

Ocena występowania wybranych genów zjadliwości oraz antybiotykooporności

Campylobacter jejuni pozyskanych od psów

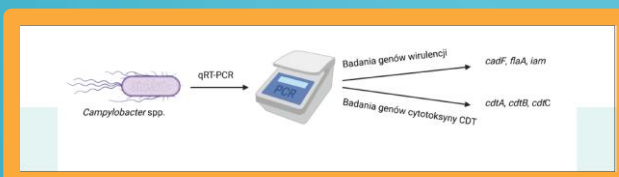
Marek Selwet, Alicja Niewiadomska, Agnieszka Wolna - Maruwka, Dorota Swędrzyńska

Katedra Gleboznawstwa i Mikrobiologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

WSTĘP. Termotolerancyjne bakterie z rodzaju *Campylobacter* (głównie *Campylobacter jejuni* oraz *Campylobacter coli*) stanowią część naturalnej flory jelitowej ssaków oraz ptaków, są również obecne w zanieczyszczonej odchodami zwierząt wodzie i glebie. Coraz częściej izolaty *Campylobacter* spp. wykazują oporność na stosowane chemioterapeutyki z grupy chinolonów, czy antybiotyki z grupy aminoglikozydów oraz makrolidów, co stanowi zagrożenie dla zdrowia publicznego. Nabywanie oporności jest często związane ze spontanicznymi mutacjami punktowymi genów kodujących enzymy syntetyzowane przez *Campylobacter* spp. Za patogenność bakterii odpowiadają geny, które warunkują ruchliwość, przyczepność, inwazyjność i syntezę toksyny-CDT (CDT-cytolethal distending toxin), kodowanej przez trzy geny – *cdtA*, *cdtB* i *cdtC*. Cytotoksyna ta powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M. Inne geny wirulencji to m.in: *fla*, *cad*, *rac*, *vir*, *cia*, *pld*, *iam*. Geny *fla* (*flaA* i *flaB*) odpowiadają za ruchliwość bakterii, kodują białka rzęski – flagelinę, umożliwiającą ruch komórek *Campylobacter* spp. Gen *cadF* koduje białko wiążące fibronektynę enterocytów uczestniczące w adherencji. Wielu badaczy uważa, że gen ten, niezbędny do wywołania objawów kamylobakteriozy, jest genem konserwatywnym u *C. jejuni* i *C. coli*. Gen *vir* z kolei znajduje się w plazmidzie *Campylobacter* spp. (plazmid nie zawsze jest obecny) i również koduje białka odpowiedzialne za patogenność. Sekwencja *iam* jest odpowiedzialna za przyczepność i inwazyjność, występuje częściej u *C. coli* niż u *C. jejuni*.

CEL BADAŃ. Celem prowadzonych badań było: określenie częstości występowania pałeczek z rodzaju *Campylobacter* u badanych psów; określenie gatunków w obrębie rodzaju *Campylobacter*; identyfikacja wybranych genów zjadliwości u wyizolowanych szczepów oraz genów warunkujących występowanie toksyny CDT, a także określenie oporności na wybrane antybiotyki w obrębie wyizolowanych pałeczek z rodzaju *Campylobacter*.

MATERIAŁ I METODY. Materiał do badań stanowiły próbki wymazów pobranych *per rectum* (wymazówki z podłożem transportowym) od 100 zdrowych psów w wieku do 5 lat z hodowli położonych na terenie Polski. Próbki transportowano do laboratorium w terminie do 6 godzin od pobrania w temperaturze 4°C. **Izolacja *Campylobacter* spp. z wymazów** - podłoże selektywne Karmali (Oxoid) i test potwierdzający API Campy. **Identyfikacja bakterii oraz genów wirulencji i genów odpowiedzialnych za powstawanie toksyny CDT** – reakcja PCR. **Ocena wrażliwości na antybiotyki** - Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing i National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).



| Izolaty / Isolates | Startery / Primers | Sekwencja 5' → 3' / Sequence 5' → 3' | Wielkość produktu (pz) / Product size (bp) |
|--------------------|--------------------|--------------------------------------|--|
| <i>C. coli</i> | CCF | GTAAACCAAGCTTATCGTG | 126 |
| | CCR | TCCAGCAATGTGTGCAATG | |
| <i>C. jejuni</i> | CJF | ACTTCTTTATTGCTTGCTGC | 323 |
| | CJR | GCCACAACAAGTAAAGAAGC | |

| Startery | Sekwencja 5' → 3' | Wielkość produktu (pz) |
|----------------|---------------------------|------------------------|
| <i>cadF</i> -F | TGGAGGTAATTAGATTTG | 400 |
| <i>cadF</i> -R | CTAATACCTAAAGTTGAAC | |
| <i>flaA</i> -F | GGATTCGTATTAACAACAATGGTGC | 1728 |
| <i>flaA</i> -R | CTGTAGTAATTTAAACATTTTG | |
| <i>iam</i> -F | GCGCAAAATATTATCACCC | 518 |
| <i>iam</i> -R | TTCACGACTACTATCGGG | |

| Startery | Sekwencja 5' → 3' | Wielkość produktu (pz) |
|----------------|-------------------------------|------------------------|
| <i>cdtA</i> -F | CTA TTA CTC CTA TTA CCC CAC C | 422 |
| <i>cdtA</i> -R | AAT TTG AAC CGC TGT ATT GCT C | |
| <i>cdtB</i> -F | AGG AAC TTT ACC AAG AAC AGC C | 531 |
| <i>cdtB</i> -R | GGT GGA GTA TAG GTT TGT TGT C | |
| <i>cdtC</i> -F | ACT CCT ACT GGA GAT TTG AAA G | 339 |
| <i>cdtC</i> -R | CAC AGC TGA AGT TGT TGT TGG C | |

Podsumowanie i omówienie wyników. Techniki molekularne zidentyfikowały 16 przypadków *C. jejuni*. W próbkach nie zidentyfikowano *C. coli*. W dalszych badaniach nad występowaniem genów zjadliwości wykorzystano szesnaście izolatów *C. jejuni*. Gen *cadF* stwierdzono w 10 izolatach (62%). Zbadano także obecność genów odpowiedzialnych za występowanie cytotoksycznej toksyny (CDT). Wyniki wykazały, że gen *cdtB* był obecny w 6 izolatach (37%), natomiast genów *cdtA* i *cdtC* nie wykryto. Test oporności na antybiotyki wykazał, że 7 izolatów było wrażliwych na wszystkie antybiotyki użyte w teście. Wszystkie szczepy były wrażliwe na cyprofloksacynę (CIP), gentamycynę (GE) i meropenem (MEM).

| Izolaty – Isolates | Geny – Genes | | | | | |
|-----------------------------|--------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| | <i>cadF</i> | <i>flaA</i> | <i>iam</i> | <i>cdtA</i> | <i>cdtB</i> | <i>cdtC</i> |
| 1 | + | - | - | - | + | - |
| 2 | - | - | - | - | - | - |
| 3 | + | - | - | - | - | - |
| 4 | + | - | - | - | + | - |
| 5 | + | - | - | - | - | - |
| 6 | + | - | - | - | - | - |
| 7 | - | - | - | - | - | - |
| 8 | + | - | - | - | + | - |
| 9 | + | - | - | - | - | - |
| 10 | + | - | - | - | + | - |
| 11 | + | - | - | - | - | - |
| 12 | + | - | - | - | + | - |
| 13 | + | - | - | - | - | - |
| 14 | + | - | - | - | - | - |
| 15 | + | - | - | - | + | - |
| 16 | + | - | - | - | + | - |
| <i>C. jejuni</i> ATCC 33291 | + | - | + | + | + | + |

Objaśnienia: (+) – obecność genu, (-) – brak genu. – Explanation: (+) – gene presence, (-) – no gene.

| Izolaty – Isolates | Antybiotyki – Antibiotics | | | | | |
|--------------------|---------------------------|-----|---|----|-----|----|
| | AMP | CIP | E | GE | MEM | TE |
| 1 | + | - | + | - | - | - |
| 2 | - | - | - | - | - | - |
| 3 | - | - | + | - | - | - |
| 4 | + | - | - | - | - | - |
| 5 | + | - | - | - | - | - |
| 6 | + | - | - | - | - | + |
| 7 | - | - | - | - | - | - |
| 8 | + | - | - | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - | - | - |
| 10 | + | - | + | - | - | - |
| 11 | - | - | - | - | - | - |
| 12 | + | - | + | - | - | - |
| 13 | - | - | - | - | - | - |
| 14 | - | - | - | - | - | - |
| 15 | + | - | + | - | - | - |
| 16 | - | - | - | - | - | - |

Objaśnienia: (+) – oporny, (-) – wrażliwy
AMP – ampicylina, CIP – cyprofloksacyna, E – erytromycyna, GE – gentamycyna, MEM – meropenem, TE – tetracyklina.
Explanation: (+) – resistant, (-) – susceptible.
AMP – ampicillin, CIP – ciprofloxacin, E – erythromycin, GE – gentamicin, MEM – meropenem, TE – tetracycline.

