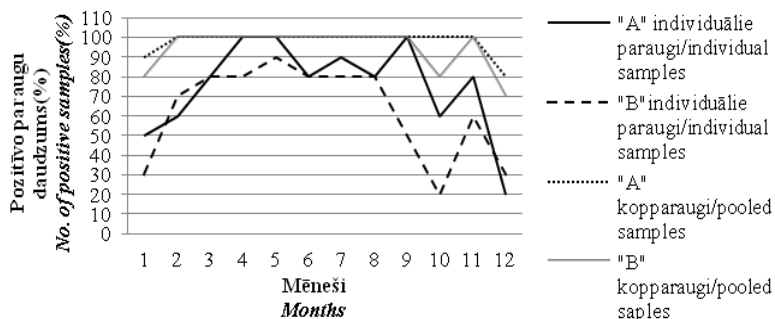
PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu paraugos no diviem lielākajiem broilercāļu ražošanas uzņēmumiem Latvijā

Pētījuma laikā no 240 broilercāļu fekāliju kopparaugiem vidēji 95.8% gadījumu tika izolētas kampilobaktērijas. Kopumā kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu fekāliju kopparaugos Latvijā 2010. gadā ir augstāka, salīdzinot ar pieejamajiem datiem par kampilobaktēriju sastopamību broilercāļu fekāliju kopparaugos Polijā, Somijā un Čehijā (2008. gadā) (EFSA, 2010^b). Savukārt broilercāļu fekāliju individuālajos paraugos kampilobaktērijas tika atrastas vidēji 68.8% gadījumu. Kampilobaktēriju pozitīvo fekāliju kopparaugu un individuālo paraugu skaits abās saimniecībās bija salīdzinoši augsts, jo saimniecībā „A” tas sastādīja 97.5% fekāliju kopparaugiem un 75% fekāliju individuālajiem paraugiem, bet saimniecībā „B” attiecīgi 94.1% un 62.5%.

Kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu fekāliju kopparaugos un individuālajos fekāliju paraugos 2010. gadā parādīta 1. attēlā.

Analizējot kampilobaktēriju sastopamību individuālajos fekāliju paraugos uzņēmumā „A” atkarībā no paraugu ievākšanas mēneša un salīdzinot to ar vidējo kampilobaktēriju sastopamību uzņēmuma „A” individuālajos fekāliju paraugos (75%), tā būtiski ($p < 0.05$) augstāka bija novērojama aprīlī, maijā un septembrī (100%), bet būtiski ($p > 0.05$) zemāka janvārī (50%), februārī (60%), oktobrī (60%) un decembrī (20%). Bet uzņēmuma „B” individuālajos fekāliju paraugos būtiski ($p < 0.05$) augstāka kampilobaktēriju sastopamība bija novērojama martā, aprīlī, jūnijā, jūlijā, augustā (80%) un maijā (100%), bet būtiski zemāka janvārī (30%), oktobrī (20%) un decembrī (30%), salīdzinot to ar vidējo kampilobaktēriju sastopamību uzņēmuma „B” (62.5%) individuālajos fekāliju paraugos 2010. gadā.



1.att.Campylobacter spp. sastopamība broilercāļu fekāliju kopparaugos un individuālajos paraugos no uzņēmuma „A” un „B”

Fig. 1. Occurrence of Campylobacter spp on pooled fecal samples and individual fecal samples from company A and B

Kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu fekāliju kopparaugos no uzņēmuma „A” būtiski ($p<0.05$) zemāka bija decembrī (80%), bet no uzņēmuma „B” janvārī (80%), oktobrī (80%) un decembrī (70%), salīdzinot to ar kampilobaktēriju vidējo sastopamību uzņēmuma „A” un „B” fekāliju kopparaugos (attiecīgi 97.5% un 94.1%).

Dalot gadu gadalaikos pa trijiem mēnešiem katrā (ziema – decembris, janvāris, februāris; pavasaris – marts, aprīlis, maijs; vasara – jūnijs, jūlijs, augusts; rudens – septembris, oktobris, novembris), tika novērots, ka vidējā kampilobaktēriju sastopamība individuālajos fekāliju paraugos būtiski ($p<0.05$) zemāka bija ziemā (43.3%), salīdzinot to ar vidējo kampilobaktēriju sastopamību pavasarī (88.3%) un vasarā (81.7%). Rudenī vidējā kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu individuālajos fekāliju paraugos (61.7%) bija būtiski ($p<0.05$) augstāka nekā ziemā un būtiski ($p<0.05$) zemāka kā pavasarī, bet salīdzinājumā ar sastopamību vasarā nebija būtiskas atšķirības ($p>0.05$). Vidējā kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu fekāliju kopparaugos viszemākā bija ziemā (88.3%), bet šī atšķirība nebija statistiski būtiska ($p>0.05$), salīdzinot to ar vidējo kampilobaktēriju sastopamību broilercāļu fekāliju kopparaugos pavasarī, vasarā (100%) un rudenī (96.7%).

Citās Eiropas Savienības valstīs kampilobaktēriju sastopamība individuālajos fekāliju paraugos 2006., 2007. un 2008. gadā svārstījās vidēji no 21.7% līdz 25.2% ar viszemāko kampilobaktēriju sastopamību 2006. gadā Igaunijā un Islandē un 2007. gadā Igaunijā, kur no visiem izmeklētajiem paraugiem netika atrasts neviens kampilobaktēriju pozitīvs paraugs. Visaugstākā kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu fekāliju individuālajos paraugos pēc EFSA datiem bija novērojama 2007. gadā Itālijā, kur 82.8% izmeklēto paraugu tika konstatētas kampilobaktērijas (EFSA, 2010^b).

Līdzīgi kā citos pētījumos, kad kampilobaktēriju sastopamība broilercāļiem vienas valsts teritorijā esošajās broilercāļu saimniecībās var variēt, arī Latvijā var novērot atšķirību par 12.5% starp divām lielākajām broilercāļu saimniecībām „A” un „B” (Zweifel et al., 2008; Saleha, 2002; O'Mahony et al., 2011).

Vairākos pētījumos ir pierādīts, ka kampilobaktērijas visbiežāk uz liemeņa ir atrodamas tieši broilercāļu kakla ādās salīdzinājumā ar citām broilercāļu liemeņa daļām (Baré et al., 2013; Malher et al., 2011), tādēļ, ņemot paraugus kautuvē, tika izvēlēti liemeņa reģioni ar iespējami visaugstāko kampilobaktēriju līmeni. Pētījuma ietvaros tika ievākti 240 broilercāļu kakla ādās paraugi no divām lielākajām Latvijas broilercāļu ražošanas uzņēmumu kautuvēm. Šajos paraugos kampilobaktērijas tika konstatētas vidēji 60.8% ($n=146$) gadījumu, kas kopumā atbilst arī citu autoru veiktajiem pētījumiem, kad kampilobaktērijas tika konstatētas 15.3% Vjetnamā, 96.7% Jaunkaledonijā, bet Šveicē un Itālijā attiecīgi 70% un 40% gadījumu (Garin et al., 2012; Kuhnert et al., 2012; Pepe et al., 2009). Uzņēmumā „A” kampilobaktērijas konstatētas 69.2% ($n=83$), bet uzņēmumā „B” 52% ($n=63$) paraugu. Salīdzinot kampilobaktēriju sastopamību broilercāļu kakla ādās paraugos pa mēnešiem uzņēmumā „A” un „B”, ir novērojams, ka būtiski ($p<0.05$) zemāka kampilobaktēriju sastopamība šajā paraugu veidā bija uzņēmumā „B” aprīlī, maijā un septembrī. Citos

mēnešos kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu kakla ādas paraugos no uzņēmuma „A” un „B” nebija būtiski atšķirīga ($p>0.05$).

Kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu kakla ādas paraugos uzņēmumā „A”, salīdzinot to ar vidējo kampilobaktēriju sastopamību uzņēmuma „A” broilercāļu kakla ādas paraugos (69.2%), tā būtiski ($p<0.05$) zemāka ir novērojama janvārī (20%), jūlijā (40%) un decembrī (40%). Bet uzņēmuma „B” broilercāļu kakla ādas paraugos būtiski ($p<0.05$) augstāka kampilobaktēriju sastopamība bija novērojama jūlijā (90%), bet būtiski zemāka janvārī (20%), salīdzinot to ar vidējo kampilobaktēriju sastopamību uzņēmuma „B” broilercāļu kakla ādas paraugos 2010. gadā (52.5%). Visbiežāk broilercāļu kakla ādas tiek kontaminētas ar kampilobaktērijām broilercāļu eviscerācijas un atspalvošanas laikā, kad kampilobaktērijas no zarnu trakta ar skalošanas ūdeni notek uz kakla ādām un sakrājas spalvu folikulos un ādas krokās (Cason et al., 2004; Guerin et al., 2010; Son et al., 2007). Kampilobaktēriju sastopamība kakla ādas paraugos no uzņēmuma „A” bija par 16.7% augstāka nekā paraugiem no uzņēmuma „B”, kas gan nebija statistiski būtiska ($p>0.05$). Iespējams, kampilobaktēriju sastopamības atšķirība kakla ādās ir skaidrojama ar to, ka kampilobaktērijas uzņēmuma „A” broilercāļu individuālajos fekāliju paraugos bija sastopamas par 12.5% biežāk nekā paraugos no uzņēmuma „B”, kas tādējādi varēja palielināt risku kampilobaktērijām no zarnu trakta nonākt uz broilercāļu kakla ādām.

Līdzīgi kā fekāliju paraugiem, arī kakla ādas paraugiem no kautuves „A” un „B”, kampilobaktēriju sastopamība bija būtiski ($p<0.05$) zemāka ziemā (40%) un rudenī (55%), salīdzinot to ar kampilobaktēriju pozitīvo paraugu skaitu kakla ādas paraugos vasarā (75%) un pavasarī (73.3%). Kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu kakla ādas paraugos pavasarī un rudenī uzņēmumā „A” bija būtiski ($p<0.05$) augstāka nekā uzņēmumā „B”, attiecīgi pavasarī par 33.3%, bet rudenī par 30% (1. tabula).

1. tabula / Table 1

Kampilobaktēriju sastopamība kakla ādu paraugos atkarībā no gadalaika
Occurrence of *Campylobacter* positive neck skin samples depending on season

Uzņēmums / Company	Pozitīvo kakla ādu paraugu skaits (%) / Number of positive neck skin samples (%)			
	Ziema / Winter	Pavasaris / Spring	Vasara / Summer	Rudens / Autumn
„A”	12(40)	27(90)	23(76.7)	21(70)
„B”	12(40)	17(56.7)	22(73.3)	12(40)
Kopā / Total	24(40)	44(73.3)	45(75)	33(55)

No izmeklētajiem 240 broilercāļu liemeņu paraugiem 59.2% ($n=142$) paraugu tika konstatētas *Campylobacter* spp. Kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu liemeņos no uzņēmuma „A” bija 71.7% bet no uzņēmuma „B” 46.7%. Jāatzīmē, ka

visaugstākā kampilobaktēriju sastopamība gan uzņēmuma „A”, gan uzņēmuma „B” liemeņu paraugos bija vērojama vasarā, pavasarī, bet zemāka ziemā un rudenī (2. tabula).

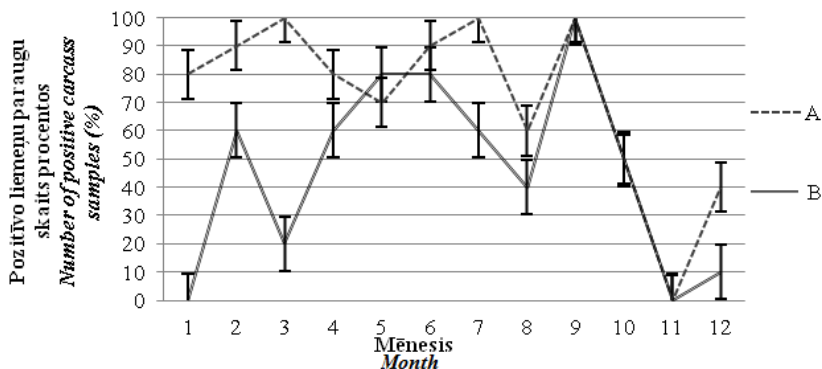
2. tabula / Table 2

Kampilobaktēriju sastopamība liemeņu paraugos atkarībā no gadalaika
Occurrence of *Campylobacter* positive carcass samples depending on season

Uzņēmums / Company	Pozitīvo liemeņu paraugu skaits (%) / Number of positive carcass samples (%)			
	Ziema / Winter	Pavasaris / Spring	Vasara / Summer	Rudens / Autumn
„A”	21(70)	25(83.3)	25(83.3)	15(50)
„B”	7(23.3)	16(53.3)	18(60)	15(50)
Kopā	28(43.3)	41(68.3)	43(71.7)	30(50)

Tāpat kā fekāliju individuālajiem paraugiem un kakla paraugiem, kampilobaktēriju sastopamība visaugstākā ir novērojama pavasara, vasaras un rudens mēnešos, ar būtiski ($p < 0.05$) zemāku sastopamību ziemā. Kopumā mērenā klimata joslā kampilobaktēriju sastopamība dzīvnieku gaļas produktos visaugstākā parasti ir novērojama tieši siltajos gada mēnešos, kad vienlaicīgi arī cilvēkiem ir novērojams vislielākais kampilobakteriozes gadījumus skaits (Friedman et al., 2000; EFSA, 2012; EFSA, 2010^b; EFSA, 2008).

Kampilobaktēriju sastopamība liemeņu paraugos atkarībā no parauga ievākšanas mēneša ir parādīta 2. Attēlā.



2. att. *Campylobacter* spp. sastopamība broilercāļu liemeņu paraugos no uzņēmuma „A” un „B”

Fig. 2. Occurrence of *Campylobacter* spp. on broiler chicken carcass samples from company A and B

Salīdzinot kampilobaktēriju sastopamību broilercāļu liemeņu paraugos uzņēmumā „A” un „B” 2010. gadā, ir novērojams, ka būtiski ($p < 0.001$) augstāka kampilobaktēriju sastopamība ir uzņēmumā „A” janvārī un martā. Šajos mēnešos kampilobaktērijas no uzņēmuma „B” broilercāļu liemeņu paraugiem tika izolētas par 80% retāk, jo salīdzinājumā ar kampilobaktēriju sastopamību liemeņu paraugos uzņēmumā „A” janvārī (80%) un martā (100%), uzņēmumā „B” kampilobaktēriju sastopamība šajā paraugu veidā martā bija 20%, bet janvārī netika konstatēts neviens pozitīvs paraugs. Vēl būtiski ($p < 0.05$) augstāka kampilobaktēriju sastopamība liemeņu paraugos uzņēmumā „A” bija novērojama jūlijā (100%), kad kampilobaktēriju sastopamība liemeņu paraugos no uzņēmuma „B” bija 60%. Citos mēnešos kampilobaktēriju sastopamībā broilercāļu liemeņu paraugos no uzņēmuma „A” un „B” nebija būtisku atšķirību ($p > 0.05$).

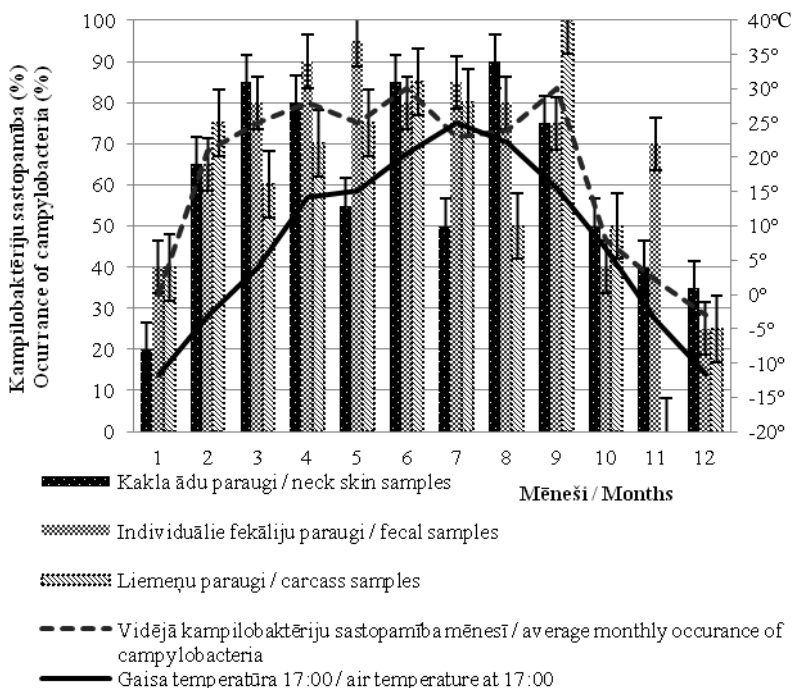
Uzņēmumā „A” vidējā kampilobaktēriju sastopamība liemeņu paraugos (71.7%) bija būtiski ($p < 0.05$) zemāka salīdzinājumā ar vidējo kampilobaktēriju sastopamību liemeņu paraugos uzņēmumā „B” (46.7%). Kampilobaktēriju vidējā sastopamība uzņēmumā „B” bija būtiski ($p < 0.05$) augstāka salīdzinājumā ar sastopamību janvārī (0%), novembrī (0%) un decembrī (10%), bet būtiski ($p < 0.05$) zemāka salīdzinājumā ar sastopamību septembrī (100%). Starp kampilobaktēriju sastopamību liemeņu paraugos uzņēmumā „B” novembrī, janvārī, decembrī un martā nenovēro būtiskas ($p > 0.05$) atšķirības, bet, salīdzinot šo mēnešu kampilobaktēriju sastopamību ar kampilobaktēriju sastopamību liemeņu paraugos februārī, aprīlī, maijā, jūnijā, jūlijā un septembrī, ir redzams, ka tā ir būtiski ($p < 0.05$) zemāka. Kampilobaktēriju sastopamība liemeņu paraugos uzņēmumā „B” septembrī nebija būtiski ($p > 0.05$) augstāka kā maijā (80%) un jūnijā (80%).

Starp kampilobaktēriju sastopamību broilercāļu liemeņos, fekāliju individuālajos paraugos un kakla ādu paraugos nebija novērojama būtiska ($p > 0.05$) atšķirība ne uzņēmumā „A”, ne „B”, to iespējams var skaidrot ar to, ka kampilobaktēriju skaits būtiski nesamazinās liemeņu dzesēšanas procesa nepilnību dēļ, jo ir pierādīts, ka liemeņu dzesēšana, izmantojot gaisa dzesēšanas sistēmas, būtiski samazina kampilobaktēriju un *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaitu (Sanchez et al., 2002; Rosenquist et al., 2003; EFSA, 2011^b). Zemāka kampilobaktēriju sastopamība broilercāļu liemeņos salīdzinājumā ar kakla ādu paraugiem, iespējams, ir skaidrojama ar liemeņu uzglabāšanu veikalos, kuras laikā kampilobaktēriju skaits uz tiem samazinās skābekļa kaitīgās ietekmes dēļ (Rajkovic et al., 2010; Cardinale et al., 2003; Boysen et al., 2007). Jāņem vērā arī tas, ka atšķirīgās paraugu ņemšanas vietās uz liemeņa kampilobaktēriju daudzums var atšķirties, jo, piemēram, kakla ādā kampilobaktērijas ir biežāk sastopamas lielāku spalvu folikulu dēļ, kuros liemeņu skalošanas laikā kampilobaktērijas bieži tiek ieskalotas un spēj tur izdzīvot ilgāk, izvairoties no gaisa skābekļa kaitīgās ietekmes. Salīdzinājumā spalvu folikuli uz broilercāļu liemeņu muguras ir mazāki (Berndtson et al., 1992; Chantarapanont et al., 2003; Cason et al., 2004^b). Kampilobaktēriju skaitu un klātbūtni var ietekmēt arī izvēlēta liemeņa izmeklēšanas metode, jo liemeni ir iespējams izmeklēt, to visu skalojot buferšķīdumā, vai arī izmeklējot tikai daļu tā

ādas, visbiežāk apjomā no 10 – 25g. Lai gan izmantojot visa liemeņa skalošanas metodi var iegūt lielāku kampilobaktēriju skaitu, kampilobaktēriju klātbūtnes noteikšanai šī metode salīdzinājumā ar ādas parauga izmeklēšanas metodi būtiski neatšķiras (ISO, 2006; Scherer et al., 2006; Musgrove et al., 2003).

Šajā pētījumā, analizējot kampilobaktēriju sastopamības atšķirības starp divām kautuvēm, no kurām tika iegūti broilercāļu liemeņu paraugi, tika konstatēta būtiski ($p<0.05$) augstāka kampilobaktēriju sastopamība uzņēmumā „A”, bet, salīdzinot kampilobaktēriju sastopamību broilercāļu kakla ādu paraugos no šiem uzņēmumiem, būtisku ($p>0.05$) atšķirību nenovēroja, iespējams, skaidrojums varētu būt dažādās liemeņu iepakojšanas metodes, ko izmanto uzņēmums „A” un „B” liemeņu iepakojšanai. Liemeņi no kautuves „A” bija iepakoti liemenim cieši pieguļošā polietilēna plēves iepakojumā, atšķirībā no kautuves „B”, kur liemeņi bija iepakoti brīvos, cieši nepieguļošos polietilēna maisiņos. Kā rāda pētījumi, broilercāļu liemeņu iepakojšana ciešā polietilēna plēves iepakojumā var nodrošināt aizsardzību no gaisa skābekļa kaitīgās ietekmes uz kampilobaktēriju šūnām, samazinot to oksidatīvo stresu, kā arī pagarinot un palielinot to izdzīvošanas iespējas salīdzinājumā ar liemeņiem, kas ir iepakoti liemenim nepieguļošā iepakojumā (Garénaux et al., 2008; Kovaļenko et al., 2010; Harrison et al., 2001).

Interpretējot iegūtos datus saistībā ar kampilobaktēriju sastopamību atkarībā no gadalaika, kurā paraugs ir ticis ievākts, ir novērojama sezonālā variācija ar augstāko kampilobaktēriju izolēšanas biežumu fekāliju paraugos pavasara, vasaras un rudens mēnešos, bet ar viszemāko ziemas mēnešos. Šādu kampilobaktēriju sastopamības īpatnību atkarībā no gadalaika ir aprakstījuši vairāki autori, kas uzsver to, ka šāda kampilobaktēriju variācija fekāliju paraugos ir novērojama galvenokārt mērenā klimata zonā (Jacobs – Reitsma et al., 1994^b; Nylen et al., 2002). Līdzīgi kā šajā pētījumā, arī citos pētījumos ir novērojams kampilobaktēriju sastopamības straujš kritums ziemas un rudens mēnešos un nevienmērība gada griezumā, bet tajā pat laikā saglabājot sezonalitāti (Vandeplas et al., 2010; Jorgensen et al., 2011). ASV veiktajā Willis et al. (2002) pētījumā novēroja, ka kampilobaktērijas biežāk izdevās izolēt tieši ziemas un rudens mēnešos. Kā viens no faktoriem, kas var ietekmēt kampilobaktēriju sezonalitāti un sastopamību, ir gaisa temperatūra (Guerin et al., 2007^a; Guerin et al., 2007^b; Vandeplas et al., 2010; Patrick et al., 2004). Tāpēc šajā sakarā paraugu ievākšanas dienā pulksten 17:00 tika noteikta gaisa temperatūra Jelgavā, vadoties pēc VSIA „Latvijas Vides, ģeoloģijas un meteoroloģijas centrs” datiem. Rezultātā novērojām tendenci, ka broilercāļu individuālie paraugi biežāk satur kampilobaktērijas, ja gaisa temperatūra ir $10^{\circ}\text{C} > 20^{\circ}\text{C}$ (2. Attēls) un ka gaisa temperatūrai un kampilobaktēriju sastopamībai individuālajos fekāliju paraugos ir augsta, ticama, pozitīva korelācija ($r=0.77$; $p<0.005$).



3.att. *Campylobacter* spp. sastopamība paraugos atkarībā no paraugu ievākšanas dienas gaisa temperatūras pulksten 17:00.

Fig. 3. Occurrence of *Campylobacter* positive samples and air temperature of sampling day at 5pm

Salīdzinot iegūtos datus par kampilobaktēriju sastopamību broilercāļu liemeņos Latvijā ar kampilobaktēriju sastopamību broilercāļu liemeņos un gaļas paraugos Igaunijā (Tartu), bija vērojama neliela sezonālā atšķirība. Tartu augstākā sastopamība bija novērojama tieši jūnijā, jūlijā un augustā, līdzīgi kā ziemeļvalstīs, tādās kā Zviedrija, Somija, Dānija un Norvēģija (Roasto et al., 2005; Kapperud, 1994; Rautelin and Hänninen, 2000; Wingstrand et al., 2006). Savukārt tiem gaļas paraugiem, kas bija importēti Igaunijā un bija nopērkami Tartu pilsētas tirgū, kampilobaktērijas bija sastopamas visu gadu bez izteiktas sezonālās variācijas, jo broilercāļu gaļa visbiežāk tika pārdota sasaldēta, līdz ar to nebija zināms arī tās iegūšanas laiks (Roasto et al., 2005). Šo sezonālo kampilobaktēriju sastopamības variāciju Latvijā, tāpat kā citās mērenā klimata zonas valstīs, iespējams, var skaidrot ar kampilobaktēriju dzīvotspēju atkarībā no gaisa temperatūras, jo gan Norvēģijā, gan Islandē veiktajos pētījumos ir noskaidrots, ka gaisa temperatūra, kas ir augstāka par

6°C Norvēģijā vai par 4°C Islandē, būtiski ietekmē kampilobaktēriju sastopamību broilercāļos novietnē un kautuvē (Jonsson et al., 2012; Guerin et al., 2008). Šī pētījuma ietvaros noskaidrojām, ka temperatūrai paraugu ievākšanas dienā ir būtiska ietekme uz kampilobaktēriju sastopamību broilercāļu fekāliju paraugos ($r=0.75$; $p<0.005$), kakla ādu paraugos ($r=0.66$; $p<0.01$), kā arī kampilobaktēriju sastopamībai liemeņu paraugos ($r=0.65$; $p<0.05$). Gaisa temperatūras ietekme uz kampilobaktēriju sastopamību liemeņu paraugos bija zemāka iespējams tādēļ, ka liemeņu paraugi tika ievākti no citas kaušanas partijas un bija zināms, ka tie veikalos bija nogādāti pēdējo piecu dienu laikā, bet precīzi kad nebija zināms, līdz ar to nebija precīzi iespējams noteikt kaušanas dienas gaisa temperatūru.

Kampilobaktēriju skaita ierobežošana broilercāļu liemeņu paraugos

Šī promocijas darba ietvaros veikts eksperiments ar broilercāļu gaļas iepakojšanu dažādās iepakojuma atmosfērās un kampilobaktēriju skaita dinamika pēc uzglabāšanas ir parādīta 3. tabulā. Vērtējot kampilobaktēriju skaita dinamiku uzglabāšanas laikā, konstatējām, ka *Campylobacter jejuni* skaits jau pēc 48 stundām visstraujāk samazinās tieši broilercāļu gaļā, kas iepakota gaisa atmosfērā, tātad satur aptuveni 20% skābekļa, bet būtiski lēnāks kritums bija novērojams MAP (modificētās atmosfēras iepakojumā), kas sastāvēja no gāzu maisījuma ($\text{CO}_2 = 43.8\%$, $\text{O}_2 = 0.2\%$, $\text{N}_2 = 57\%$) ar augstu CO_2 saturu.

3. tabula / Table 3

Kampilobaktēriju skaita dinamika uzglabāšanas laikā atkarībā no iepakojuma gāzu vides

Effect of packaging gas mixture to Campylobacter dynamics during storage period

Uzglabāšanas laiks h (dienas) / Storage time h (days)	Kampilobaktēriju skaits log KVV/1g / Number of <i>Campylobacter</i> log KVV/1g		
	Gaiss / Air	MAP / MAP	Vakuums / Vacuum
0 (0)*	6.36*	6.36*	6.36*
48 (2)	5.41	6.22	5.96
96 (4)	5	5.96	5.87
144 (6)	5	5.82	5.81
192 (8)	4.8	5.81	5.7

*Kontroles paraugs / Control sample

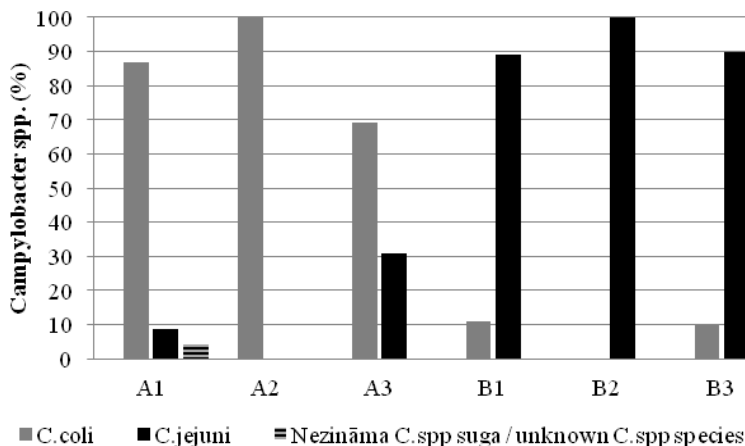
Iegūtie rezultāti sakrīt ar citu autoru pētījumu rezultātiem, kuri atzīmē, ka, lai gaļā panāktu kampilobaktēriju skaita samazināšanos, gaļas iepakojšanai nepiemērots ir gāzu maisījums ar augstu CO_2 un zemu O_2 saturu, kaut gan tas pagarina produkta uzglabāšanas laiku, ierobežojot bojāšanās mikrofloras attīstību, pagarinot mikroorganismu stacionāro fāzi (Rajkovic et al., 2010; McMillin, 2008; Mangaraj and Goswami, 2009; Boysen et al., 2007). Tomēr ir jāņem vērā, ka *Campylobacter* spp.

populācijā var pastāvēt arī celmi, kas ir izturīgi pret oksidatīvo stresu vai arī kampilobaktēriju genoma mutāciju dēļ gaisa skābeklis tos ietekmē mazāk (Garénaux et al., 2008; Gaynor et al., 2005; Gundogdu et al., 2011).

Papildus iepriekšminētajai metodei tika veikta broilercāļu gaļas apstrāde ar ozonētu ūdeni, bet tā nesniedza vēlamo rezultātu, jo kampilobaktēriju skaits pēc 25, 35 un 45 minūšu ilgas apstrādes uzglabāšanas laikā nevis samazinājās, bet palielinājās. Šo fenomenu, iespējams, izraisīja vairāki faktori vai šo faktoru kombinācija, piemēram, ozona spēja šķīdināt taukus un saistīties ar tiem. Šis mehānisms daļēji arī atbild par ozona dezinficējošām īpašībām, jo oksidē baktēriju šūnu sienīgu nepiesātinātos taukus. Šī mehānisma efekts uz kampilobaktērijām kuru skaits uzglabāšanas laikā palielinājās no 3.3 logKVV/1g (kontroles paraugā) līdz 7.1 logKVV/1g (paraugā pēc 45 minūšu ilgas apstrādes) skaidrojams ar broilercāļu ādas īpatnībām, jo pirms apstrādes ar ozonētu ūdeni ādas spalvu folikuli, iespējams, bija aizvērti ar „tauku korķiem”, kas ozona ietekmē tika izšķīdināti, līdz ar to atverot spalvu folikulus un palielinot kampilobaktēriju skaitu uz liemeņu virsmas (Khadare et al., 2001; Osiriphun et al., 2009; Cason et al., 2004^b). Papildus ozona efektivitāti kampilobaktēriju skaita samazināšanā, iespējams, ietekmē arī kampilobaktērijas virsmas polisaharīdu ķīmiskās īpašības, kas neļauj ozonam efektīvi iespieties kampilobaktērijas apvalka dziļākajos slāņos, jo, tiklīdz kampilobaktērijas pakļauj oksidatīvajam stresam, tās pastiprināti veido polisaharīdu apvalku (Garénaux et al., 2008; Gundogdu et al., 2011; Karlyshev et al., 2001; Khadare et al., 2001). Ozona efektivitāti veiktajā eksperimentā varēja samazināt arī broilercāļu ādas tauku kārtā, citas baktērijas un dažāds organisko vielu piesārņojums, kas varēja piesaistīt ozonu, tādējādi samazinot brīvā ozona daudzumu (Virender et al., 2010).

Kampilobaktēriju sugas broilercāļiem un to produkcijā divās lielākajās kautuvēs Latvijā

Pētījuma ietvaros izmeklējot 74 nejaušā secībā atlasītus kampilobaktēriju celmus, kas bija izolēti no uzņēmuma „A” un „B”, tika konstatēts, ka visi 74 celmi pieder kampilobaktēriju ģints mikroorganismiem, jo, veicot koloniju multipleks PQR, gēla elektroforēzē bija redzams 23S *rRNA* gēna aplikons, kas izgaismojās kā 650 bāzu pāru garš fragments. No visiem 74 kampilobaktēriju celmiem 37.8% (n=28) bija *C. jejuni*, 60.8% (n=45) *C. coli*, bet 1.3% (n=1) (4. Attēls).



A1 - uzņēmuma „A” fekāliju kopparaugu kampilobaktēriju izolāti / *Campylobacter isolates from company „A” pooled fecal samples*; A2 - uzņēmuma „A” kala ādas paraugu kampilobaktēriju izolāti / *Campylobacter isolates from company „A” neck skin samples*; A3 - uzņēmuma „A” liemeņu paraugu kampilobaktēriju izolāti / *Campylobacter isolates from company „A” carcass samples*; B1 - uzņēmuma „B” fekāliju kopparaugu kampilobaktēriju izolāti / *Campylobacter isolates from company „B” pooled fecal samples*; B2 - uzņēmuma „B” kala ādas paraugu kampilobaktēriju izolāti / *Campylobacter isolates from company „B” neck skin samples*; B3 - uzņēmuma „B” liemeņu paraugu kampilobaktēriju izolāti / *Campylobacter isolates from company „B” carcass samples*

4. att. Kampilobaktēriju sugas izolātiem no uzņēmuma „A” un „B”

Fig. 4. *Campylobacter* species isolated from company A and B samples

Analizējot kampilobaktēriju izolātus no diviem Latvijas broilercāļu gaļas ražošanas uzņēmumiem, kampilobaktēriju sugu sadalījums starp uzņēmumiem ir atšķirīgs, jo fekāliju kopparaugos no kautuves „A” galvenokārt bija sastopamas *Campylobacter coli* (86.9%), bet no kautuves „B” *Campylobacter jejuni* (88.9%). Pētījuma rezultāti apstiprina, ka broilercāļu fekālijas var saturēt termofilās kampilobaktērijas, kas, ja netiek ievērota kaušanas higiēna, var kalpot kā kontaminācijas avots (Melero et al., 2012; Hermans et al., 2011).

Kampilobaktērijas, kas izolētas no kaklu ādu paraugiem (n=14), kas bija iegūti pēc liemeņu dzesēšanas kautuvē „A”, 100% gadījumu pārstāvēja tikai *Campylobacter coli*, bet kampilobaktērijas, kas izolētas no kaklu ādu paraugiem (n=5), kas iegūti pēc liemeņu dzesēšanas kautuvē „B”, 100% gadījumu tikai *Campylobacter jejuni*. Pētījuma rezultāti apstiprina faktu, ka broilercāļu liemeņos, kakla ādās un fekālijās ir sastopamas divas biežāk izplatītās termofilās kampilobaktēriju sugas, kas var izraisīt kampilobakteriozi cilvēkiem (Bolla et al., 2008; Denis et al., 2011). Iespējams tādēļ, ka liemeņi kaušanas laikā un pēc kaušanas

lielās broilercāļu kautuvēs atrodas piekārti pie līnijas aiz kājām un ar kraniālo galu uz leju, tie tiek kontaminēti ar kampilobaktērijām tieši no zarnu satura, kas kopā ar skalošanas ūdeni liemeņu apstrādes laikā notek gar to kakla ādām (Normand et al., 2008; EFSA, 2011^c; FSAI, 2011; Ugarte-Ruiz et al., 2012). Šis fakts arī izskaidro kampilobaktēriju sugu vienveidību kakla ādās, jo fekāliju kopparaugos abās saimniecībās dominēja viena no termofīlo kampilobaktēriju sugām, kas arī bija visbiežāk sastopama uzņēmumā audzēto broilercāļu fekālijās.

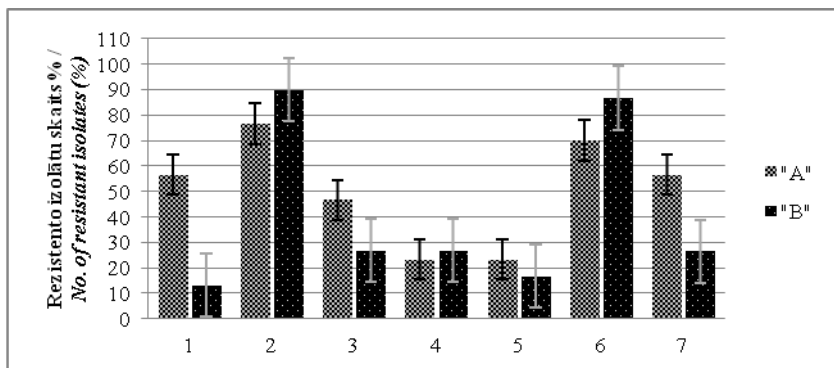
Pētījuma ietvaros tika izmeklētas arī izolētās kampilobaktērijas no divos Jelgavas lielveikalos iegūtajiem broilercāļu liemeņiem (n=23). No broilercāļu liemeņiem izolēja gan *C. coli*, gan *C. jejuni*. Paraugos no uzņēmuma „B” 90%, bet no uzņēmuma „A” 31% gadījumu izolētās kampilobaktērijas piederēja sugai *C. jejuni*. Kampilobaktērijas, kas piederēja *C. coli* sugai paraugos no uzņēmuma „A”, izolēja 69% gadījumu, savukārt no uzņēmuma „B” tikai viens izolāts piederēja *C. coli*. Līdzīgi rezultāti kā no uzņēmuma „B” ir iegūti vairākos iepriekš veiktos pētījumos gan Eiropā (EFSA, 2011^c; EFSA, 2012), gan citur pasaulē (Pamuk and Akgun, 2008; Bao et al., 2006; Mc Crea et al., 2008; Son et al., 2007), kad paraugos no uzņēmuma bija sastopama galvenokārt tikai *C. jejuni*. Attiecībā uz augsto *C. coli* sastopamību paraugos no uzņēmuma „A” literatūrā ir atrodami tikai daži gadījumi, kad *C. coli* dominē vienā saimniecībā un līdz ar to arī liemeņu paraugos iegūtos no šīs saimniecības, lai gan valsts ietvaros dominējoša kampilobaktēriju suga ir *C. jejuni* (Cesare et al., 2008; Manfreda et al., 2006).

Pētījumos ir noskaidrots, ka broilercāļiem, tāpat kā saimniecības vidē, galvenokārt ir sastopamas *C. jejuni*, bet krietni retāk *C. coli* (Newell and Fearnley, 2003; Tram et al., 2012; Melero et al., 2012; Schnide et al., 2010; Malher et al., 2011; Kuhnert et al., 2010; Pepe et al., 2009), kaut gan *C. coli* sastopamība broileriem var palielināties pēc piektās dzīves nedēļas (El-Shibiny et al., 2005). Citā pētījumā ir pierādīts, ka dažkārt broilercāļus novietnē var kolonizēt tikai viena kampilobaktēriju suga, bet citkārt vairākas (Reich et al., 2008). Šī pētījuma laikā tika noskaidrots, ka saimniecības ietvaros putnus var kolonizēt abas (*C. jejuni* un *C. coli*) putniem visbiežāk izplatītās kampilobaktēriju sugas. Uz doto mirkli nav iespējams noteikt, kādēļ vienā uzņēmumā ir sastopamas galvenokārt *C. coli*, bet pastāv iespējamība, ka šī kampilobaktēriju suga novietnē tiek ienesta no ārvides, kur *C. coli* var būt sastopams gan grauzējiem, gan kukaiņiem, un ziemas periodā arī savvaļas putniem (Horrocks et al., 2009; Hald et al., 2003; Hald et al., 2008). Biežāk *C. coli* no savvaļas putniem izolē ziemas periodā, kad ierobežotas barības pieejamības dēļ tie barības meklējumos var doties uz broilercāļu novietņu teritoriju un tādējādi var kontaminēt barību (Hald et al., 2003), turklāt jāņem vērā, ka ziemā ievērojami zemākas gaisa temperatūras dēļ, salīdzinājumā ar vasaras gaisa temperatūru, kampilobaktērijas barībā spēj ilgāk saglabāt dzīvotspēju (Newell and Fearnley, 2003; Bui et al., 2011; Höller et al., 1998). Analizējot kampilobaktēriju sugu atšķirības starp divām saimniecībām „A” un „B”, nevar izslēgt ietekmi, ko veido saimniecības „A” salīdzinoši neliels attālums (100-200m) no meža masīviem, kur savvaļas dzīvnieki, tajā skaitā meža cūkas un citi savvaļas dzīvnieki, var kalpot kā kampilobaktēriju

rezervuārs, bet savvaļas putni un grauzēji gan kā kampilobaktēriju rezervuārs, gan kā kampilobaktēriju potenciālais vektors, kas var sekmēt kampilobaktēriju sugu transmisiju no savvaļas uz broilercāļu novietnēm (Wahlstrom et al., 2003; Hald et al., 2003). Tā kā uz doto mirkli nav zināma kampilobaktēriju sugu sastopamība un izplatība savvaļā Latvijā, tad šajā sakarā var izdarīt tikai minējumus.

No divu Latvijas lielāko broilercāļu ražošanas uzņēmumu broilercāļiem izolēto kampilobaktēriju antimikrobiālā rezistence

Veicot *Vet Mic Camp* testu, tika noskaidrots, ka visbiežāk rezistence bija novērojama pret ciprofloksacīnu un nalidiksīnskābi, kad 83.3% (n=50) izolātu auga pie ciprofloksacīna koncentrācijas $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ un 78.3% pie nalidiksīnskābes koncentrācijas $64 \mu\text{g/ml}$, savukārt visretāk rezistence tika novērota pret streptomicīnu un gentamicīnu, kad 20% (n=12) izolātu auga pie streptomicīna un gentamicīna koncentrācijas $8 \mu\text{g/ml}$ un lielākas. Starp fluorokvinolonu (ciprofloksacīns un nalidiksīnskābe) un aminoglikozīdu (streptomicīns un gentamicīns) grupas līdzekļiem būtiskas atšķirības kampilobaktēriju rezistences rādītājos netika novērotas ($p>0.05$), pēc kā var spriest, ka testa rezultāti ir ticami. Pret citiem antimikrobiālajiem līdzekļiem rezistences rādītāji bija salīdzinoši augsti pret eritromicīnu 35%, pret tetraciklīnu 36.7%. Kopumā 41.6% (n=25) izmeklēto izolātu bija rezistenti pret divām un vairāk neradnieciskām antibiotisko līdzekļu grupām, no tiem 30% (n=18) bija rezistenti pret trijām un vairāk neradniecisku grupu antibiotikām, bet 13.3% (n=8) bija rezistenti pret visām testā izmantotajām antibiotikām. Visbiežāk tika novērota antimikrobiālās rezistences kombinēšanās pret nalidiksīnskābi, ciprofloksacīnu, tetraciklīnu un eritromicīnu (5. attēls).



1 – Eritromicīns / erythromycin; 2 – Ciprofloksacīns / ciprofloxacin; 3 – Tetraciklīns / tetracycline; 4 – Streptomicīns / streptomycin; 5 – Gentamicīns / gentamicin; 6 – Nalidiksīnskābe / nalidixic acid; 7- Multirezistentie izolāti / multiresistant isolates

5. att. Izolēto kampilobaktēriju antimikrobiālā rezistence

Fig. 5. Antimicrobial resistance of isolated Campylobacter

Analizējot izolātu antimikrobiālo jutību pret vienu antimikrobiālo līdzekli, tika konstatēts, ka kopumā būtiski ($p < 0.05$) vairāk izolātu bija jutīgi pret eritromicīnu, tetraciklīnu, streptomīcīnu un gentamicīnu salīdzinājumā ar izolātiem, kas uzrādīja rezistenci pret šiem antimikrobiālajiem līdzekļiem. Bet būtiski ($p < 0.005$) vairāk izolātu bija rezistenti pret ciprofloksacīnu un nalidiksīnskābi pretstatā pret šiem antimikrobiālajiem līdzekļiem jutīgo izolātu skaitam.

Vērtējot izolēto kampilobaktēriju antimikrobiālo rezistenci atkarībā no kautuves, kurā šie paraugi bija iegūti, noskaidrojās, ka pret eritromicīnu rezistentu kampilobaktēriju izolātu skaits no uzņēmuma „A” ir būtiski ($p = 0.0001$) augstāks salīdzinājumā ar rezistentu kampilobaktēriju izolātu skaitu no uzņēmuma „B”. No uzņēmuma „A” un „B” izolēto kampilobaktēriju rezistences rādītājos starp pārējiem testā izmantotajiem antimikrobiālajiem līdzekļiem būtiskas ($p > 0.05$) atšķirības nebija novērojamas.

Pētījuma laikā izolētajām kampilobaktērijām tika noteikta antimikrobiālā jutība, izmantojot gan mikroatšķaidījuma metodi, gan disku difūzijas metodi. Šajā pētījumā kampilobaktērijas, kas tika vienlaicīgi izmeklētas ar abām antimikrobiālās rezistences noteikšanas metodēm, uzrādīja vienādus antimikrobiālās rezistences rādītājus, kaut gan citu autoru pētījumos ir noskaidrots, ka disku difūzijas metode salīdzinājumā ar mikroatšķaidījuma metodi kampilobaktēriju antimikrobiālās rezistences noteikšanai, ir neprecīzāka (Lehtopolku et al., 2012; Campana et al., 2010; van der Beek et al., 2010). Galvenās atšķirības ir novērojamas kampilobaktēriju rezistencē pret eritromicīnu un ciprofloksacīnu (Lehtopolku et al., 2012; van der Beek et al., 2010). Kaut gan ir arī citi pētījumi, kuros būtiskas atšķirības starp šīm metodēm netika novērotas (Holasova et al., 2007; Khosravi et al., 2011; Mc Gill et al., 2009; Rahimi et al., 2012), kā arī uzsvērts, ka disku difūzijas metode ir lētāka un ātrāk veicama metode ikdienā, lai noteiktu kampilobaktēriju antimikrobiālo rezistenci (Khosravi et al., 2011; Mc Gill et al., 2009).

Visbiežāk (80.8%) izolētajām kampilobaktērijām no kautuves „A” un „B” bija novērojama antimikrobiālā rezistence pret fluorokvinolonu grupas antibiotiskajiem līdzekļiem (ciprofloksacīnu un nalidiksīnskābi), bet no kautuves „A” salīdzinoši bieži rezistence (56.7%) bija novērojama arī pret makrolītu grupas preparātu eritromicīnu. Šīs grupas preparātus kā pirmās un otrās izvēles preparātus iesaka lietot cilvēku kampilobakteriozes gadījumā (Zhao et al., 2010), kaut gan pieaugoša rezistence pret šiem preparātiem ir novērojama, kopš tos sāka izmantot gaļas ražošanas industrija profilaktiskos un ārstēšanas nolūkos (Smith et al., 1999; Engberg et al., 2001; Ge et al., 2003; Gupta et al., 2004; Kinana et al., 2006; Serichantalergs et al., 2007).

Tāpat kā šajā pētījumā, tā arī citos pētījumos ir noskaidrots, ka aptuveni 50% kampilobaktēriju ir rezistentas pret vismaz divām neradniecīgām antibiotisko līdzekļu grupām, bet viena trešdaļa pret vairāk kā trim. Galvenokārt šī rezistence ir novērojama pret fluorokvinolonu un makrolīdu grupas antibiotikām (Možina et al., 2011). Tā, piemēram, 2010. gadā Eiropas Savienībā *C. coli* 50% gadījumu bija rezistents pret tetraciklīnu, ciprofloksacīnu un streptomīcīnu, bet 20% gadījumu pret eritromicīnu, ciprofloksacīnu un tetraciklīnu (EFSA, 2012). Vairākos pētījumos tiek

akcentēts, ka *C. jejuni*, biežāk uzrāda rezistenci pret kādas konkrētas antibiotiku grupas līdzekļiem, bet multirezistenci tām novēro retāk (Kim et al., 2008; D'lima et al., 2007).

SECINĀJUMI

1. Latvijā ražotā broilercāļu gaļa var kalpot kā kampilobakteriozes ierosinātāju avots, jo Latvijā audzētos broilercāļos, kā arī to gaļā, vidēji 63% gadījumu ir atrodamas termofilās kampilobaktēriju sugas un to sastopamība starp diviem lielākajiem Latvijas broilercāļu gaļas ražošanas uzņēmumiem nebija būtiski atšķirīga ($p>0.05$).
2. Bija novērojama pozitīva ticama korelācija starp termofilo kampilobaktēriju sastopamību broilercāļu fekāliju paraugos, kakla ādu paraugos, liemeņu paraugos un gaisa temperatūru (attiecīgi $r=0.75$; $r=0.66$; $r=0.65$; $p<0.05$), kas arī izskaidro, kādēļ būtiski ($p<0.05$) biežāk kampilobaktērijas tika izolētas no šiem paraugiem pavasara un vasaras mēnešos.
3. Uzņēmumā “A” audzētajiem broilercāļiem ievērojami biežāk ($p<0.05$) visos paraugu veidos tika konstatētas *Campylobacter coli* salīdzinājumā ar uzņēmumu “B”, kur biežāk tika izolētas *Campylobacter jejuni*. Tas liecina, ka Latvijā ir plaši izplatītas abas biežāk sastopamās kampilobaktēriju sugas.
4. Izolētajiem *Campylobacter* spp. celmiem bija novērojama augsta rezistence pret pētījumā izmantotajiem antibiotiskajiem līdzekļiem, it īpaši flurokvinolonu grupas, bet būtiski zemāka ($p<0.05$) pret tetraciklīnu, eritromicīnu un aminoglikozoīdu grupas antibiotikām, tādējādi cilvēku kampilobakteriozes gadījumā ārstēšana ar flurokvinolonu grupas antimikrobiālajiem līdzekļiem var būt neefektīva.
5. Visstraujākais kampilobaktēriju skaita kritums uzglabāšanas laikā bija novērojams broilercāļu gaļas paraugiem, kas tika iepakoti iepakojumā ar gaisu salīdzinājumā ar paraugiem, kas tika iepakoti MAP un vakuuma iepakojumos.
6. Broilercāļu gaļas kampilobaktēriju kontaminācijas samazināšanai apstrāde ar ozonēto ūdeni nesniedz vēlamo rezultātu.

IETEIKUMI PRAKSEI

1. Ir jāpaaugstina biodrošības līmenis broilercāļu gaļas ražošanas saimniecībās un jāuzlabo broilercāļu kaušanas un gaļas apstrādes higiēna, tādējādi samazinot kampilobaktēriju sastopamību saimniecībās un broilercāļu gaļā.
2. Liemeņu kontaminācijas līmeņa samazināšanai uzglabāšanas laikā var izmantot liemeņa iepakojumu aizsargāzu vidē ar augstu skābekļa saturu, bet būtu jāizvairās no liemeņu iepakojuma vakuuma iepakojumā, vai iepakojumā, kas cieši pieguļ broilercāļu liemenim.
3. Broilercāļu gaļas gala patērētājam, lai samazinātu risku inficēties ar kampilobaktērijām rūpīgi ir jāievēro virtuves higiēna, nepieļaujot gatavā produkta saskari ar termiski neapstrādātu produktu vai virsmām, kas nonākušas saskarē ar šo produktu.

ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

1. Kovalenko K., Roasto M., Mäesaar M., Meremäe K., Kramarenko T. *Campylobacter* spp. And *Listeria monocytogenes* Prevalence Study In 2012. IAFP's European Symposium on Food Safety proceedings, p. 57.
2. Kovaļenko K., Roasto M., Liepiņš E., Mäesaar M., Hörmann A. (2013) High occurrence of *Campylobacter* spp. in Latvian broiler chicken production. *Food Control*. Vol. 29 (1), pp. 188–191.
3. Roasto M., Mäesaar M., Muutra K., Meremäe K., Kovalenko K., Kramarenko T. (2013). *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* prevalence in 2012. FOODBALT-2013, pp. 60-61.
4. Kovaļenko K., Roasto M., Liepiņš E., (2012). The effect of air temperature on occurrence of thermophilic *Campylobacter* spp. in Latvian broiler chicken production on day of sampling. *Veterinārmedicīnas raksti 2012*. pp. 72-76
5. Roasto M., Maesar M., Meramae K., Muutra K., Kovalenko K., Kramarenko T. (2012). *Campylobacter* spp. And *Listeria monocytogenes* in Estonian food chain. *Veterinārmedicīnas raksti 2012*. pp. 233-234.
6. Kovaļenko K., Roasto M. (2012) High occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Latvian Broiler Chicken Production. *IAFP's European Symposium on Food Safety proceedings*, p. 45.
7. Kovaļenko K., Roasto M., Ruzaiķe A., Liepiņš E. (2011) *Campylobacter* spp. Occurrence on Broiler Chicken Carcasses at Retail Level in Latvia. *Proceedings of*

the 17th International Scientific Conference „Research for Rural Development 2011”. Jelgava, 18-20 May, pp. 157-160.

8. Roasto M., Kovaļenko K., Praakle-Amin K., Meremäe K., Tamme T., Kramarenko T. (2010) Review of the contamination and health risks related with *Campylobacter* spp. and *Listeriamonocytogenes* in food supply with special reference to Estonia and Latvia. *Agronomy Research*, 8(Special Issue II), 333 - 338.
9. Kovaļenko K., Ruzaiķe A., Roasto M., Liepiņš E., (2010). Dynamic of *Campylobacter jejuni* in raw poultry meat depending on packaging atmosphere. *Veterinārmedicīnas raksti 2010*. p.165

PATEICĪBA

Izsaku pateicību Nacionālajam Veterinārajam institūtam „SVA” par sniegto atbalstu kampilobaktēriju antimikrobiālās rezistences noteikšanā, kā arī Pārtikas drošības, dzīvnieku veselības un vides zinātniskajam institūtam „BIOR” un Latvijas Valsts augļkopības institūtam par sniegto tehnisko un zinātnisko atbalstu molekulāro metožu apgūšanā.

Pateicību izsaku arī saviem vadītājiem un recenzentiem par ieguldīto darbu un pacietību.

Tāpat vēlos pateikties arī visiem cilvēkiem, kas bija ar mani kopā šī darba tapšanas laikā un atbalstīja mani, kā vien varēja.

INTRODUCTION

The name *Campylobacter* is derived from the Greek word *kampylos* meaning curved. For the first time, organisms that probably were *Campylobacter* were described by Theodore Escherich in 1886, from the fecal samples of infants with diarrhea (Friedman et al., 2000).

Only in seventies *Campylobacter* was identified as an important human pathogen (Skirrow, 1977). This is due to the sensitivity of *Campylobacter* and the limited ability to grow under laboratory conditions. Nowadays in developed countries, *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* is the most common human bacterial gastrointestinal pathogen (Hänninen et al., 2003). In Europe, USA, Canada and other industrialized countries campylobacteriosis cases increase every year and since 1998 are more frequent than salmonellosis cases (Friedman et al., 2000). campylobacteriosis is causing serious socioeconomic consequences in the European Union, where the number of cases registered in 2007 were over 200,000 (EFSA, 2009), but in 2010 they were 212,064 (EFSA, 2012). Human campylobacteriosis cases are sporadic, and if enteritis is mild they do not require antibiotic therapy (Allos and Blaser, 1995). Campylobacteriosis infectious dose is approximately 500 *Campylobacter jejuni* cells, which is considered a relatively low infectious dose (Black et al., 1988). Clinical signs of campylobacteriosis occur 2 to 10 days after primary infection, characterized by fever, headache, muscle pain, nausea and bloody diarrhea. Usually infection is not serious and the symptoms end within a week. In some cases, the infection can spread to other organs and can affect the circulatory and nervous system. *Campylobacter* infection can cause post-infectious complications, such as Miller-Fisher syndrome, reactive arthritis and Guillain-Barré syndrome. Guillain-Barré syndrome is characterized by autoimmune processes leading to demialinization of nervous tissues, resulting in paralysis and paresis (Patterson, 1995). Several epidemiological studies have indicated that an important source of campylobacteriosis is the consumption of poultry meat or work with it (Friedman et al., 2000; Kapperud et al., 2003; Schönberg-Norio et al., 2004; EFSA, 2012). Fruit and vegetable cross-contamination with poultry meat is considered to be a significant source of campylobacteriosis (Kapperud et al., 2003). Several studies have shown that a bird carcass with a thermophilic *Campylobacter* from poultry gastrointestinal tract is contaminated during slaughter (Mead et al., 1995; Newell et al., 2001; Stern et al., 2003).

It is known that *Campylobacter* can develop antimicrobial resistance and it is often associated with improper use of antimicrobials in animals and humans. *Campylobacter* spp. antimicrobial resistance has increased mainly due to use of the fluoroquinolones, macrolides and tetracyclines in farm animals. There is a risk that antibiotic resistant *Campylobacter* can spread from animals to humans through the food chain (Jacobs-Reitsma 1997; Piddock et al., 2000).

The studies to detect *Campylobacter* occurrence, species and their properties in food chain in Latvia so far have not been done.

The aim of the research was to investigate the thermophilic *Campylobacter* occurrence, species distribution, antimicrobial susceptibility, as well as possibilities of *Campylobacter* reduction in broiler chicken meat production chain.

Objectives of the research

1. To determine the occurrence of thermophilic *Campylobacter* in broiler chicken meat production chain.
2. To determine isolated *Campylobacter* species by using colony multiplex PCR.
3. To determine the antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolates.
4. To investigate the packaging gas environment on the dynamics of *Campylobacter* in broiler chicken meat during the storage period.
5. To investigate the dynamics of *Campylobacter* in broiler chicken meat after treatment with ozonated water.

Scientific novelty

1. For the first time studies on the thermophilic *Campylobacter* occurrence in broiler chickens reared in Latvia were performed.
2. Most common *Campylobacter* species were detected in Latvia grown broilers and meat using molecular biology techniques.
3. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* was established in broiler chickens reared in Latvia.
4. The influence of different packaging atmosphere on *Campylobacter* dynamics in broiler chicken meat during the storage time was determined.
5. The effect of ozonated water on the dynamics of *Campylobacter* in broiler chicken meat during the storage period was evaluated.

The research results and approbation

Results of the study have been reported at the following international conferences:

Roasto M., Mäesaar M., Muutra K., Meremäe K., Kovalenko K., Kramarenko T. *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* prevalence in 2012. FOODBALT-2013 conference, 23-24 May, 2013, Tallinn, Estonia.

Kovalenko K., Roasto M., Mäesaar M., Meremäe K., Kramarenko T. *Campylobacter* spp. prevalence in the Baltic States broiler chicken production. IAFP's European Symposium on Food Safety, 14-17 May, 2013, Marseille, France.

Kovaļenko K., Roasto M., Liepiņš E. The effect of air temperature on occurrence of thermophilic *Campylobacter* spp. in Latvia broiler chicken production on day of sampling. International scientific conference "Animals. Health. Food Hygiene". 22-23 November, 2012, Jelgava, Latvia.

Kovaļenko K., Roasto M., Ruzaiķe A., Liepiņš E. *Campylobacter* spp. occurrence on broiler chicken carcasses at retail level in Latvia. International scientific conference "Research for Rural Development", 18-20 May, 2011, Jelgava, Latvia.

Kovaļenko K., Roasto M. High occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Latvia broiler chicken production. IAFP's European Symposium on Food Safety, 21-25 May, 2012, Warsaw, Poland.

Kovaļenko K., Ruzaiķe A., Roasto M., Liepiņš E. Dynamics of *Campylobacter jejuni* in raw poultry meat depending on packaging atmosphere. International scientific conference "Animals. Health. Food Hygiene". 29 October, 2010, Jelgava, Latvia.

Scope of work: thesis is written on 120 pages including 36 Figures and 12 Tables. It consists of annotation, introduction, literature review, methodology, results, discussion, conclusions, recommendations for the practice, references.

MATERIALS AND METHODS

In the study, 2400 fecal, 240 neck skin and 240 broiler chicken carcass samples were used from clinically healthy, 40 - 42 days old Ross 308 breed broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*), which were grown on the two largest Latvian broiler chicken meat producing company farms and slaughtered in the same company slaughterhouses. Meat samples were taken from the above-mentioned company broiler chicken carcasses from two supermarkets in Jelgava.

Sample bacteriological examination and antimicrobial susceptibility testing was performed at the Laboratory of food infection of the Institute of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine (FVM), Latvia University of Agriculture (LUA), and at the Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Estonian University of Life Sciences (EULS).

Molecular investigations of the isolated *Campylobacter* were conducted at the Laboratory of molecular biology of the Scientific Institute of Food Safety, Animal Health and Environment BIOR, and Laboratory of molecular biology of the Latvian State Institute of Fruit Growing.

The research was carried out from January 2010 to March 2012.

Sampling

Required/minimum sample volume to determine the occurrence of *Campylobacter* was determined according to the European Commission Decision 2007/516/EC: Commission Decision of 19 July 2007 concerning a financial contribution from the Community towards a survey on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in broiler flocks and on the prevalence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in broiler carcasses to be carried out in the Member States.

Broiler meat, skin and fecal samples were obtained on monthly basis from two major Latvian broiler chicken producer companies at the slaughter level for the fecal, and the neck skin samples and at the retail level for the carcass samples. Fecal samples were obtained during the evisceration by placing 100 intestines (entire small intestines and the large intestines) into plastic bags by 10 intestine samples in each.

The broiler neck skin samples were obtained from carcasses after the end cooling cycle and before the carcass packaging.

Broiler chicken carcass samples (whole broiler carcass) were bought in two supermarkets in Jelgava. Carcasses were sold fresh, not frozen.

Also, broiler chicken meat samples for limiting the number of *Campylobacter* in broiler chicken meat by using ozonated water was obtained from *Putnu Fabrika Ķekava* butcher shop *Ķekava* in Jelgava. For the experiment to evaluate dynamics of *Campylobacter* in broiler chicken meat during the storage period after packaging in different packaging atmosphere samples (broiler drumsticks) were collected from the store *Maxima*.

After acquisition, all samples were placed into thermo bags at temperature +6°C and transported to the laboratory within 1 to 4 hours to carry out further investigations.

Preparation of the samples obtained from broilers

To prevent sample contamination, all intestinal samples before the examinations were treated with 70% ethanol solution. From each pooled intestinal sample one cecal wall was opened with a sterile scalpel aseptically and 10 ml of the fecal content was plated directly on the mCCDA agar (Oxoid, United Kingdom, CM0739B) and Karmali agar (Oxoid, United Kingdom, CM0935B). Pooled fecal sample was obtained by combining 10 ml of fecal samples from 10 broiler cecal content thus obtaining 100 ml of fecal material. After that, it was carefully mixed and 10 ml of the pooled sample was plated on the mCCDA agar and Karmali agar for the detection of *Campylobacter* spp.

In laboratory, 10g of each broiler chicken neck skin sample and carcass skin sample was placed in a plastic bag filled with 100 ml of Bolton broth (Oxoid, United Kingdom, CM0983B). The sample with broth was homogenized in the Stomacher apparatus. After homogenizing, the plastic bag with the sample was placed into an incubator for enrichment at +37°C for 4-6 hours and then at +41.5°C for 44 ± 4 hours. After enrichment, from the surface of the enriched broth 10 µl were taken and plated on the mCCDA agar and Karmali agar using a 10 µl microbiological needle.

***Campylobacter* culture isolation and identification**

After the plating to selective culture medium, the medium was immediately placed in anaerobic container (Oxoid, United Kingdom, HP0011A) with CampyGen (Oxoid, United Kingdom, CN0035) that modified the atmosphere within the container providing conditions for *Campylobacter* growth (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂). After closing, the container was placed in a thermostat at +41.5°C and was incubated for 44 ± 4 hours. After incubation, typical colonies, which were pale gray on mCCDA and transparent on Karmali agar, were plated on Columbia blood agar (CBA) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) and incubated for 40-48 hours in microaerobic conditions at +41.5°C.

After the primary biochemical tests and microscopic examination of the colonies, 2-3 colonies were inserted into a tube with the brain-heart infusion broth (OXOID, UK) supplemented with 5% of glycerol. After that, the tubes immediately were placed in a freezer at -70°C.

In order to identify *Campylobacter* species in 74 randomly selected isolates (50 from the company A and 24 from the company B) colony multiplex polymerase chain reaction (PCR) (Wang et al., 2002) was used. To identify *Campylobacter* species we used 23s rRNA, *hyp O*, *gly A* genes.

After thawing and incubation, deoxyribonucleic acid (DNA) extraction and PCR was performed.

Following the PCR cycle we performed electrophoresis in agarose gel for electrophoretic evaluation.

Isolated *Campylobacter* antimicrobial susceptibility testing

The determination of antimicrobial resistance was performed during the year 2011. All randomly selected 60 *Campylobacter* isolates were tested for minimal inhibitory concentration (MIC) by a broth microdilution method (National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden) against erythromycin, ciprofloxacin, tetracycline, gentamicin, streptomycin and nalidixic acid. The MIC based microdilution was carried out in the laboratory of the Institute of Food and Environmental Hygiene of the FVM, LUA, Jelgava, Latvia. After frozen storage, the *Campylobacter* isolates were cultured on Columbia blood agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) and incubated at 41.5°C for 48 h. After incubation, a loopful (1 µl) of bacterial growth was transferred to 2 ml 0.9% saline and then 100 µl of suspension were added to 10 ml of cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) with 2.5–5% lysed horse blood to get the final inoculum of 10⁶ CFU/ml. Then each well of MIC panel (VetMIC Camp Ver.2, SVA, Uppsala, Sweden) was inoculated with 100 µl of 10⁶ CFU/ml *Campylobacter* suspension. After filling of the panel, 10 µl of inoculums were streaked to Columbia blood agar plates for purity control. The density of the bacterial suspension was controlled according to the guidelines of The National Veterinary Institute (SVA, Uppsala, Sweden). The plates and MIC panel were incubated at 37°C for 48 h in microaerobic conditions. After incubation, the MIC was read as the lowest concentration completely inhibiting visible growth of *Campylobacter* in accordance with the instructions given by the test manufacturer (SVA, Uppsala, Sweden). The following MIC breakpoints for resistance were applied: erythromycin 32 µg/ml, ciprofloxacin 4 µg/ml, tetracycline 16 µg/ml, gentamicin 8 µg/ml, streptomycin 8 µg/ml and nalidixic acid 64 µg/ml (NARMS, 2004).

Limiting the number of *Campylobacter* in broiler chicken meat by different packaging atmospheres

In the study we used 27 chicken samples (fresh chicken drumsticks).

Sample preparation was carried out at the Institute of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, LUA, in the following order:

Previously isolated *Campylobacter jejuni* strains were thawed from -70°C to room temperature. Ten microliters of the thawed medium with a micropipette were transferred to Columbia blood agar (Columbia blood agar, OXOID, England). The medium was incubated for 48 h in microaerobic conditions at +41.5°C. After

incubation, the culture purity was evaluated macroscopically, microscopically and biochemically.

Sample inoculation with *Campylobacter* was made with 10 ml of 10^{-3} CFU *Campylobacter* suspension in 0.9% saline solution. This bacterial suspension was added to all meat samples that were previously placed in the stomacher bag. After inoculation, samples were mixed carefully for two minutes.

Contamination level of control sample was determined by ISO 10272-2: 2006 method.

After inoculation, meat samples were delivered to the Faculty of Food Technology LUA and packaged in various gas environments. Five of the samples were packed in vacuum, five samples in modified atmosphere packaging (MAP) (MAP gas mixture composition - $\text{CO}_2 = 43.8\%$, $\text{O}_2 = 0.2\%$, $\text{N}_2 = 57\%$) and five in air atmosphere. After packing, the samples were stored in a refrigerator at a temperature of $+2^\circ\text{C}$ to $+4^\circ\text{C}$.

Every 48 hours after sample preparation 10g of skin from all three sample types were examined in accordance with ISO 10272-1:2006 and ISO 10272-2:2006 methods. Overall, the study lasted for 192 hours.

Limiting the number of *Campylobacter* on meat samples by using ozonated water

In the study, 18 broiler chicken carcass back samples were used from which four were control samples. Control samples were placed into sterile, labeled plastic bags immediately at $+4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ temperature, and they were not subjected to a treatment with ozonated water. Additionally, two samples were examined by ISO 10272-1:2006 and ISO 10272-2:2006 methods to determine starting value of *Campylobacter* load.

The remaining 12 samples were hung on a specially prepared wire. Samples on the wire were located so that they did not touch each other during the processing. After sample preparation, an immediate treatment with ozonated water was applied.

During the sample preparation time ozonated water was prepared at a concentration 2.3 mg/l and at water temperature $7.2^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$.

All 12 samples were sprayed with ozonated water continuously from the same distance creating conditions as close as possible to the cooling process at the meat processing plants. The first four samples with ozonated water were treated for 25 minutes; four samples were treated for 35 minutes, but the last four for 45 minutes. Immediately after processing, all the samples were collected and placed into labeled, sterile plastic bags which immediately were sealed.

After treatment with ozonated water, all samples were placed for storage at $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ temperature.

Microbiological analysis was performed after 120 hours of products storage by using ISO 10272-2 (2006) method.

Statistical data processing

All individual results were recorded using MS Excel 2010 software (Microsoft Corporation, Redmond, Wash.), and statistical analysis was performed with the Statistical Package R (Vienna, Austria) in order to determine the Pearson correlation, perform correlation analysis, Student's t-test, determine the average and standard deviation. Differences in figures as statistically significant were considered at the significance level $\alpha = 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

During the study, from 240 broiler chicken pooled fecal samples on average in 95.8% of the cases *Campylobacter* spp. was isolated. Overall in Latvia during the year 2010, the occurrence of *Campylobacter* positive broiler chicken pooled fecal samples was higher compared with available data on the occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken pooled fecal samples in Poland, Finland and the Czech Republic (year 2008) (EFSA, 2010^b). Conversely, in broiler chicken individual fecal samples *Campylobacter* were found on average in 68.8% of cases. The level of positive pooled fecal and individual fecal samples on both farms was relatively high. In the company A, it was 97.5% for pooled fecal samples and 75% for individual fecal samples, while in the company B it was 94.1% and 62.5%, respectively.

Analyzing the occurrence of *Campylobacter* in individual fecal samples from the company A, depending on the month of sample collection, and comparing it to the average occurrence of *Campylobacter* in individual fecal samples (75%) of the company A it was significantly ($p < 0.05$) higher in April, May and September (100%), but significantly ($p > 0.05$) lower in January (50%), February (60%), October (60%) and December (20%). But the *Campylobacter* occurrence in the company B individual fecal samples was significantly ($p < 0.05$) higher in March, April, June, July, August (80%) and May (100%), but significantly lower in January (30%), October (20%) and December (30%), compared with an average *Campylobacter* occurrence in the company B individual fecal samples in 2010 (Figure 1).

The occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken pooled fecal samples from the company A and B was significantly ($p < 0.05$) lower in December (80%), compared with the average occurrence of *Campylobacter* in fecal pooled samples in company A and B (97.5% and 94.1%, respectively).

Dividing the year into seasons by three months in each (winter - December, January, February; spring - March, April, May; summer - June, July, August; autumn - September, October, November), we observed that the average occurrence of *Campylobacter* in individual broiler chicken fecal samples was significantly ($p < 0.05$) lower in the winter (43.3%), compared with the *Campylobacter* occurrence in the spring (88.3%) and summer (81.7%). In the autumn, *Campylobacter* occurrence in the same sample type (61.7%) was significantly ($p < 0.05$) higher than in winter, but significantly ($p < 0.05$) lower than in spring; but compared to the occurrence in summer there were no significant ($p > 0.05$) differences. The average *Campylobacter* occurrence of broiler chicken pooled fecal samples was lower in winter (88.3%), but this difference was statistically insignificant ($p > 0.05$), compared with an average occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken pooled fecal samples in the spring, summer (100%) and autumn (96.7%).

In other European Union countries, the occurrence of *Campylobacter* in individual fecal samples in 2006, 2007 and 2008 ranged from an average of 21.7% to 25.2% with the lowest occurrence of *Campylobacter* in 2006 in Estonia and Iceland, and in 2007 in Estonia, where all of the analyzed samples were *Campylobacter* negative. The highest occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken individual fecal samples

according to the EFSA was observed in 2007 in Italy; where in 82.8% of the examined samples were found *Campylobacter* spp (EFSA, 2010^b).

Similar as in other studies, the occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken fecal samples within the country may vary, as it was in Latvia, where the difference of 12.5% was observed between the two largest broiler chicken producing companies (Zweifel et al., 2008; Saleh 2002; O'Mahony et al., 2011).

Several studies have shown that most often *Campylobacter* can be found in broiler chicken neck skins compared to other carcass parts (Baré et al., 2013; Malher et al., 2011), that is why the sampling at the slaughterhouse level this carcass region was selected. During the study, 240 broiler chicken neck skin samples were collected from two major Latvian broiler production company slaughterhouses A and B. In this sample type, *Campylobacter* spp. was found on average 60.8% (n=146). In other authors' studies on *Campylobacter* occurrence in broiler chicken neck skin samples at slaughterhouse level were found that in Vietnam the occurrence was 15.3%, in New Caledonia 96.7%, but in Switzerland and Italy 70% and 40%, respectively (Garin et al., 2012; Kuhnert et al., 2012; Pepe et al., 2009). In the company A, *Campylobacter* were found in 69.2% of samples (n=83), but in the company B in 52% (n=63) of samples. Comparing the occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken neck skin samples by months, in the company A and B, it may be observed that a significantly ($p<0.05$) lower occurrence of *Campylobacter* in this sample type was found in the company B in April, May and September. In other months the *Campylobacter* occurrence in broiler chicken neck skin samples from the company A and B were insignificantly different ($p>0.05$).

The occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken neck skin samples from the company A, compared with the average occurrence of *Campylobacter* in the neck skin samples in the company A (69.2%), it was significantly ($p<0.05$) lower in January (20%), July (40%) and December (40%). Whereas in the company B, significantly ($p<0.05$) higher *Campylobacter* occurrence was observed in July (90%), but significantly lower in January (20%), compared with the average occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken neck skin samples in the company B (52.5%). Most commonly broiler neck skins are contaminated with *Campylobacter* during broiler defeathering and evisceration when *Campylobacter* from the intestinal tract with the rinse water drains to the neck skin and collects in the feather follicles and skin folds (Cason et al., 2004; Guerin et al., 2010, Son et al., 2007). *Campylobacter* occurrence of the neck skin samples from the company A was 16.7% higher than in the same sample type from the company B, although the difference was statistically insignificant ($p>0.05$). Perhaps the difference in the occurrence of *Campylobacter* in the neck skin is due to the fact that *Campylobacter* in the company A broiler individual fecal samples were found to be 12.5% higher than in samples from the company B, that could increase the risk of the neck skin contamination with *Campylobacter* from the broiler chicken intestines.

The average occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken neck skin samples in 2010 in the company A and B was insignificantly ($p>0.05$) different.

Like the *Campylobacter* spp. occurrence in the fecal samples, also in the neck skin samples from the slaughterhouse A and B, *Campylobacter* were observed significantly ($p<0.05$) rarer in winter (40%) and autumn (55%) compared with the occurrence of *Campylobacter* positive neck skin samples in summer (75%) and spring (73.3%). The occurrence of *Campylobacter* in broiler neck skin samples in spring and autumn in the company A was significantly ($p<0.05$) higher than in the company B, by 33.3% in the spring and 30% in autumn (Table 1).

From the investigated 240 broiler chicken carcass samples 59.2% ($n=142$) of them were identified as *Campylobacter* spp. positive. The occurrence of *Campylobacter* in broiler carcasses in the company A was 71.7% while in the company B it was 46.7%. The highest occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken carcass samples was observed in summer and spring (Table 2).

Comparing the occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken carcass samples from the company A and B, it may be observed that a significantly ($p<0.001$) higher occurrence of *Campylobacter* in the company A was in January and March. During these months *Campylobacter* from the company B broiler chicken carcasses were isolated 80% less as compared to the occurrence of *Campylobacter* in samples from the company A in January (80%) and March (100%). There were also a significant ($p<0.05$) higher occurrence of *Campylobacter* in carcass samples from the company A in July (100%), while the occurrence of *Campylobacter* in carcass samples of the company B was 60%. In other months, the occurrence of *Campylobacter* in broiler carcass samples from the company A and B were insignificantly different ($p>0.05$).

The average occurrence of *Campylobacter* in carcass samples was significantly ($p>0.05$) lower in the company B compared with the average occurrence of *Campylobacter* in carcass samples in the company A. The average occurrence in the company B was significantly ($p<0.05$) higher than the same occurrence in January (0%), November (0%) and December (10%) but significantly ($p<0.05$) lower than in September (100%). Between the occurrence of *Campylobacter* in carcass samples from the company B in November, January, December and March significant ($p>0.05$) differences were not observed, but compared with occurrence in February, April, May, June, July and September it shows significantly ($p<0.05$) higher occurrence in these months. *Campylobacter* occurrence in carcass samples from the company B in September differed insignificantly ($p>0.05$) from that in May (80%) and June (80%) (Figure 2).

The difference between the occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken carcasses, individual fecal samples and neck skin samples were insignificant ($p>0.05$) in the company A and B; the reason may be that the number of *Campylobacter* was not reduced during the carcass cooling process. It has already been proved that carcass cooling by using air cooling system, significantly reduces *Campylobacter*, *Enterobacteriaceae* family and the total number of bacteria (Sanchez et al., 2002; Rosenquist et al., 2003; EFSA, 2011^b). Insignificantly ($p>0.05$) lower occurrence of *Campylobacter* on broiler carcasses compared with the neck skin samples can be explained by the storage of carcasses at the retail level, during which the number of

Campylobacter on them will reduce because of the oxygen harmful effects (Rajković et al., 2010, Cardinale et al., 2003; Boysen et al., 2007). Also, the different sampling sites on the carcass may influence the *Campylobacter* detection rates because the neck skin has larger feather follicles where *Campylobacter* often are rinsed in during the carcass rinsing process thus they are able to survive there for a longer time avoiding the toxic effect of oxygen. Feather follicles on broiler chicken carcass back skin usually are much smaller (Berndtson et al., 1992; Chantarapanont et al., 2003; Cason et al., 2004^b). The numbers and occurrence of *Campylobacter* may also be affected by the choice of carcass investigation technique, because it is possible to investigate the carcass by rinsing it all in the buffer solution or by investigating only a portion of the skin, most commonly within the range from 10 to 25g. Although the whole carcass rinse method yields a higher number of *Campylobacter*, *Campylobacter* presence by this method does not differ significantly (ISO 2006, Scherer et al., 2006; Musgrove et al., 2003).

In individual fecal samples and neck skin samples, *Campylobacter* occurrence was observed the highest in the spring, summer and autumn months with a significantly ($p < 0.05$) lower occurrence in winter. In general, in a temperate climate zone *Campylobacter* occurrence in meat products are observed the highest in the warm months of the year; when at the same time people have the highest number of campylobacteriosis cases (Friedman et al., 2000, EFSA 2012, EFSA, 2010^b, EFSA, 2008).

In our study, the analysis of the *Campylobacter* occurrence in broiler chicken carcass samples showed a significantly ($p < 0.05$) higher occurrence of *Campylobacter* in samples from the company A compared with the company B while the occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken neck skin samples from these companies differed insignificantly ($p > 0.05$). It may be due to the different carcass packaging methods used by the companies. Carcasses from the company A were packed in tight polyethylene packages, in contrast to the company B where the carcasses were packed in loose polyethylene bags. The research shows that packing of the broiler carcasses in a close polyethylene packaging can provide protective conditions to the *Campylobacter* cells from the harmful effects of oxygen in the air by reducing the oxidative stress, as well as extending and enhancing their chances of survival compared with the carcasses that are packed in loose packages (Garénaux et al., 2008; Kovalenko et al., 2010; Harrison et al., 2001).

Interpreting the data of *Campylobacter* occurrence, depending on the season in which the sample has been collected, there is evidence of seasonal variation with the highest frequency of *Campylobacter* isolation in fecal samples in the spring, summer and autumn months, and the lowest in winter months. This type of seasonal *Campylobacter* occurrence cycle have been described by a numerous authors who point out that such variation of *Campylobacter* in fecal samples is observed mainly in a temperate climate zone (Jacobs - Reitsma et al., 1994b; Nylen et al., 2002). Similar to our study, other researchers have also observed a radical decline in the occurrence of *Campylobacter* in the winter and autumn months and irregularity during the year,

but at the same time preserving the seasonality (Vandeplas et al., 2010, Jorgensen et al., 2011). In the USA, Willis et al. (2002) study reported that *Campylobacter* often were isolated in the winter and autumn months. As one of the factors that may affect *Campylobacter* seasonality and the occurrence is the air temperature (Guerin et al. 2007a; Guerin et al. 2007b; Vandeplas et al., 2010; Patrick et al., 2004). Therefore, in this context, the sampling day temperature was recorded at 5 pm in Jelgava according to the VSIA „Latvijas Vides, ģeoloģijas un meteoroloģijas centrs” data. As a result, we observed a tendency that broiler individual samples often contained *Campylobacter* when the air temperature was 10°C>20°C (Figure 3). The air temperature and the occurrence of *Campylobacter* in individual fecal samples had a high, statistically confident, positive correlation ($r=0.77$, $p<0.005$).

When comparing the data on the occurrence of *Campylobacter* in broiler carcasses in Latvia with the *Campylobacter* occurrence in broiler carcasses and meat samples in Estonia (Tartu), there was a little seasonal difference. In Tartu, the highest occurrence was observed in June, July and August, as in the other Nordic countries such as Sweden, Finland, Denmark and Norway (Roast et al., 2005; Kapperud, 1994; Rautelin and Hanninen, 2000; Wingstrand et al., 2006). Whereas the meat samples that were imported into Estonia and were commercially available on the Tartu market had a *Campylobacter* occurrence without a significant seasonal variation. The broiler meat, from which the samples were obtained, most often was sold frozen, and consequently it was impossible to know its production time (Roast et al., 2005). The seasonal variation of the occurrence of *Campylobacter* in Latvia as well as in other temperate zone countries may be explained by *Campylobacter* viability depending on the temperature. Studies in Norway and Iceland have shown that air temperature higher than 6°C in Norway and 4°C in Iceland affects significantly the occurrence of *Campylobacter* in broiler chicken houses and in slaughterhouses (Jonsson et al., 2012; Guerin et al., 2008). Our study found out that the air temperature of the sample collection day had a significant ($p\leq 0.01$) effect on the occurrence of *Campylobacter* in the broiler fecal samples, neck skin samples and carcass samples ($p<0.05$). The air temperature had a lower effect on the occurrence of *Campylobacter* in the carcass samples probably because the carcass samples were collected from different slaughter batches, so it was not possible to determine accurately the slaughter day air temperature.

Limiting the number of *Campylobacter* in broiler carcass samples

The experiment conducted with broiler meat packaging in different packaging atmospheres and evaluation of *Campylobacter* dynamics during the storage time have shown that the number of *Campylobacter jejuni* in 48 hours decreased most rapidly in broiler meat packed in the air atmosphere containing about 20% of oxygen, while a significantly slower decrease was observed in MAP (modified atmosphere packaging) which consisted of a mixture of gases ($\text{CO}_2 = 43.8\%$, $\text{O}_2 = 0.2\%$, $\text{N}_2 = 57\%$). The dynamics of *Campylobacter* during the storage are shown in Table 3.

The results coincide with the results of studies by other authors who have noted that in order to reduce meat *Campylobacter* number packing in gas mixture with a high CO₂ and low O₂ level, even though it extends the shelf life of the product, limiting the development of spoilage microflora and extending microorganism lag phase is inadequate (Rajković et al., 2010; McMillin, 2008; Mangaraj and Goswami, 2009, Boysen et al., 2007). However, it should be noted that in *Campylobacter* spp. population may exist strains that are resistant to oxidative stress or due to *Campylobacter* genome mutations the air oxygen is less toxic to them (Garénaux et al. 2008; Gaynor et al. 2005; Gundogdu et al., 2011).

In addition to the above method broiler chicken meat sample treatment with ozonated water did not reach the desired result because the number of *Campylobacter* after 25, 35 and 45 minutes of treatment during the storage time did not decrease but increased. This phenomenon is thought to be caused by several factors or combination of these factors such as ozone ability to dissolve fats binding to them. This mechanism is also partly responsible for the ozone disinfectant properties in the cell walls of bacteria where ozone oxidizes unsaturated fat. The mechanism of the increase of the number of *Campylobacter* during the storage is due to the characteristics of the broiler skin because before the treatment with ozonated water feather follicles in the skin were closed with the "fat plugs" that ozone dissolved, thereby opening the feather follicles and increasing the number of *Campylobacter* on the carcass surface (Khadar et al., 2001; Osiriphun et al., 2009; Cason et al. 2004^b). It could explain the increase in the number of *Campylobacter* from 3.3 log CFU/1g in control sample to 7.1 log CFU/1g in the treated sample in 45 minutes of treatment. In addition, the ozone ineffectiveness in reducing the number of *Campylobacter* is affected by the chemical properties of *Campylobacter* cell surface, which consists mostly of polysaccharides, may effectively prevent ozone to penetrate into the deeper layers of the *Campylobacter* outer membrane as soon as *Campylobacter* are exposed to oxidative stress they expand their polysaccharide sheath (Garénaux et al., 2008; Gundogdu et al., 2011; Karlyshev et al., 2001; Khadar et al., 2001). The ozone efficiency probably was also reduced because of the fat layer of the skin, other bacteria and various organic matters which could attract ozone, thereby reducing the amount of free ozone (Virender et al., 2010).

***Campylobacter* species in broiler production at the two largest slaughterhouses in Latvia**

In the study, we investigated 74 randomly selected *Campylobacter* strains which were isolated from the company A and B. Performing colony multiplex PCR and gel electrophoresis it was found out that all 74 strains belonged to the genus *Campylobacter* because the 23S rRNA gene aplicon that was 650 base pair long fragment and was observed in all samples. Of all 74 *Campylobacter* spp strains 37.8% (n=28) were *C. jejuni*, 60.8% (n=45) *C. coli*, and 1.3% (n=1) were unidentified (Figure 4).

Analyses of *Campylobacter* isolates from two Latvian broiler chicken meat producing companies were significantly different in pooled fecal samples. From the company A mainly *Campylobacter coli* (86.9%) were found, while in the company B pooled fecal samples mainly *Campylobacter jejuni* (88.9%). The study results confirm that broiler feces can contain thermophilic *Campylobacter* species because the failure of proper slaughter hygiene can serve as a source of meat contamination (Melero et al., 2012, Herman et al., 2011).

Campylobacter isolated from the neck skin samples (n=14) obtained after cooling of carcasses in the slaughterhouse A in 100% of cases represented only *Campylobacter coli*, but *Campylobacter* isolated from the slaughterhouse B broiler chicken neck skin samples (n=5) in 100% of cases were only *Campylobacter jejuni*. The research results confirm the fact that the broiler chicken carcasses, neck skins and feces contain the two most prevalent species of thermophilic *Campylobacter* which can cause campylobacteriosis in humans (Bolla et al., 2008, Denis et al., 2011). Probably because of the carcasses position during the slaughter and processing in large slaughterhouses where they are hung by legs up with the cranial end down they are contaminated with *Campylobacter* directly from the intestinal content, which along with the rinse water during the processing drains along the carcass (Normand et al., 2008, EFSA, 2011^c, FSAI, 2011, Ugarte-Ruiz et al., 2012). This fact also explains the uniformity of *Campylobacter* species in the neck skin samples which contained the dominated *Campylobacter* species. The study investigated the *Campylobacter* isolates from broiler chicken carcasses from two supermarkets in Jelgava (n=23). Samples of the company B in 90% of cases were *C. jejuni* contaminated but in the company A only in 31%. *Campylobacter*, which belonged to species *C. coli*, in samples from the company A were isolated in 69% of cases, while from the company B only one isolate (10%) belonged to the species *C. coli*. Similar results as in the samples from the company B are in a number of previous studies in Europe (EFSA, 2011^c; EFSA, 2012) and elsewhere (Pamuk and Akgun, 2008; Bao et al., 2006; McCrea et al., 2008; Son et al., 2007). Concerning the high *C. coli* occurrence in the samples of the company A, in literature are mentioned only few cases when *C. coli* is dominated within a single farm and the same farm produced broiler chicken carcasses while in the state level the dominant *Campylobacter* species has been *C. jejuni* (Cesare et al., 2008; Manfred et al., 2006).

Studies have shown that in broilers just as on the farm environment mainly *Campylobacter* species *C. jejuni* is found but much less frequently *C. coli* (Newell and Fearnley, 2003; Tram et al., 2012; Melero et al., 2012; Schnide et al., 2010; Malher et al., 2011; Kuhnert et al., 2010; Pepe et al. 2009), although *C. coli* occurrence in broilers can increase after the fifth week of life (El-Shibiny et al., 2005). Another study has shown that sometimes broiler chicken house may be colonized only by one *Campylobacter* species but sometimes even several (Reich et al., 2008). In the present study we have found that farm birds can be colonized with two in birds' most prevalent *Campylobacter* species (*C. jejuni* and *C. coli*). At present, it is impossible to determine why in one company *C. coli* is mainly found;

however, it is likely that *Campylobacter* is transmitted in the chicken house from the outdoor where *C. coli* can be found in both rodents and insects and in the winter period also in wild birds (Horrocks et al., 2009; Hald et al., 2003; Hald et al., 2008). During the winter, *C. coli* can be isolated more frequently from the wild birds; also the limited availability of feed for the wild birds may induce foraging near the broiler chicken houses and may contaminate the feed (Hald et al., 2003). Also, it should be taken into account that in winter air temperatures are significantly lower, compared with a summer temperature, and *Campylobacter* are more capable of prolonged viability in the environment and feed (Newell and Fearnley, 2003; Bui et al., 2011; Höller et al., 1998). Analyzing differences of *Campylobacter* species between the company A and B, we cannot exclude the impact of the forest on the chicken houses. A relatively small distance between the company A chicken houses and the forest is around 100 to 200m. In large forests wildlife, including wild boar and other wild animals, can serve as a reservoir for *Campylobacter*, but wild birds and rodents as a reservoir of *Campylobacter* and also as a potential *Campylobacter* vector which can facilitate transmission of *Campylobacter* species from the wild to broiler houses (Wahlstrom et al., 2003; Hald et al., 2003). Since the occurrence of *Campylobacter* species and prevalence of Latvian wildlife are unknown, we can only speculate about this matter.

Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from broiler chicken fecal samples obtained from the two major broiler chicken meat producing companies

The present studies established that most of isolates were resistant to ciprofloxacin and nalidixic acid: 83.3% (n=50) of isolates grew at ciprofloxacin concentration of 8 µg/ml, and 78.3% (n=47) at nalidixic acid concentration of 64 µg/ml. The least observed resistance was to streptomycin and gentamicin, while 20% (n=12) had grown at streptomycin and gentamicin concentrations of 8 µg/ml and higher. Between fluoroquinolone and aminoglycoside antimicrobial group a significant difference of resistance of *Campylobacter* was not observed ($p>0.05$). In the present study, 35% (n=21) of the tested isolates were resistant to erythromycin, 36.7% (n=22) to tetracycline (Figure 5).

Overall, 41.6% (n=25) of *Campylobacter* isolates were resistant to two or more unrelated antimicrobials of which 30% (n=18) were resistant to three or more unrelated antimicrobials, and 13.3% (n=8) were resistant to all studied antimicrobials. The most common antimicrobial resistance pattern was in combination of nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline and erythromycin.

A statistically significant difference ($p=0.0001$) was found out in erythromycin resistance between samples from the slaughterhouse A and B. Among the other antimicrobials, no significant ($p>0.05$) resistance differences in *Campylobacter* isolates from different slaughterhouses were observed. When analyzing the differences of resistance of *Campylobacter* isolated from the slaughterhouse A, there was a significant difference ($p\leq 0.01$) between the resistance to erythromycin and ciprofloxacin, streptomycin and gentamicin. *Campylobacter* isolates from the

slaughterhouse B resistance to erythromycin differed significantly ($p<0.0001$) only from antimicrobial resistance rates of the fluoroquinolone group antimicrobials. Generally, resistance to fluoroquinolones for isolates from the slaughterhouse A was significantly ($p<0.05$) higher than the resistance to tetracycline, gentamicin and streptomycin. Resistance to ciprofloxacin was significantly ($p\leq 0.01$) higher than that to erythromycin. From the slaughterhouse A isolated *Campylobacter* strains resistance to tetracycline was significantly ($p<0.05$) higher than the resistance to antimicrobials belonging to the aminoglycoside group. Isolates from the slaughterhouse A showed no significant ($p>0.05$) differences between the mentioned antimicrobials. *Campylobacter* isolates from the slaughterhouse B showed significantly ($p<0.0001$) higher resistance to the fluoroquinolone group of antimicrobials, compared with tetracycline and aminoglycoside group.

Most commonly determined resistance in the tested *Campylobacter* strains from both slaughterhouses was determined for the fluoroquinolone group of antibiotics. Separately, *Campylobacter* strains from the slaughterhouse A were most frequently resistant to the macrolide group of antimicrobials, when 56.7% of the examined strains showed resistance to erythromycin. Macrolides and fluoroquinolones are first and second line medicines recommended for human campylobacteriosis (Zhao et al., 2010), and increasing resistance to these antimicrobials has been observed since they began to be used in meat production (Smith et al., 1999; Engberg et al., 2001; Ge et al., 2003; Gupta et al., 2004; Serichantalergs et al., 2007).

In our previous research, when the broiler chicken fecal, meat and neck skin samples from the same slaughterhouses were tested, it was found that in the samples from the slaughterhouse A a dominant *Campylobacter* species was *Campylobacter coli*, while in the slaughterhouse B – *Campylobacter jejuni*. We believe that the resistance of *Campylobacter* in these two companies is affected by *Campylobacter* species, as several authors in their publications highlight *Campylobacter* resistance vary by the *Campylobacter* species. *C. coli* resistance to erythromycin has been reported more frequently in many previous studies (Garin et al., 2012, Gallay et al., 2007; Lehtopolku et al., 2010). Relatively higher *C. coli* resistance to erythromycin is due to the fact that it has more frequent A2059G point mutation in the 23S RNA gene, which is in 91% of cases responsible for the development of resistance to erythromycin. The same mutation in the mentioned gene is responsible for macrolide resistance in *E. coli* (Lehtopolku et al., 2011, Cui 2011). Comparing the resistance rates of *Campylobacter*, especially from the slaughterhouse A, to erythromycin, it becomes obvious that *C. coli* resistance to erythromycin in other EU countries is lower than in our study. In Poland, it was 9.3% (Maćkiw et al., 2011), in Austria 9%, in Netherlands 5%, in France 10%, and in Spain 35%, while *C. jejuni* resistance to erythromycin in EU during the year 2010 was no higher than 6% (EFSA, 2012). At the same time, the *Campylobacter* isolated from humans in EU during the year 2010 showed on average 11% for *C. coli* and 1.1% for *C. jejuni* resistance to erythromycin (EFSA, 2012). In Finland, 50% of *C. coli* isolates that were isolated during the period 2003 to 2005 were resistant to erythromycin (Lehtopolku et al., 2010).

The resistance to fluoroquinolone group of antimicrobials among *Campylobacter* species also tends to differ. In a number of studies it has been found out that *C. jejuni* resistance to ciprofloxacin and nalidixic acid is more uncommon compared with *C. coli* (EFSA, 2012; Gallay et al., 2007; Desmonts et al., 2004). In other studies, *C. jejuni* resistance rates were higher than in *C. coli* (Chen et al., 2010; Piddock et al., 2008; Son et al., 2007; Salihu et al., 2012). The present study showed that the *Campylobacter* isolates from the slaughterhouse A were less resistant to fluoroquinolones, compared with *Campylobacter* isolates originated from the slaughterhouse B. The resistance of *Campylobacter* from the slaughterhouse B was to ciprofloxacin (90%) and to nalidixic acid (86.7%). A similar resistance was observed in 2010 in Poland, where resistance to ciprofloxacin among *C. jejuni* isolates was 83%, and to nalidixic acid 80%. In the same Polish study, it was found that resistance among *C. coli* to ciprofloxacin and nalidixic acid was 90% (EFSA, 2012).

Campylobacter resistance to tetracycline in isolates from the slaughterhouse A and B was insignificantly different ($p>0.05$). It was similar to EU countries in general. In 2010, only nine of EU countries were notifying about *C. jejuni* isolate resistance to tetracycline, and it was 32%. While the resistance of *C. coli* was higher, because in five of EU countries the average of 73% of *C. coli* isolates were resistant to tetracycline (EFSA, 2012). In the past ten years, the lowest resistance of *Campylobacter* to tetracycline was registered in Denmark, and it was only 10%, but the highest was reported in China as 100% (Hariharan et al., 2009; Han et al., 2009; Bester and Essack, 2012; Son et al., 2007; Chen et al., 2010; Maćkiw et al., 2012; Skjøt-Rasmussen et al., 2009).

The lowest resistance of *Campylobacter* strains isolated from the slaughterhouse A and B was observed in aminoglycoside antimicrobials which on average did not exceed 30%. Among EU countries in 2010, only in Spain 25% of *C. coli* isolates were resistant to gentamicin. On average, only 0.8% of the EU *C. jejuni* isolates showed resistance to these antimicrobials (EFSA, 2012). Other studies have similarly observed a relatively low *Campylobacter* resistance to gentamicin, such as Poland. In 2008-2009 it was found out that 11.4% of *C. jejuni* isolates and 4.6% of *C. coli* isolates were resistant to gentamicin (Maćkiw et al., 2012). In 2008, in China it was found that 92.3% of *C. coli* isolates were resistant to gentamicin, but among *C. jejuni* isolates only 27.2% were resistant (Chen et al., 2010). Usually, the resistance to streptomycin is not significantly different from the resistance to gentamicin, as they affect the same resistance mechanisms (Oporto et al., 2009; Guévremont et al., 2006). In our study, it was found out that 41.6% of the *Campylobacter* strains were resistant to at least two unrelated groups of antimicrobials, and 30% were resistant to more than three different antimicrobials. High level of multiresistance among these isolates may lead to difficult to treat campylobacteriosis cases in humans. Therefore, a constant monitoring of resistance is required in both human and poultry *Campylobacter* strains, and the usage of antibiotics in poultry meat production should be more restricted in Latvia.

CONCLUSIONS

1. Broiler chicken meat produced in Latvia can serve as a source of campylobacteriosis causative agent vector in humans, because in the broilers reared in Latvia, as well as in the broiler chicken meat on average 63% thermophilic *Campylobacter* contamination was found and *Campylobacter* occurrence between the two largest Latvian broiler chicken meat producing companies were insignificantly different ($p>0.05$).
2. There was a positive correlation between the probable occurrence of thermophilic *Campylobacter* in broiler chicken fecal samples, neck skin samples and carcase samples and the air temperature on sampling day ($r=0.75$, $r=0.66$, $r=0.65$, $p<0.05$, respectively), what also explains why the significantly ($p<0.05$) more likely *Campylobacter* were isolated from these samples in the spring and summer months.
3. In the company A reared broiler chicken samples significantly more often ($p<0.05$) were contaminated with *Campylobacter coli* contrary to the company B in which samples had a higher prevalence of *Campylobacter jejuni*. It shows that in Latvia two most common *Campylobacter* species are widely distributed.
4. Isolated *Campylobacter* spp. strains had a high level of antimicrobial resistance, especially to fluoroquinolones, but significantly lower ($p<0.05$) to tetracycline, erythromycin and aminoglycoside group of antibiotics, therefore in human campylobacteriosis cases treatment with antimicrobials of fluoroquinolone group may be ineffective.
5. The most rapid decline in the number of *Campylobacter* during the storage was observed in broiler meat samples packed in packages with air compared with the samples packed in MAP and vacuum packaging.
6. Broiler meat treatment with ozonated water to minimize contamination with *Campylobacter* did not give the desired result of *Campylobacter* reduction.

RECOMMENDATIONS FOR PRACTICE

1. The safety level should be inspected in the broiler chicken producing companies; the slaughter and meat processing hygiene of broiler chickens also should be improved, thus the occurrence of *Campylobacter* would be reduced on farms and broiler chicken meat.
2. To limit the contamination level of carcasses during the storage time, a modified atmosphere packaging with high oxygen content can be used while the use of vacuum packaging or other type of tight packaging should be avoided.
3. To reduce the risk of being *Campylobacter* infected, consumers of broiler chicken meat should meticulously observe the kitchen hygiene avoiding contact of already cooked product with a raw one as well as surfaces being in contact with this product.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my gratitude to the staff of the National Veterinary Institute SVA for the support carrying out determination of *Campylobacter* antimicrobial resistance, as well as to the Scientific Institute of Food Safety, Animal Health and Environment BIOR, and the Latvian State Institute of Fruit Growing for the technical and scientific support for acquisition of molecular techniques.

I am very thankful to my scientific supervisors and reviewers for their great work and patience.

Also, I would like to say many thanks to everyone who were together with me during the time of doing this research for their unselfish support.

SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND THESES

1. Kovalenko K., Roasto M., Mäesaar M., Meremäe K., Kramarenko T. (2013). *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* prevalence study in 2012. IAFP's European Symposium on Food Safety proceedings, p. 57.
2. Kovalenko K., Roasto M., Liepiņš E., Mäesaar M., Hörmann A. (2013) High occurrence of *Campylobacter* spp. in Latvian broiler chicken production. Food Control, Vol. 29 (1), pp. 188–191.
3. Roasto M., Mäesaar M., Muuttra K., Meremäe K., Kovalenko K., Kramarenko T. (2013). *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* prevalence in 2012. FOODBALT-2013, pp. 60-61.
4. Kovalenko K., Roasto M., Liepiņš E., (2012). The effect of air temperature on occurrence of thermophilic *Campylobacter* spp. in Latvian broiler chicken production on day of sampling. Veterinārmedicīnas raksti 2012, pp. 72-76.
5. Roasto M., Mäesaar M., Meremäe K., Muuttra K., Kovalenko K., Kramarenko T. (2012). *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* in Estonian food chain. Veterinārmedicīnas raksti 2012, pp. 233-234.
6. Kovalenko K., Roasto M. (2012) High occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Latvian Broiler Chicken Production. IAFP's European Symposium on Food Safety Proceedings, p. 45.
7. Kovalenko K., Roasto M., Ruzaiķe A., Liepiņš E. (2011) *Campylobacter* spp. Occurrence on Broiler Chicken Carcasses at Retail Level in Latvia. Proceedings of the 17th International Scientific Conference „Research for Rural Development 2011”, Jelgava, 18-20 May, pp. 157-160.
8. Roasto M., Kovalenko K., Praakle-Amin K., Meremäe K., Tamme T., Kramarenko T. (2010) Review of the contamination and health risks related with *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* in food supply with special reference to Estonia and Latvia. Agronomy Research, 8 (Special Issue II), pp. 333 - 338.
9. Kovalenko K., Ruzaiķe A., Roasto M., Liepiņš E., (2010). Dynamics of *Campylobacter jejuni* in raw poultry meat depending on packaging atmosphere. Veterinārmedicīnas raksti 2010, p.165