

DOROTA KORSAK<sup>1</sup>, KATARZYNA DZIERŻANOWSKA-FANGRAT<sup>2</sup>, JANUSZ POPOWSKI<sup>1</sup>,  
ELŻBIETA ROŻYNEK<sup>2</sup>

## WYSTĘPOWANIE MARKERÓW ZJADLIWOŚCI *IAM* W SZCZEPACH *CAMPYLOBACTER JEJUNI* I *CAMPYLOBACTER COLI* IZOLOWANYCH Z TUSZ DROBIOWYCH\*

INCIDENCE OF THE VIRULENCE MARKERS *IAM* IN *CAMPYLOBACTER*  
*JEJUNI* AND *CAMPYLOBACTER COLI* STRAINS ISOLATED FROM  
POULTRY CARCASSES

<sup>1</sup>Zakład Bezpieczeństwa Żywności i Żywienia  
Instytut Żywności i Żywienia  
02-903 Warszawa, ul. Powsińska 61/63  
Kierownik: dr *L. Szponar*

<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej  
Instytut Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka  
04-730 Warszawa, Al. Dzieci Polskich 20  
Kierownik: prof. dr hab. *D. Dzierżanowska*

*Z tusz kurcząt izolowano termotolerancyjne szczepy Campylobacter, określano ich przynależność gatunkową, a następnie badano w nich obecność sekwencji DNA kojarzonej z inwazyjnymi właściwościami tych szczepów.*

### WSTĘP

W klinicznym obrazie przebiegu zakażenia wywołanego przez termotolerancyjne szczepy *Campylobacter* obserwuje się znaczne zróżnicowanie, począwszy od całkowitego braku objawów, poprzez biegunki typu sekrecyjnego aż do biegunek połączonych ze stanem zapalnym i obecnością krwi. Występujące niekiedy pozajelitowe skutki zakażenia to zapalenie opon mózgowych, bakteriemia, i komplikacje o charakterze autoimmunoagresji, takie jak zespół *Guillain-Barré*, czy reaktywne zapalenie stawów. Ten szeroki wachlarz klinicznych manifestacji po części zależy od gospodarza, lecz przede wszystkim wiąże się z właściwościami patogenów. Np. symptomy jelitowe zależą od takich cech jak wytwarzanie choleropodobnej toksyny [8], cytotoxyny [10, 11] oraz zdolności do adhezji i inwazji do komórek epitelium [3]. Stwierdzono [3], że w szczególności ta ostatnia cecha może być odpowiedzialna w dużej mierze za zjadliwość ocenianą na podstawie obecności lub braku

---

\* Praca wykonana w ramach tematu statutowego IŻŻ oraz grantu KBN nr PB 0371/PO5/2002/23.

objawów biegunkowych. Ponad 70% szczepów izolowanych od chorych z biegunką wykazywało zdolność do adhezji do komórek HEP-2, natomiast szczepy izolowane od pacjentów bezobjawowych były w większości (83%) niezdolne do adhezji. Podobną korelację obserwuje się pomiędzy obecnością pewnej sekwencji DNA zwanej *iam* (ang. *invasion associated marker*) w genomie niektórych szczepów *Campylobacter* a stanami biegunkowymi wywoływanymi przez te szczepy [1]. Rozpowszechnienie w żywności szczepów *Campylobacter* posiadających własności inwazyjne nie było dotychczas badane i mogłoby stanowić ważny element w ocenie ryzyka zagrożenia kampylobacteriozą.

W prezentowanej poniżej pracy podjęto próbę oceny częstości występowania szczepów inwazyjnych w obrębie gatunków *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli* izolowanych z tusz drobiowych w oparciu o oznaczenie częstości występowania markera *iam* za pomocą PCR.

## MATERIAŁ I METODY

### Izolacja *Campylobacter*.

Materiał badawczy stanowiły tusze kurecząt z ubojni w Karczewie, po odpieniu a przed patroszeniem. Wymazy z kloaki kurecząt wykonane przy użyciu sterylnych pałeczek do wymazów nanoszono na nitrocelulozowy filtr membranowy (Sartorius) o średnicy porów 0,65 µm umieszczony w szalce *Petrie*go na powierzchni agaru *Brucella* uzupełnionego krwią i antybiotykami, (7 ml odwłóknionej krwi końskiej oraz 0,4 ml zestawu antybiotyków firmy Oxoid zawierającego 1 mg wan-

Tabela I. Zestawy starterów używane do identyfikacji gatunkowej oraz wykrywania sekwencji *iam*  
Sets of primers used for species identification and *iam* sequence detection

Nazwy starterów i rodzaj badania	Sekwencja starterów (5' – 3')	Wielkość produktów (pz)	Písmienictwo
Multipleks PCR, identyfikacja C.j.* i C.c.* Mu 1 Mu 2 Mu 3 Mu 4	CATCTTCCCTAGTCAAGCCT AAGATACTCTAGCAAGATGG AGGCAAGGGAGCCTTTAATC TATCCCTATCTACAATTCGC	773 (C.j.)* 364 (C.c.)*	[6]
Identyfikacja C.j.* HipOR2 HipOF2	AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG GAAGAGGGTTTGGGTGGT	500	[4]
Identyfikacja C.c.* CC 1 CC 2	GGTATGATTTCTACAAAGCGAG ATAAAAAGACTATCGTCGCGT	500	[4]
Identyfikacja <i>iam</i> 1,6F 1,6R	GCGCAAAA TATTATCACCC TTCACGACTACTATGCGG	518	[1]

\* C.j. = *Campylobacter jejuni*, C.c. = *Campylobacter coli*

komycyny, 250 j. polimyksyny, 0,5 mg trimetoprimu, 0,2 mg amfoterycyny B i 1,5 mg cefalotyny na 100 ml podłoża). Po 4 godzinach inkubacji w temperaturze 42°C, w warunkach mikroaerofilnych filtry usuwano, a podłoże inkubowano przez dwie doby w tych samych warunkach. Uzyskane kolonie diagnozowano pod kątem przynależności do rodzaju *Campylobacter*; najpierw wstępnie poprzez ocenę morfologii komórek w mikroskopie kontrastowo-fazowym, a następnie za pomocą polimerazowej reakcji łańcuchowej.

Identyfikacja gatunkowa oraz identyfikacja genu *iam* za pomocą PCR.

Dla przeprowadzenia PCR pojedyncze kolonie zawieszano w 100 µl H<sub>2</sub>O z 10 µl 20% zawiesiny chelatującej żywicy Chelex-100. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze 100°C próbkę odwirowywano a z supernatantu zawierającego wyekstrahowane DNA wykonywano serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń, z których pobierano po 5 µl roztworu do reakcji amplifikacji.

Gatunkową identyfikację przeprowadzano przy użyciu metody multipleks PCR według metody opisanej przez Vandamme i wsp. [9]. Dodatkowe potwierdzenie w wątpliwych przypadkach było wykonywane za pomocą dwóch oddzielnych zestawów starterów specyficznych dla *C. jejuni* i *C. coli* zgodnie z metodyką opisaną przez On i Jordan [6]

Badanie obecności markera *iam* wykonano w oparciu o metodykę Carvalho i wsp., [1]. Sekwencje starterów użytych w reakcjach PCR przedstawiono w tabeli I.

Reakcje prowadzono na termocyklerze Perkin Elmer 2400, a uzyskane produkty analizowano metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym. Powyższa analiza pozwalała na potwierdzenie przynależności badanych bakterii do gatunku *Campylobacter jejuni* lub *Campylobacter coli* oraz obecności markera *iam* w poszczególnych szczepach.

## WYNIKI

Stosując technikę opisaną w części metodycznej wyizolowano z tusz drobiowych 70 szczepów należących do grupy termotolerancyjnych bakterii rodzaju *Campylobacter*. Następnie, za pomocą metody multipleks PCR, przy użyciu czterech starterów, określono przynależność gatunkową wyizolowanych szczepów. Ostateczna weryfikacja gatunkowa była przeprowadzona z zastosowaniem dwóch oddzielnych reakcji PCR [4]. Spośród wyizolowanych 70 szczepów należących do rodzaju *Campylobacter*, do gatunku *Campylobacter jejuni* należało 48 szczepów, a 22 szczepy do gatunku *Campylobacter coli*.

Tabela II. Występowanie genu *iam* w szczepach *Campylobacter jejuni* i *Campylobacter coli*

The incidence of *iam* sequence in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains

Gatunek	Liczba oraz (%) szczepów <i>iam</i> <sup>+</sup>	Liczba oraz (%) szczepów <i>iam</i> <sup>-</sup>
<i>Campylobacter jejuni</i>	33 (69%)	15 (31%)
<i>Campylobacter coli</i>	22 (100%)	0 (0%)

Czyste szczepy o określonej przynależności gatunkowej poddano analizie na obecność genu *iam*. Rezultaty przedstawia Tabela II. Wykazano, że wszystkie szczepy gatunku *Campylobacter coli* są nosicielami markera *iam*, podczas gdy w obrębie izolatów *C. jejuni* u 31% nie wykryto poszukiwanej sekwencji.

## DYSKUSJA

Zastosowanie metody RAPD pozwoliło *Carvalho i wsp.* [1] na skojarzenie obecności określonej sekwencji DNA ze zdolnością szczepów *Campylobacter jejuni* do wywoływania biegunki. Produkt domniemanego genu *iam* nie został dotychczas wyizolowany i nie wiadomo jaki jest mechanizm jego działania. Wydaje się prawdopodobne, że istnieje szereg współdziałających lub alternatywnych czynników umożliwiających adhezję *Campylobacter* do komórek epitelium [2, 5]. Inne dane [7] również zwracają uwagę na fakt istnienia nie jednego, lecz szeregu czynników inwazyjnych, których wydzielanie jest odpowiedzią na sygnał jaki stanowi obecność soli żółciowych i pewnych komponentów komórek eukariotycznych. Odbiór tych sygnałów zależy od receptorów obecnych w ścianie komórkowej *Campylobacter*. Miejsce produktu markera *iam* w tym złożonym obrazie nie zostało dotychczas ustalone i wymaga dalszych badań. Uzyskane wyniki pozwalają jednak wyciągnąć wniosek, że gen *ten*, choć może nie jest absolutnie konieczny dla kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt przez *Campylobacter jejuni*, lecz zapewne daje jakąś przewagę selekcyjną, ponieważ prawie 70% szczepów tego gatunku jest nosicielem badanej sekwencji. Bardziej zdecydowanie wygląda to w obrębie gatunku *Campylobacter coli*, gdzie obecność markera obserwuje się u wszystkich szczepów. Jak się więc wydaje, jego utrata mogłaby skutkować zanikiem zdolności do zasiedlania przewodu pokarmowego ptaków.

Niezależnie od obecności czy braku sekwencji *iam* w genomie *Campylobacter*, obecność tych bakterii w przewodzie pokarmowym ptaków jest na ogół bezobjawowa, inaczej niż w populacji ludzkiej. W przypadku człowieka, na podstawie danych cytowanych we wstępie, można przyjąć, że produkt genu *iam* w znacznym stopniu uczestniczy w powstaniu stanów biegunkowych, choć zapewne nie jest to czynnik jedyny i wystarczający. Świadczą o tym wyniki *Carvalho i wsp.* [1], który podaje, że 63% szczepów *C. jejuni* i *C. coli* wyizolowanych od pacjentów z biegunkami zawierało marker *iam*, podczas gdy wśród szczepów izolowanych z pacjentów bezobjawowych tylko 16% zawierało badany marker. Jednocześnie na podstawie tych samych wyników należy zauważyć, że całkiem pokaźny jest procent przypadków kiedy obecność genu *iam* nie prowadzi do biegunki, oraz przypadków, kiedy mimo braku tego markera mamy do czynienia z wystąpieniem tego objawu. Można to tłumaczyć albo indywidualną podatnością czy odpornością gospodarza, albo koniecznością współistnienia innych dodatkowych markerów dla manifestacji zakażenia. Innym wyjaśnieniem braku stuprocentowej korelacji pomiędzy istnieniem markera *iam* i biegunką jest specyfika metody PCR, która potwierdza tylko obecność pewnych sekwencji z badanego genu lecz nie gwarantuje jego integralności i gotowości do ekspresji. Zatem szczep bakterii zawierający sekwencję *iam* z pewnymi uszkodzeniami uniemożliwiającymi powstanie produktu lub jego prawidłową aktywność ciągle może być fałszywie identyfikowany jako *iam*<sup>+</sup>. Naturalnie, możliwa jest również odwrotna sytuacja spowodowana wysoką zmiennością typową dla *Campylobacter*, a mianowicie, że mutacja w rejonie komplementarnym do użytych starterów może być obojętna dla aktywności genu, natomiast wywoła negatywny wynik oznaczenia. Statystyczne obliczenia wykonane przez *Carvalho i wsp.* [1] wykazują że specyficzność oznaczeń markera *iam* wykonanych metodą PCR wynosi ok. 87%, zatem wyniki uzyskane tą metodą, choć nieco zgrubne pozwalają wysnuć wniosek, że większość szczepów *Campylobacter* wyizolowanych od kurcząt zawiera marker inwazyjności *iam*, a biorąc pod uwagę fakt, że przewody pokarmowe kurcząt są na ogół kolonizowane przez

mieszane populacje kilku szczepów, można uznać za wysoce prawdopodobną obecność inwazyjnych szczepów prawie w każdej tuszy drobiowej.

Przedstawione wyżej badania stanowią również istotny element informacji epidemiologicznej, potwierdzając podejrzenia, że tusze drobiowe mogą stanowić bardzo istotny potencjalny rezerwuar inwazyjnych i patogennych dla człowieka szczepów *Campylobacter*.

D. Korsak, K. Dzierżanowska-Fangrat, J. Popowski, E. Rozynek

INCIDENCE OF THE VIRULENCE MARKERS *IAM*  
IN *CAMPYLOBACTER JEJUNI*  
AND *CAMPYLOBACTER COLI* STRAINS ISOLATED  
FROM POULTRY CARCASSES

Summary

Previously found DNA sequence (*iam*), correlated with the invasiveness of *Campylobacter* strains, became a starting point for present investigation. Main goal of this study was to isolate number of *Campylobacter* strains from chicken carcasses, to determine their taxonomic position and to establish the presence of *iam* sequence in their genomes. It was found, that invasion associated marker is present in all *Campylobacter coli* strains and in majority but not all *Campylobacter jejuni*. This may confirm the idea that the marker is not only responsible for diarrhea in humans but also may be important in the colonization of chicken guts.

PÍSMIENNIC TWO

1. *Carvalho A.C.T., Ruiz-Palacios G.M., Ramos-Cervantes P., Cervantes L., Jiang X., Pickering L.K.*: Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 1353-1359.
2. *Jin S., Joe A., Lynett J., Hani E.K., Sherman P., Chan V.L.*: JipA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni* mediates adherence to host epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 2001, 39, 1225-1236.
3. *Ketley J.M.*: Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology* 1997, 143, 5-21.
4. *Linton D., Lawson A.J., Owen R.J., Stanley J.*: PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 2568-2572.
5. *Nadeau E., Messier S., Quessy S.*: Comparison of *Campylobacter* isolates from poultry and humans: Association between in vitro virulence properties, biotypes, and puls-field gel electrophoresis clusters. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 6316-6320.
6. *On S., Jordan P.*: Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 330-336.
7. *Rivera-Amill V., Kim B.J., Sashu J., Konkel M.E.*: Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *J. Infect. Dis.* 2001, 183, 1607-1616.
8. *Ruiz-Palacios G.M., Torres J., Torres N.I., Escamilla E., Ruiz-Palacios B.R., Tamayo J.*: Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. Characterization and clinical significance. *Lancet* 1983, 2(8344), 250-3.
9. *Vandamme P., Van Dorn L.J., al Rashid S.T., Quint W.G., van der Plas J., Chan V.L., On S.L.*:

- Campylobacter hyoilei* Adlerton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Vernon and Chatelain 1973 are subjective synonyms. Int. J. Syst. Bacteriol. 1997, 47, 1055-1060.
10. Wassenaar T.M.: Toxin production by *Campylobacter* spp. Clin. Microbiol. Rev. 1997, 10, 466-476.
  11. Whitehouse C.A., Balbo P.B., Pesci E.C., Cottle D.L., Mirabito P.M., Picket C.L.: *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G<sub>2</sub>-phase cell cycle block. Infect. Immun. 1998, 66, 1934-1940.

Otrzymano: 2004.02.19