

Różnicowanie szczepów *Campylobacter jejuni* metodą analizy polimorfizmu przypadkowo amplifikowanego DNA

KINGA WIECZOREK, JACEK OSEK

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Wieczorek K., Osek J.

Differentiation of *Campylobacter jejuni* isolates by random amplified polymorphic DNA method

Summary

Campylobacter, especially *C. jejuni*, is now recognized as a major cause of bacterial enteritis in people in most developed countries. The diversity within *C. jejuni* species may be described by both phenotypic and genotypic methods. In recent years, molecular methods, such as the restriction of fragment length polymorphism (RFLP), fla typing or random amplified polymorphic DNA (RAPD), have been proposed as alternative tests to phenotypic methods for typing of *Campylobacter*. This study was carried out to investigate the genetic variation among isolates *C. jejuni* by RAPD-PCR. The analysis of 19 isolates of *C. jejuni* performed with two primers (1254 and OPA-11) generated multiple amplification products, with sizes between 300 and 2000 bp. The UPGMA analysis of the fingerprints classified these strains to 10 clonal groups. The discriminatory index $D=0.73$ indicates a high differentiation ability of the method. Such data are valuable in epidemiological studies and for investigating the distribution of genotypes in different environments.

Keywords: *Campylobacter jejuni*, RAPD-PCR

Bakterie *Campylobacter*, a zwłaszcza należące do gatunku *C. jejuni*, są jednym z ważniejszych czynników etiologicznych zakażeń pokarmowych ludzi. Szerokie występowanie tych drobnoustrojów w środowisku naturalnym jest przyczyną wtórnego skażenia produktów żywnościowych, a zwłaszcza surowego mięsa drobiowego lub surowego mleka. Z tych też względów, w badaniach epidemiologicznych istotne znaczenie posiada wykrycie źródła i drogi szerzenia się zakażenia. Do tego celu wykorzystywane są metody fenotypowe np. serotypowanie, określenie cech biochemicznych czy struktury antygenowej *C. jejuni*. Testy te nie pozwalają jednak na stwierdzenie zróżnicowania genetycznego izolatów. Dlatego w ostatnich latach wprowadzono szereg technik molekularnych umożliwiających genotypowanie szczepów *Campylobacter*. Obejmują one m.in. analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), również w połączeniu z elektroforezą pulsacyjną (PFGE), typowanie RFLP w oparciu o produkt amplifikacji metodą PCR genu flaA, a także analizę polimorfizmu przypadkowo amplifikowanego DNA (RAPD-PCR) (3, 9). Ostatnia spośród wymienionych metod polega na użyciu krótkich starterów (ok. 10-nukleotydowych) o dowolnej sekwencji, które są komplementarne do losowych fragmentów chromosomalnego DNA badanych bakterii (7, 8). W wyniku reakcji PCR powstaje swoisty dla każdego drobnoustroju układ amplikonów o różnych masach molekularnych. Technika ta charakteryzuje się dużą zdolnością genotypowego różnicowania drobnoustrojów, powtarzalnością wyników, jak też jest stosunkowo łatwa w wykonaniu (5).

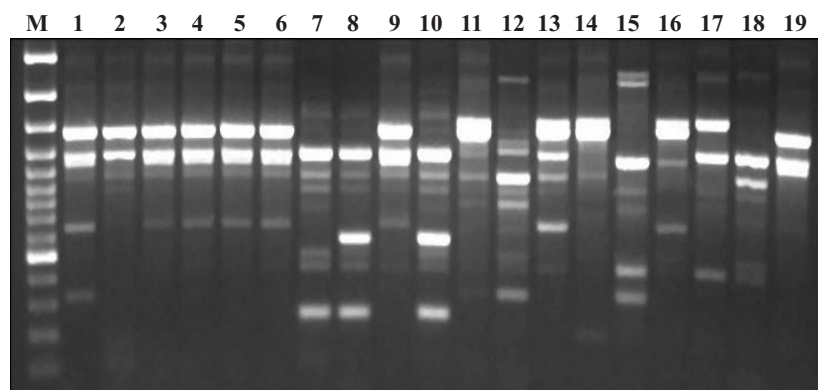
Celem obecnych badań było zastosowanie metody RAPD-PCR do różnicowania szczepów *C. jejuni* wyizolowanych z tuszek drobiowych i odchodów kurzych.

Materiał i metody

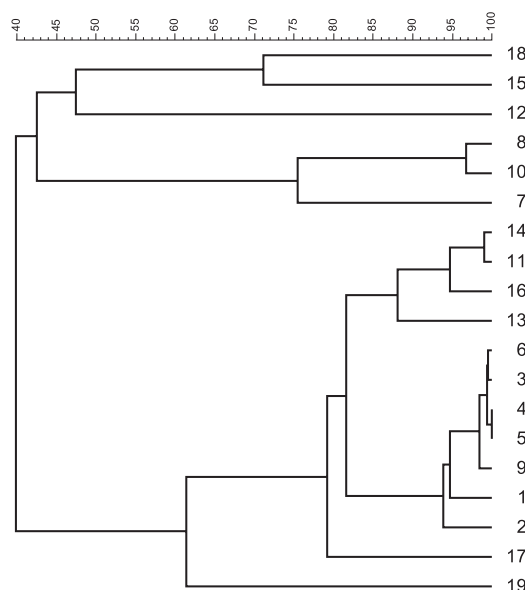
Szczepy bakteryjne. W badaniach wykorzystano 10 izolatów *C. jejuni* pochodzących z wymazów z tuszek drobiowych oraz 9 wyosobnionych z odchodów kurzych. Izolaty te zostały zaklasyfikowane do rodzaju *Campylobacter* przy użyciu metody mikrobiologicznej opisanej w normie PN-ISO 10272, a następnie określono ich przynależność gatunkową stosując test multiplex PCR (2).

Matrycowy DNA. Bakteryjne DNA otrzymano z pojedynczych kolonii *Campylobacter* spp. inkubowanych na pożywce Karmali (Oxoid) przez 24 h w 42°C w warunkach mikroaerofilnych. Bakterie zawieszano 1 ml wody redestylowanej i odwirowywano 13 000 g, 1 min. Do uzyskanego osadu dodano 100 µl 10 mM buforu Tris, a następnie izolowano DNA za pomocą zestawu Genomic – Mini (A&A Biotechnology Gdańsk), zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Czystość i koncentrację uzyskanego DNA oznaczano spektrofotometrycznie i w odpowiednim rozcieńczeniu stosowano w testach PCR.

Test PCR. Amplifikacje przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej o końcowej objętości 50 µl, zawierającej: 5 mM MgCl₂, dNTP (200 µM), bufor enzymatyczny, 2 U termostabilnej polimerazy Taq (Fermentas, Litwa), startery OPA-11 (5' CAATC GCCGT 3') (4) i 1254 (5' CCGCAGCCAA 3') (1) oraz matrycowy DNA o koncentracji 10 ng/µl (5 µl). Reakcje wykonano w termocyklerze PTM-100 (MJ Research, USA), używając programu o następujących parametrach: 94°C 5 min. (denaturacja wstępna), a następnie 40 cykli: 94°C 1 min., 37°C 1 min., 72°C 1 min. Końcowy etap wydłużania przeprowadzono



Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji testu RAPD-PCR otrzymanych z DNA szczepów *C. jejuni* oraz uzyskany na jego podstawie dendrogram przedstawiający stopień pokrewieństwa molekularnego badanych izolatów. Numerami 1-10 oznaczono izolaty z tuszek drobiowych, 11-19 szczepy wyodrębnione z odchodów kurzych, M – marker masy molekularnej



w 72°C przez 5 min. Otrzymane produkty amplifikacji identyfikowano w 1,7% żelu agarozowym przy użyciu zestawu Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, USA).

Wyniki i omówienie

Typowanie szczepów bakteryjnych dostarcza szeregu ważnych informacji na temat źródeł zakażenia, dróg szerzenia się oraz wektorów przenoszących drobnoustroje. W obecnej pracy do różnicowania szczepów *C. jejuni* zastosowano, wykorzystując uniwersalne startery, technikę RAPD-PCR. W początkowym etapie badań dokonano wyboru najbardziej odpowiednich sekwencji nukleotydowych. Według danych dostępnych w piśmiennictwie, w przypadku *Campylobacter*, jednymi z najczęściej stosowanych oligonukleotydów w testach RAPD są startery 1254 i OPA-11. Umożliwiają one otrzymanie szeregu produktów amplifikacji o zróżnicowanych masach molekularnych (3, 5). Te startery zostały też wykorzystane w obecnych badaniach. Następnie przeprowadzono reakcje PCR z DNA pochodzącym ze szczepów *C. jejuni*, celem ustalenia optymalnych warunków amplifikacji i koncentracji starterów. Najlepsze rezultaty, w aspekcie liczby i wielkości amplikonów, uzyskano po zastosowaniu obu oligonukleotydów jednocześnie. W kolejnym etapie opracowany test RAPD-PCR wykorzystano do analizy 19 izolatów *C. jejuni*, pochodzących z różnych źródeł. Otrzymano zróżnicowane profile molekularne, na które składało się od 3 do 8 amplikonów o masach od 300 do ponad 2000 pz. U 17 szczepów stwierdzono ten

sam produkt o masie 1200 pz (ryc. 1). Analiza UPGMA wykonana przy użyciu programu komputerowego GelCompar II umożliwiła zaklasyfikowanie badanych izolatów do 10 grup klonalnych o zróżnicowanym pokrewieństwie molekularnym (ryc. 1). Przydatność testu do genotypowania szczepów *C. jejuni* określono na podstawie indeksu różnicowania D, który wyniósł 0,73 (6). Wartość ta jest stosunkowo wysoka i porównywalna z wynikami uzyskanymi przez innych autorów (5). Należy również podkreślić, że 10 spośród wybranych do testu izolatów pochodziło z jednej partii tuszek drobiowych. Wyniki powyższych badań są zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy również bardzo dobrze oceniają zdolność różnicowania techniki RAPD-PCR (3, 4) w odniesieniu do szczepów *Campylobacter*. Niektórzy z nich zwracają jednak uwagę na ograniczenia tej metody spowodowane m.in. zbyt dowolnym wyborem starterów oraz występującą w niektórych przypadkach niską powtarzalnością uzyskanych profili. W piśmiennictwie podkreśla się również możliwość wystąpienia wśród niektórych szczepów DNaz, które uniemożliwiają typowanie w oparciu o tę metodę (9), jednak powyższy problem nie wystąpił podczas badania obecnych izolatów.

Otrzymane wyniki pozwalają wstępnie stwierdzić, że zastosowana metoda RAPD-PCR umożliwia różnicowanie molekularne izolatów *C. jejuni* i zaklasyfikowanie ich do różnych grup klonalnych. Dlatego też może być brana pod uwagę w badaniach epidemiologicznych.

Piśmiennictwo

1. Akopyanz N., Bukanov N. O., Westblom T. U., Kresovich S., Berg D. E.: DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 5137-5142.
2. Denis M., Soumet C., Rivoal K., Ermet G., Blivet D., Salvat G., Colin P.: Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1999, 29, 406-410.
3. Ertas H. B., Cetinkaya B., Muz A., Ongor H.: Genotyping of broiler-originated *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates using fla typing and random amplified polymorphic DNA methods. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 94, 203-209.
4. Hernandez J., Fayos A., Ferrus M. A., Owen R. J.: Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from human faeces, seawater and poultry products. *Res. Microbiol.* 1995, 146, 685-696.
5. Hilton A. C., Mortiboy D., Banks J. G., Penn C. W.: RAPD analysis of environmental, food and clinical isolates of *Campylobacter* spp. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1997, 18, 119-124.
6. Hunter P. R., Gaston M. A.: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 1988, 26, 2465-2466.
7. Madden R. H., Moran L., Scates P.: Frequency of occurrence of *Campylobacter* spp. in red meats and poultry in Northern Ireland and their subsequent subtyping using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism and the random amplified polymorphic DNA method. *J. Appl. Microbiol.* 1998, 84, 703-708.
8. Misawa N., Shinohara S., Satoh H., Itoh H., Shinohara K., Shimomura K., Kondo F., Itoh K.: Isolation of *Campylobacter* species from zoo animals and polymerase chain reaction-based random amplified polymorphism DNA analysis. *Vet. Microbiol.* 2000, 71, 59-68.
9. Wassenaar T. M., Newell D. G.: Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 1-9.

Adres autora: mgr Kinga Wieczorek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: kinga.wieczorek@piwet.pulawy.pl