

Ocena występowania wybranych genów zjadliwości oraz antybiotykooporności *Campylobacter jejuni* pozyskanych od koni

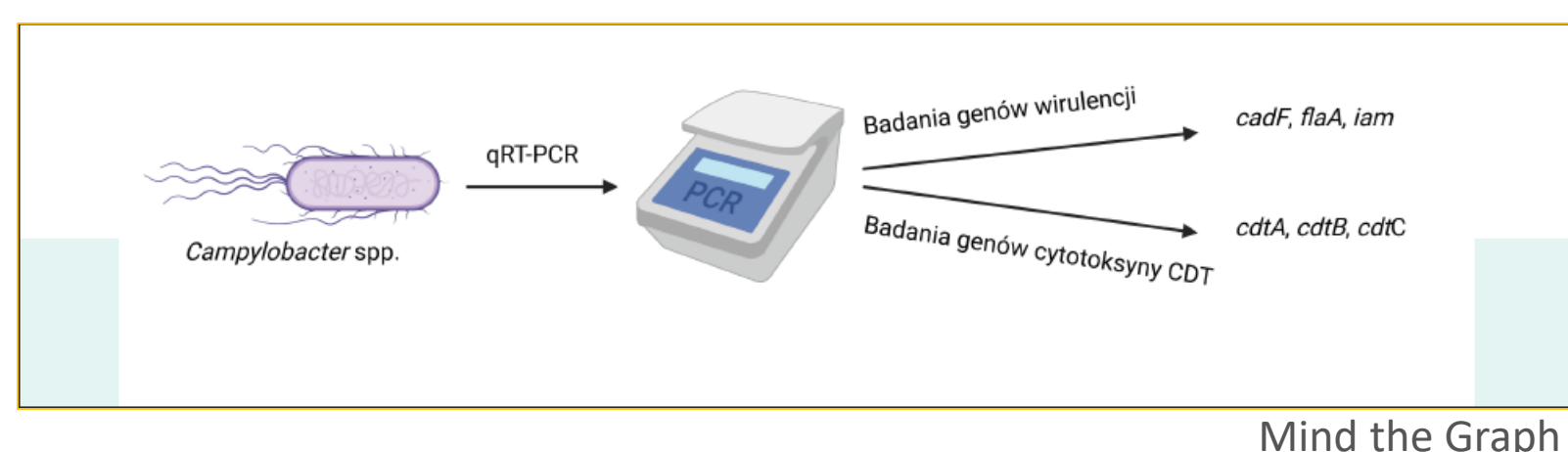
Marek Selwet

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 kampylobakteriozy, 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 koni; 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 klaczy w wieku do 5 lat ze stajni położonych na terenie Wielkopolski. Próbki pobierano w trzech kolejnych dniach, transportowano do laboratorium w terminie do 6 godzin w temperaturze 4°C. **Izolacja *Campylobacter* spp. z próbek kału** - 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	GTAAAACCAAAGCTTATCGTG	126
	CCR	TCCAGCAATGTGTGCAATG	
<i>C. jejuni</i>	CJF	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	323
	CJR	GCCACAACAAGTAAAGAAGC	

Startery	Sekwencja 5' → 3'	Wielkość produktu (pz)
<i>cadF</i> -F	TGGAGGGTAATTAGATATTG	400
<i>cadF</i> -R	CTAATACCTAAAGTTGAAAC	
<i>flaA</i> -F	GGATTTCGTATTAACACAAATGGTGC	1728
<i>flaA</i> -R	CTGTAGTAATCTTAAACAATTTTG	
<i>iam</i> -F	GCGCAAAATATTATCACCC	518
<i>iam</i> -R	TTCACGACTACTATGCGG	

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* (44%). W próbkach nie zidentyfikowano *C. coli*. W dalszych badaniach nad występowaniem genów zjadliwości wykorzystano szesnaście izolatów *C. jejuni*. Gen *cadF* stwierdzono w 10 izolatach (62,5%). Zbadano także obecność genów odpowiedzialnych za występowanie cytoletalnej toksyny (CDT). Wyniki wykazały, że gen *cdtB* był obecny w 6 izolatach (37,5%), 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 ciprofloksacynę (CIP), gentamycynę (GE) i meropenem (MEM).

Izoty – 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	+	+	+	+	+	+

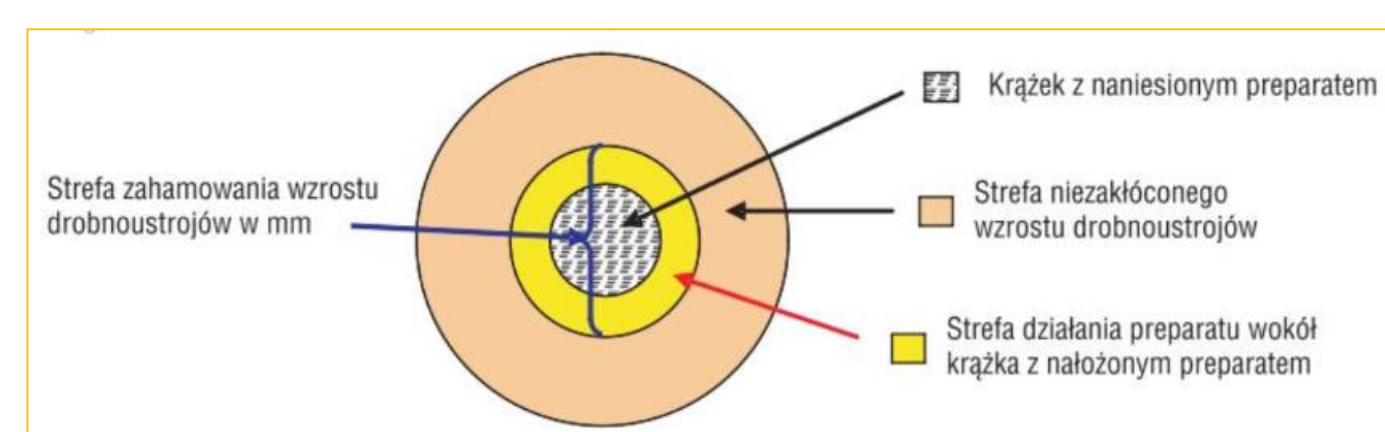
Objaśnienia: (+) – obecność genu, (-) – brak genu. – Explanation: (+) – gene presence, (-) – no gene.

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



<https://timproductos.com/microbiologia/>



https://issuu.com/39879/docs/2010_3_spk_wvew/32