

Gastroenterit Orijinli *Campylobacter jejuni* İzolatlarında On İki Virülans Geninin Araştırılması §

Tuba KAYMAN*, Seçil ABAY**, Elif KAYA***, Bülent BOZDOĞAN****, Fuat AYDIN**

Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji*, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**, Adnan Menderes Üniversitesi BİLTEM***, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı****

ÖZET

Amaç: *Campylobacter jejuni*, akut bakteriyel gastroenteritlerin en önemli etkenlerinden biridir. Bu çalışmada *campylobacter* enfeksiyonlarının patogenezinde önemli role sahip olan virülans ve toksin genlerinin prevalansının araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda, Mart 2010-Mart 2011 tarihleri arasında akut gastroenteritli hastalardan izole edilen ve moleküler yöntemle tanımlanan 126 *C. jejuni* izolatu kullanıldı. İzolatlardaki *flaA*, *flaB*, *cdtABC*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *virB11*, *cj0588*, *cadFR1B*, *ciaB*, *pldA* ve *dnaJ* genlerinin prevalansı, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle analiz edildi.

Bulgular: Test edilen 126 *C. jejuni* izolatının; 122'si (%96.8) *flaB*, 120'si (%95.2) *cadFR1B*, 116'sı (%92.1) *dnaJ*, 111'i (%88.1) *flaA*, 110'u (%87.3) *cdtA*, 103'ü (%81.7) *cdtC*, 87'si (%69.0) *pldA*, 72'si (%57.1) *cdtABC*, 72'si (%57.1) *ciaB*, 65'i (%51.6) *cj0588*, 56'sı (%44.4) *cdtB* ve 23'ü de (%18.2) *virB11* genleri yönünden pozitif bulundu. İzolatlardan yalnızca birinin, araştırılan 12 virülans genine de sahip olduğu saptandı.

Sonuç: Çalışmamızda analiz edilen toksin ve virülans genlerinin prevalans oranları literatürde bildirilen sonuçlar ile genel olarak uyumlu olmasına rağmen, *cdtB* gen prevalansının düşük olduğu gözlemlendi. Yurdumuzda konuyla ilgili tek bir araştırma yürütülmüş olup, bu çalışmada elde edilen sonuçların, *campylobacter* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve patogenezinine yönelik çalışmalara katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Campylobacter jejuni*, virülans geni, toksin geni

SUMMARY

Investigation of the 12 Virulence Genes in *Campylobacter jejuni* Isolates Recovered from Gastroenteritis Cases

Objective: *Campylobacter jejuni* is one of the most important agents of acute bacterial gastroenteritis. In this study, the prevalence of virulence and toxin genes that played an important role in the pathogenesis of *campylobacter* infections were investigated.

Materials and Methods: For this purpose, the prevalence of *flaA*, *flaB*, *cdtABC*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *virB11*, *cj0588*, *cadFR1B*, *ciaB*, *pldA* and *dnaJ* genes of 126 *C. jejuni* strains isolated from acute gastroenteritis cases, and analyzed using a molecular method in Kayseri Training and Research Hospital, Kayseri, Turkey, between March 2010 - March 2011, were analyzed in the study. The related genes were identified by polymerase chain reaction (PCR).

Results: Among 126 *C. jejuni* isolates tested were positive for *flaB* (n=122; 96.8%), *cadFR1B* (n=120; 95.2%), *dnaJ* (n=116; 92.1%), *flaA* (n=111; 88.1%), *cdtA* (n=110; 87.3%), *cdtC* (n=103; 81.7%), *pldA* (n=87; 69.0%), *ciaB* (n=72; 57.1%), *cdtABC* (n=72; 57.1%), *cj0588* (n=65; 51.6%), *cdtB* 56 (44.4%), *virB11* (n=23; 18.2%) genes. It was also found that only one isolate had all of the investigated 12 virulence genes.

Conclusion: Although, the prevalence rates of toxin and virulence genes analyzed in *C. jejuni* in this study are generally compatible with the results previously reported in the literature, it was seen that identification rate of the *cdtB* gene was low. In our country only one relevant study has been conducted so far, we think that the results obtained from this study will contribute to the studies related to the epidemiology, and pathogenesis of *campylobacter* infections.

Key words: *Campylobacter jejuni*, virulence gene, toxin gene

Alındığı tarih: 09.04.2013

Kabul tarihi: 09.12.2013

Yazışma adresi: Tuba Kayman, Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Kayseri

e-posta: tubakayman@hotmail.com

§ Bu çalışma "XXXV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi"nde bildiri olarak sunulmuştur. (3-7 Kasım 2012 Kuşadası, Aydın)

GİRİŞ

Campylobacter jejuni, *Campylobacter* cinsinde yer alan en önemli tür olup, başta endüstrileşmiş ülkeler olmak üzere tüm dünyada gastroenteritlerin başta gelen etkenleri arasında yer almaktadır⁽¹⁻⁴⁾. Hastalıkları gıda orijinli bir enfeksiyon olup, özellikle kesim aşamasında kontamine olan tavuk etleri, etkenin insanlara bulaşmasında oldukça önemli bir role sahiptir^(3,5,6). Hastalığın patogenezi ile ilgili yapılan çalışmalarda hareket, bağırsak epitel hücrelerine yapışma, konak hücrelerine invazyon ve sitotoksin üretiminin önemli virülans faktörleri olduğu ortaya konmuştur. Bununla ilgili olarak da çeşitli genler tanımlanmıştır^(3,7,8). *flaA*, *cadF*, *dnaJ*, *racR*, *cj0588* genlerinin adrens ve kolonizasyon, *virB11*, *ciaB*, *pldA* genlerinin invazyon ve *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* genlerinin ise sitotoksin üretiminden sorumlu olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca *C. jejuni*'de bulunan *wlaN* geni de Guillain-Barre sendromu ile ilişkilendirilmektedir⁽⁸⁾.

Bu çalışmada, gastroenterit orijinli *C. jejuni* izolatlarında *flaA*, *flaB*, *cdtABC*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *virB11*, *cj0588*, *cadFR1B*, *ciaB*, *pldA* ve *dnaJ* virülans genlerinin prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

***Campylobacter jejuni* izolatları:** Bu çalışmada, daha önce akut gastroenterit olgularından izole ettiğimiz ve fenotipik ve moleküler testlerle tanımladığımız 126 adet *C. jejuni* izolatı kullanıldı^(9,10). Bu izolatlar, Mart 2010-Mart 2011 tarihleri arasında, "Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı"na gönderilen, akut gastroenterit ön tanısı konulmuş hastalara ait dışkı örneklerinden izole edilmişti⁽⁹⁾.

Virülans genleri ve primerler: Çalışmada *flaA*, *flaB*, *cdtABC*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *virB11*, *cj0588*, *cadFR1B*, *ciaB*, *pldA* ve *dnaJ* genlerine ait primerler kullanıldı (Invitrogen, Germany). Bu primerler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Hedef DNA'nın hazırlanması: PCR'da kullanılacak hedef DNA kaynatma metodu ile elde edildi⁽¹⁰⁾. Bu amaçla; her bir *C. jejuni* izolatı 500 µL deiyonize/distile su içerisinde süspansiyon edildi ve 100°C'da 10 dakika kaynatıldı. Süspansiyon 10000g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant alınarak kullanılıncaya dek -20°C'da saklandı.

PCR koşulları: *flaA*, *flaB*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *cdtABC*, *virB11* ve *cj0588* genleri için, 95°C'da 2 dakika ön denatürasyondan sonra 35 siklus, 95°C'da 30 sn., 50°C'da 30 sn., 72°C'de 2 dakika,

Tablo 1. Çalışmada kullanılan virülans ve toksin genlerinin primerleri.

Gen	Sekans (5'→3')	bp	Kaynak
<i>flaA</i>	ATG GGA TTT CGT ATT AAC AC CTG TAG TAA ATC TTA AAA CAT TTT G	1700	6
<i>flaB</i>	ATA AAC ACC AAC ATC GGT GCA GTT ACG TTG ACT CAT AGC ATA	1670	11
<i>cdtA</i>	GGAAATTGGATTTGGGGCTATACT ATCACAAGGATAATGGACAAT	165	12
<i>cdtB</i>	GTAAAAATCCCTGCTATCAACCA; GTTGGCACTTGGAAATTTGCAAGGC	495	12
<i>cdtC</i>	TGGATGATAGCAGGGGATTTAAAC; TTGCACATAACCAAAAAGGAAG	555	12
<i>cdtABC</i>	GGAAATTGGATTTGGGGCTATACT TTGCACATAACCAAAAAGGAAG	1460	12
<i>virB11</i>	TCTGTGAGTTGCCTTACCCTTTT CCTGCGTGTCTGTGTTATTTACCC	494	8
<i>cj0588</i>	ATG AGA TTT GAT TTT TTT GTT TCA ATT TTT GAT ATA GTA GTA AA	770	6
<i>cadFR1B</i>	TTGAAGGTAATTTAGATATG CTAATACCTAAAGTTGAAAC	400	7
<i>ciaB</i>	TGCGAGATTTTTCGAGAATG TGCCCGCCTTAGAACTTACA	527	7
<i>pldA</i>	AAGAGTGAGGCGAAATTCCA GCAAGATGGCAGGATTATCA	385	7
<i>dnaJ</i>	ATTGATTTTGTGCGGGTAG ATCCGCAAAAAGCTTCAAAAA	177	7

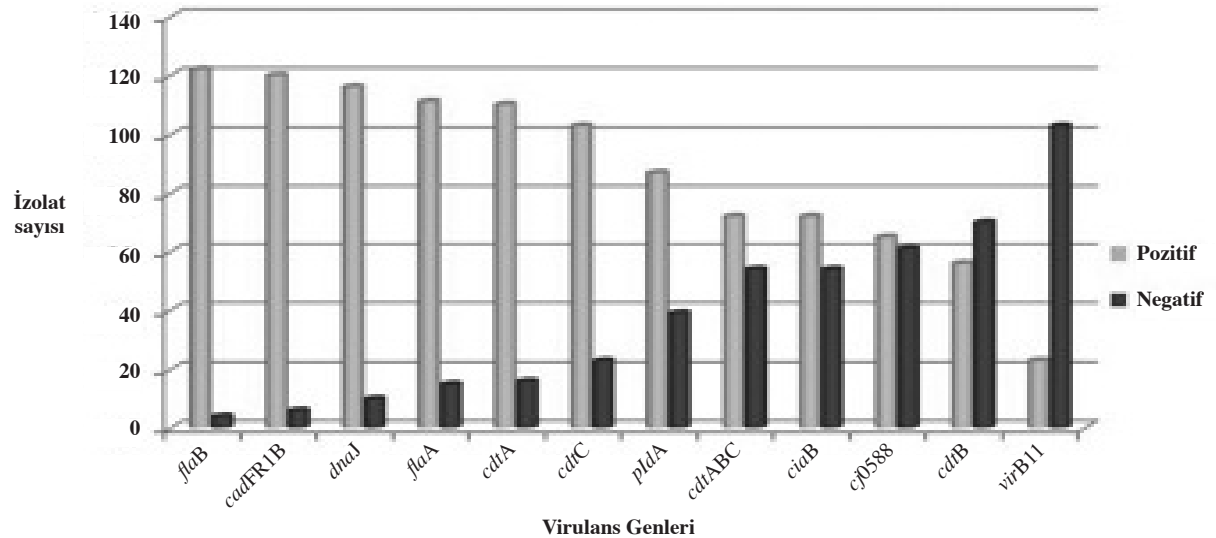
Tablo 2. Çalışmada araştırılan virülans genleri taşıyan izolat sayısı.

Virülans geni	Pozitif izolat sayısı (%)	Negatif izolat sayısı (%)
<i>flaB</i>	122 (%96.8)	4 (%3.2)
<i>cadFR1B</i>	120 (%95.2)	6 (%4.8)
<i>dnaJ</i>	116 (%92.1)	10 (%7.9)
<i>flaA</i>	111 (%88.1)	15 (%11.9)
<i>cdtA</i>	110 (%87.3)	16 (%12.7)
<i>cdtC</i>	103 (%81.7)	23 (%18.3)
<i>pldA</i>	87 (%69)	39 (%31.0)
<i>cdtABC</i>	72 (%57.1)	54 (%42.9)
<i>ciaB</i>	72 (%57.1)	54 (%42.9)
<i>cj0588</i>	65 (%51.6)	61 (%48.4)
<i>cdtB</i>	56 (%44.4)	70 (%55.6)
<i>virB11</i>	23 (%18.2)	103 (%81.8)

olacak şekilde ayarlanmıştır⁽¹¹⁻¹³⁾. *cadF*, *ciaB*, *pldA* ve *dnaJ* genleri için ise, 94°C’da 1 dakika, annealing aşamasında 45 sn. (annealing ısıları *cadF* ve *dnaJ* için 42°C, *ciaB* ve *pldA* için 58°C) ve 72°C’da 45 sn. olmak üzere toplam 30 siklustan oluşturulmuştur⁽⁷⁾. Amplifiye edilen ürünler %2’lik agaroz jelde yürütülmüş ve etidium bromid ile boyandıktan sonra jel dökümantasyon sisteminde (Vilber Lourmat, France) görüntülenmiştir.

BULGULAR

Araştırılan genlere sahip izolatların sayısı ve oranları Tablo 2 ve Grafik 1’de görülmektedir.



Grafik 1. *Campylobacter jejuni* izolatlarında araştırılan virülans genleri.

Test edilen izolatlardan yalnızca birinin, araştırılan 12 virülans genine de sahip olduğu saptanmıştır.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, gastroenterit orijinli 126 izolatında *flaA*, *flaB*, *cdtABC*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *virB11*, *cj0588*, *cadFR1B*, *ciaB*, *pldA* ve *dnaJ* virülans ve toksin genlerinin varlığı moleküler yöntemle araştırılmıştır. *Campylobacter* türlerinde toksin genlerine ait yapılan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Datta ve ark.⁽⁸⁾ klinik orijinli toplam 56 *C. jejuni* izolatında 11 patojenik geni araştırmış ve bunların oranını %25-%100 arasında bulmuştur. Talukder ve ark.⁽¹⁴⁾ gastroenterit orijinli 40 *C. jejuni* izolatında; *flaA*, *cadFR1B*, *racR*, *dnaJ*, *pldA*, *ciaB*, *virB11*, *ceuE*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* ve *wlaN* olmak üzere toplam 11 virülans geninin prevalansını sırasıyla, %100, %100, %100, %100, %100, %95, %0, %82,5, %97,5, %97,5, %97,5 ve %7,5 olarak belirlemiştir. Martinez ve ark.⁽¹⁵⁾ 76 *C. jejuni* izolatının, *cdtA*, *cdtB* ve *cdtC* toksin genlerinin prevalansını multipleks PCR yöntemiyle %98 olarak saptamışlardır. Yine Quetz ve ark.⁽¹⁶⁾ gastroenterit orijinli 60 *C. jejuni* izolatında virülans genlerinin prevalans oranlarının sırasıyla, *ciaB* %95, *dnaJ* %86,7,

racR %98.3, *flaA* %80, *pldA* %45, *cdtABC* %95 ve *pVir* %0 olduğunu bildirmiştir. Hamidian ve ark.⁽¹⁷⁾ İran'da yürüttükleri çalışmada, 28 *C. jejuni* izolatında *cdtA*'yı %85.7, *cdtB*'yi %71.4, *cdtC*'yi %67.9, *cadF*'yi %89.3, *racR*'yi %53.6, *dnaJ*'yi %60.7 ve *pldA*'yı %64.3 oranında pozitif bulmuşlar ve elde ettikleri oranların diğer çalışmalara göre daha düşük olmasını, izolatlarının farklı bir genomik havuza ait olabileceği şeklinde açıklamışlardır. Krutkiewicz ve ark.⁽⁶⁾ Polonya'da yaptıkları çalışmada 12 *C. jejuni* izolatının tümünde *flaA*, *flaB*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *cdtABC*, *virB11* ve *cj0588* gen varlığını %100 olarak belirlemiştir. Biswas ve ark.⁽¹⁸⁾ klinik orijinli 50 *C. jejuni* izolatında *flaC*, *cadF*, *docC*, *racR*, *jlpA*, *peb1*, *dnaJ*, *ciaB*, *pldA*'yı içeren 14 genin prevalansını %67 olarak belirlemiştir. Fearnley ve ark.⁽¹⁹⁾ test ettikleri 24 *C. jejuni* izolatının tümünü *cadF* geni yönünden pozitif bulmuştur. Nielsen ve ark.⁽²⁰⁾ kan ve dışkı kökenli *C. jejuni* izolatlarında *capA*, *iam*, *cdtB* ve *virB* virülans faktörlerini araştırmış ve her iki köken açısından virülans faktörlerinde bir farklılığın olmadığını rapor etmiştir.

Konu ile ilgili olarak, bilgilerimize göre yurdu-muzda Fındık ve ark.⁽²¹⁾ tarafından yürütülmüş, yalnızca bir çalışma mevcuttur. Araştırmacılar, değişik orijinli *C. jejuni* izolatlarında *cdtA*, *cdtB* ve *cdtC* toksin genlerini multipleks PCR yöntemiyle araştırmış, insan orijinli 30 *C. jejuni* izolatının, *cdtA*, *cdtB* ve *cdtC* genlerinin varlığını sırasıyla, %86.6, %96 ve %90 olarak bildirmiştir.

Bu çalışmada, *C. jejuni* izolatlarında analiz edilen virülans genlerinden en sık olarak *flaB*, *cadFR1B* ve *dnaJ*, en az oranda ise *virB11* pozitif olarak bulunmuştur. Çalışmamızda analiz edilen toksin ve virülans genlerinin prevalans oranları yukarıda adı geçen çalışmaların sonuçları ile genel olarak uyumlu olmasına rağmen, *cdtB* gen prevalansının düşük olduğu gözlenmektedir. Bu durum, kullanılan primerlerin/

yöntemin farklılığına ve analiz edilen *C. jejuni* izolatlarının farklı genetik profiline bağlı olabilir.

Elde ettiğimiz sonuçların, *C. jejuni* ile gelişen enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve patogene-zine yönelik çalışmalara katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Campylobacter*, general information. How common is *Campylobacter*? <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/campylobacter/> Erişim tarihi 16.03.2013.
- Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:237-43. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0803.010233>
- Debruyne L, Gevers D, Vandamme P. Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In: Nachamkin I, Szymansky CM, Blaser MJ eds. *Campylobacter*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2008:3-26.
- Feodoroff B, Ellström P, Hyytiäinen H, Sarna S, Hänninen ML, Rautelin H. *Campylobacter jejuni* isolates in Finnish patients differ according to the origin of infection. *Gut Pathog* 2010; 20(2):22.
- Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:868-76. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00983.x>
- Krutkiewicz A, Klimuszko D. Genotyping and PCR detection of potential virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from different sources in Poland. *Folia Microbiol (Praha)* 2010; 55:167-75. <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-010-0025-6>
- Chansiripornchai N, Sasipreeyajan J. PCR detection of four virulence-associated genes of *Campylobacter jejuni* isolates from Thai broilers and their abilities of adhesion to and invasion of INT-407 cells. *J Vet Med Sci* 2009; 71:839-44. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.71.839>
- Datta S, Niwa H, Itoh K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J Med Microbiol* 2003; 52:345-8. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.05056-0>
- Kayman T, Abay S, Hızlısoy H. *Campylobacter* türlerinin fenotipik yöntemler ve multipleks polimeraz zincir reaksiyonu ile tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47:230-9. <http://dx.doi.org/10.5578/mb.4532>
- Wang G, Clark CG, Taylor TM, et al. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4744-7. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.12.4744-4747.2002>

11. Müller J, Schulze F, Müller W, Hänel I. PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. *Vet Microbiol* 2006; 113:123-9.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.029>
12. Ripabelli G, Tamburro M, Minelli F, Leone A, Sammarco ML. Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010; 33:355-64.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2008.12.001>
13. Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, et al. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun* 2000; 68:4384-90.
<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.68.8.4384-4390.2000>
14. Talukder KA, Aslam M, Islam Z, et al. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1485-8.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01912-07>
15. Martínez I, Mateo E, Churrua E, Gírbau C, Alonso R, Fernández-Astorga A. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Int J Med Microbiol* 2006; 296:45-8.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.08.003>
16. Quetz Jda S, Lima IF, Havt A, et al. *Campylobacter jejuni* infection and virulence-associated genes in children with moderate to severe diarrhoea admitted to emergency rooms in northeastern Brazil. *J Med Microbiol* 2012; 61:507-13.
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.040600-0>
17. Hamidian M, Sanaei M, Bolfion M, Dabiri H, Zali MR, Walther-Rasmussen J. Prevalence of putative virulence markers in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from hospitalized children, raw chicken, and raw beef in Tehran, Iran. *Can J Microbiol* 2011; 57:143-8.
<http://dx.doi.org/10.1139/W10-089>
18. Biswas D, Hannon SJ, Townsend HG, Potter A, Allan BJ. Genes coding for virulence determinants of *Campylobacter jejuni* in human clinical and cattle isolates from Alberta, Canada, and their potential role in colonization of poultry. *Int Microbiol* 2011; 14:25-32.
19. Fearnley C, Manning G, Bagnall M, Javed MA, Wassenaar TM, Newell DG. Identification of hyperinvasive *Campylobacter jejuni* strains isolated from poultry and human clinical sources. *J Med Microbiol* 2008; 57:570-80.
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47803-0>
20. Nielsen H, Persson S, Olsen KE, Ejlertsen T, Kristensen B, Schönheyder HC. Bacteraemia with *Campylobacter jejuni*: no association with the virulence genes *iam*, *cdtB*, *capA* or *virB*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29:357-8.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10096-009-0863-9>
21. Findik A, Ica T, Onuk EE, Perçin D, Kevenk TO, Çiftçi A. Molecular typing and *cdt* genes prevalence of *Campylobacter jejuni* isolates from various sources. *Trop Anim Health Prod* 2011; 43:711-9.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11250-010-9758-0>