

KINGA WIECZOREK, JACEK OSEK

## PRZYDATNOŚĆ WYBRANYCH TECHNIK PCR W RÓŻNICOWANIU TERMOTOLERANCYJNYCH SZCZEPÓW *CAMPYLOBACTER*

### Streszczenie

*Campylobacter* spp. należy do najczęstszych bakteryjnych czynników etiologicznych infekcji pokarmowych u ludzi. Główną przyczyną zakażeń człowieka tymi drobnoustrojami jest spożywanie niedogotowanego mięsa drobiowego, skażonej wody oraz niepasteryzowanych produktów mlecznych. W badaniach epidemiologicznych wykorzystywane są molekularne metody różnicujące, które umożliwiają analizę pokrewieństwa genotypowego między izolatami należącymi do rodzaju *Campylobacter*, wyosobnionymi z tego samego lub z różnych źródeł. Jedną z nich - ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – Polymerase Chain Reaction) polega na zastosowaniu w reakcji amplifikacji starterów o długich sekwencjach nukleotydowych, komplementarnych do konserwatywnych fragmentów obecnych w genomie drobnoustrojów rodziny Enterobacteriaceae, jednak różnie w nim rozmieszczonych w zależności od gatunku lub szczepu bakteryjnego. ERIC-PCR umożliwia szybkie różnicowanie izolatów i stanowi przydatne narzędzie służące do analizy genomu prokariotycznego. W ostatnich latach do molekularnego typowania *Campylobacter*, zwłaszcza *C. jejuni* i *C. coli*, stosowana jest analiza długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) amplifikowanego techniką PCR genu *flaA*. Metoda ta często jest również wykorzystywana w badaniach epidemiologicznych.

Celem badań było określenie przydatności technik PCR-RFLP i ERIC-PCR do molekularnego różnicowania szczepów *Campylobacter* izolowanych z tuszek drobiowych. W wyniku analizy PCR-RFLP otrzymano 5 profili restrykcyjnych, składających się z szeregu fragmentów DNA o różnych masach molekularnych. Natomiast test ERIC-PCR pozwolił na otrzymanie 6 profili molekularnych. Uzyskane rezultaty wskazują na stosunkowo dużą zdolność różnicowania obu zastosowanych w pracy metod oraz ich przydatność do genotypowego różnicowania szczepów *C. jejuni* i *C. coli*.

**Słowa kluczowe:** *Campylobacter*, różnicowanie, *flaA* typowanie, PCR-RFLP, ERIC-PCR

### Wprowadzenie

*Campylobacter* spp. należy do najczęstszych czynników etiologicznych infekcji pokarmowych wywołanych spożyciem skażonej żywności. Z powodu szerokiego występowania tych bakterii w populacji zwierzęcej istnieje duże ryzyko skażenia produktów żywnościowych, takich jak: surowe mięso i mleko, a także

---

Mgr K. Wieczorek, prof. dr hab. J. Osek, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: kinga.wieczorek@piwet.pulawy.pl

niepasteryzowane produkty mleczne oraz woda. Główną przyczyną zakażeń człowieka jest jednak mięso drobiowe [12]. Prawidłową identyfikację i różnicowanie bakterii należących do rodzaju *Campylobacter* metodami mikrobiologicznymi utrudnia m.in. duża zmienność tych drobnoustrojów i ich specyficzne wymagania wzrostowe. Dodatkowo, stosunkowo często występują szczepy atypowe biochemicznie. Atrakcyjną alternatywą dla badań fenotypowych są obecnie metody wykorzystujące techniki biologii molekularnej. Różnicowanie bakterii należących do rodzaju *Campylobacter* możliwe jest przy zastosowaniu metod genotypowych obejmujących m.in. analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), również w połączeniu z elektroforezą pulsacyjną (PFGE), a także analizę polimorfizmu przypadkowo amplifikowanego DNA (AP-PCR) [13]. Jedną z technik powielania powtórzonych fragmentów DNA - ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) polega na zastosowaniu w reakcji PCR długich starterów nukleotydowych komplementarnych do sekwencji konserwatywnych w genomie rodziny *Enterobacteriaceae*, jednak różnie w nim rozmieszczonych w zależności od gatunku lub szczepu [6]. Inną z powszechniej używanych metod różnicowania *C. jejuni* i *C. coli* jest typowanie przy użyciu analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) amplifikowanego techniką PCR genu *flaA* (kodującego ekspresję białka flageliny). W wyniku działania enzymu restrykcyjnego (najczęściej jest to *DdeI*) powstaje swoisty dla każdego drobnoustroju układ ampikonów o różnych masach molekularnych, na podstawie którego można specyficznie różnicować szczepy *Campylobacter* obu gatunków [1, 9].

Celem pracy było określenie przydatności dwóch technik molekularnych: PCR-RFLP (*flaA*) oraz ERIC-PCR w różnicowaniu izolatów *Campylobacter* pochodzących z tuszek drobiowych.

## **Materiał i metody badań**

### *Szczepy bakteryjne*

W badaniach wykorzystano szczepy referencyjne: *C. jejuni* ATCC 33291 i *C. coli* ATCC 43478, oraz po 5 izolatów *C. jejuni* i *C. coli* pochodzących z tuszek drobiowych. Wymazy, z których pozyskano izolaty, pochodziły z jednego zakładu produkcyjnego i zostały pobrane jednego dnia. Bakterie klasyfikowano do rodzaju *Campylobacter* przy użyciu metody mikrobiologicznej wg PN-ISO 10272 [10]. Przynależność gatunkową wyosobnionych drobnoustrojów określano stosując test multiplex PCR [2].

### *Matrycowy DNA*

Bakteryjne DNA otrzymano z pojedynczych kolonii *Campylobacter* spp. inkubowanych na pożywce Karmali (Oxoid) przez 24 h w temp. 42°C w warunkach mikroaerofilnych. Bakterie zawieszano w 1 ml wody redetylowanej i odwirowywano 13 000 g przez 1 min. Do uzyskanego osadu dodawano 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-RFLP*

Amplifikacje przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej zawierającej startery flaAF (5' GGATTTTCGTATTAACACAAATGGTGC 3') i flaAR (5' CTGTAGTAATCTTAAA CAT TTTG 3') (IBB, Polska) [<http://campynet.vetinst.dk>] w stężeniach 0,1 μM, matrycowy DNA o koncentracji 20 ng/μl (5 μl), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP (200 μM), 2 U polimerazy Taq (Fermentas, Litwa). Reakcje wykonywano używając programu o następujących parametrach: temp. 94°C – 5 min, a następnie 30 cykli: 94°C – 1 min, 48°C – 1 min, 72°C – 2 min. oraz 72°C – 5 min. Produkt amplifikacji o masie 1700 pz poddawano działaniu enzymu restrykcyjnego *DdeI* (2 U) w temp. 37°C przez 3 h, wykonywano elektroforezę w 2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny o stężeniu 5 μg/ml przez 1 min, a następnie oglądano w świetle UV przy użyciu zestawu Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, USA). Do określenia wielkości uzyskanych prążków zastosowano marker masy molekularnej Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus firmy Fermentas o następującym rozkładzie prążków – 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 200, 3000.

#### *Test ERIC-PCR*

Przeprowadzono go w mieszaninie reakcyjnej o końcowej objętości 50 μl, zawierającej: 5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP (200 μM), bufor enzymatyczny, 2 U termostabilnej polimerazy Taq (Fermentas), startery: ERIC 1-R (5' ATGTAAGCTCCTGGGATCAC 3') i ERIC 2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3') [14] oraz matrycowy DNA o koncentracji 10 ng/μl (5 μl). Reakcje wykonano stosując program o następujących parametrach: temp. 94°C – 4 min (denaturacja wstępna), a następnie 40 cykli: 94°C – 45 s, 25°C – 45 s, 72°C – 1 min. Końcowy etap wydłużania przeprowadzono w temp. 72°C przez 5 min. Otrzymane produkty amplifikacji identyfikowano w 1,7% żelu agarozowym [3, 8].

## **Wyniki i dyskusja**

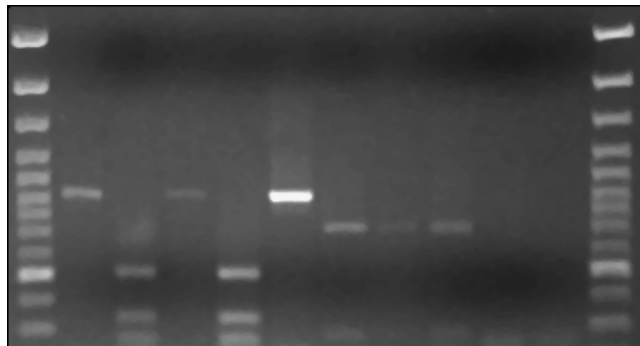
Typowanie szczepów bakteryjnych jest szczególnie ważne ze względów epidemiologicznych. Umożliwia precyzyjne określenie źródła zakażenia oraz dróg szerzenia się patogenów. Biorąc powyższe pod uwagę niezbędne jest opracowanie techniki, która charakteryzowałaby się dużą zdolnością różnicowania, powtarzalnością uzyskiwanych wyników, a także łatwością wykonania. W obecnej pracy do oceny zdolności różnicowania izolatów *Campylobacter* wybrano dwie techniki – PCR-RFLP oraz ERIC-PCR. W celu ustalenia warunków analizy wykorzystano DNA pochodzące ze szczepów referencyjnych *C. jejuni* i *C. coli*. Przeprowadzono szereg reakcji z różnymi koncentracjami matrycowego DNA, zmieniano również temperaturę

przyłączania starterów oraz stężenie jonów magnezu. Wynik każdorazowo oceniano na żelu agarozowym i w przypadku techniki ERIC-PCR wybierano takie stężenia reagentów i parametry amplifikacji, które dawały największą liczbę wyraźnych, powtarzalnych produktów amplifikacji. Testy te użyto następnie do oceny izolatów pochodzących z tuszek drobiowych. W przypadku techniki PCR-RFLP w pierwszym etapie pracy otrzymano produkt amplifikacji genu *flaA* (1700 pz), który następnie poddano działaniu enzymu restrykcyjnego *DdeI*. W rezultacie otrzymano 3 różne profile w odniesieniu do szczepów *C. jejuni* i 2 – *C. coli*, na które składały się fragmenty o masach molekularnych od ok. 120 – 900 pz, stanowiących podstawę do genotypowego różnicowania badanych szczepów *Campylobacter* (fot. 1). W kolejnym etapie badań wykonano test ERIC-PCR z użyciem tych samych 10 izolatów pochodzących z tuszek drobiowych. Otrzymano 6 profili molekularnych (po 3 w obrębie *C. jejuni* i *C. coli*), na które składały się od 4 do 8 amplikonów o masach od 100 do ponad 2000 pz (fot. 2).

Wyniki powyższych badań, w odniesieniu do techniki PCR-RFLP, są zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy również dobrze oceniają zdolność różnicowania tej metody w odniesieniu do szczepów *Campylobacter*, zwłaszcza *C. jejuni* i *C. coli*. Analiza ta jest obecnie szeroko rozpowszechniona w typowaniu tych drobnoustrojów pochodzących z różnych źródeł. Jest to związane z potwierdzeniem w wielu doświadczeniach jej wysokiej zdolności różnicowania i powtarzalności uzyskiwanych wyników, co w połączeniu z innymi cechami, takimi jak szybkość i łatwość wykonania analizy oraz stosunkowo niskie koszty sprawia, że jest to obecnie jedna z bardziej przydatnych technik molekularnych służących do różnicowania bakterii należących do rodzaju *Campylobacter* [1, 4, 5].

W obecnej pracy uzyskano również zadowalające rezultaty w odniesieniu do testu ERIC-PCR. Jednak jest on stosunkowo rzadko używany do różnicowania tej grupy drobnoustrojów z uwagi na pewne ograniczenia związane z relatywnie niską powtarzalnością wyników, na którą duży wpływ mają stosowane w różnych laboratoriach warunki amplifikacji. W związku z tym, przy wykorzystaniu tej techniki w badaniach epidemiologicznych należy zwrócić szczególną uwagę na ujednolicony sposób prowadzenia doświadczeń [7, 11].

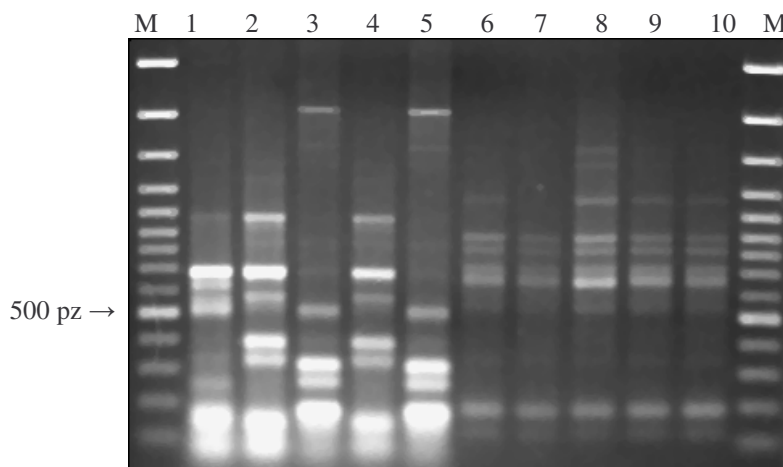
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M



500 pz →

Fot. 1. Profile PCR-RFLP szczepów *Campylobacter*. Poszczególne ścieżki: 1–5 szczepy *C. jejuni*, 6–10 szczepy *C. coli*, M – 100 pz marker masy molekularnej.

Phot. 1. PCR-RFLP profiles of *Campylobacter* strains. Individual Lanes: 1–5 *C. jejuni* strains, 6–10 *C. coli* strains, Lane M – 100 bp marker of the molecular mass (DNA ladder).



Fot. 2. Obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji testu ERIC-PCR otrzymanych z DNA szczepów *Campylobacter*. Poszczególne ścieżki 1–5 *C. jejuni*, 6–8 *C. coli*, M – 100 pz marker masy molekularnej.

Phot. 2. Agarose gel electrophoresis showing ERIC-PCR fingerprintings generated by *Campylobacter* strains. Individual Lanes: 1–5 *C. jejuni* strains; 6–10 *C. coli* strains; Lane M – 100 bp marker of the molecular mass (DNA ladder).

## Wnioski

1. Stosowane w pracy techniki ERIC-PCR i PCR-RFLP charakteryzują się dużą zdolnością genotypowego różnicowania drobnoustrojów należących do rodzaju *Campylobacter*.

2. Obie metody mogą być wykorzystywane do badań epidemiologicznych w tym związanych z zakażeniami pokarmowymi u ludzi.

### Literatura

- [1] Chuma T., Makino K., Okamoto K., Yugi H.: Analysis of distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broilers by using restriction fragment length polymorphism of flagellin gene. J. Vet. Med. Sci., 1997, **59**, 1011-1015.
- [2] Denis M., Soumet C., Rivoal K., Ermel 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] Endtz H.P., Ang C.W., van Den Braak N., Duim B., Rigter A., Price L.J., Woodward D.L., Rodgers F.G., Johnson W.M., Wagenaar J.A., Jacobs B.C., Verbrugh H.A., van Belkum A.: Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes. J. Clin. Microbiol., 2000, **38**, 2297-2301.
- [4] 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.
- [5] Harrington C. S., Moran L., Ridley A.M., Newell D.G., Madden R.H.: Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. J. Appl. Microbiol. 2003, **95**, 1321-1333.
- [6] Hulton C.S., Higgins C.F., Sharp P.M.: ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. Mol. Microbiol. 1991, **5**, 825-834.
- [7] Iriarte P., Owen R.J.: Repetitive and arbitrary primer DNA sequences in PCR-mediated fingerprinting of outbreak and sporadic isolates of *Campylobacter jejuni*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 1996, **15**, 17-22.
- [8] Nachamkin I., Allos B.M., Ho T.: *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. Clin. Microbiol. Rev., 1998, **11**, 555-567.
- [9] On S.L.: Identification methods for campylobacters, helicobacters, and related organisms. Clin. Microbiol. Rev., 1996, **9**, 405-422.
- [10] PN-ISO 10272: „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania termotolerancyjnych bakterii z rodzaju *Campylobacter*”.
- [11] Shi Z.Y., Liu P.Y., Lau Y.J., Lin Y.H., Hu B.S., Tsai H.N.: Comparison of polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis for the epidemiological typing of *Campylobacter jejuni*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 1996, **26**, 103-108.
- [12] Trachoo N.: *Campylobacter jejuni*: an emerging problem. J. Sci. Technol., 2003, **25**, 141-157.
- [13] Wassenaar T.M., Newell D.G.: Genotyping of *Campylobacter* spp. Appl. Environ. Microbiol., 2000, **66**, 1-9.
- [14] Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R.: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res., 1991, **19**, 6823-6831.

### THE USEFULNESS OF SOME SELECTED PCR TECHNIQUES IN DIFFERENTIATING THERMOTOLERANT *CAMPYLOBACTER* STRAINS

#### Summary

*Campylobacter* spp. is among the most common bacterial pathogens causing etiologic alimentary infections in humans. The major routes of transmitting this pathogen into human organisms are when people eat undercooked poultry, contaminated food, and/or drink contaminated water and non-pasteurised milk. Several discriminatory molecular methods are used in epidemiologic investigations as they make it possible to analyze a genotypic relationship among *Campylobacter* isolates obtained from the same or from different sources. One of such methods is an Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR). It consists in applying starters with long nucleotide sequences to amplification reactions. The said nucleotide sequences are complementary to conserved fragments present in the genome of *Enterobacteriaceae* bacteria, however, they are arranged in the genome of bacteria in different ways depending on the species or strain of the bacteria. ERIC-PCR makes it possible to quickly differentiate isolates, thus, it is a useful tool to analyze a prokaryotic genome. Recently, a length analysis of the restriction fragments (RFLP) of the flagellin gene *flaA* amplified by PCR technique has been applied to molecular typing of *Campylobacter*, especially of *C. jejuni* and *C. coli*. Additionally, this method is used in epidemiologic investigations.

The aim of the present paper was to investigate the capacity of ERIC-PCR and PCR-RFLP to distinguish *Campylobacter* strains isolated from poultry carcasses. The PCR-RFLP analysis performed resulted in five (5) different restriction profiles consisting of a series of DNA fragments showing different molecular masses. And the ERIC-PCR test made it possible to produce six (6) molecular profiles. The results of this investigation prove a relatively high discriminatory capacity of the two typing methods as applied in this paper, as well as their usability to genotypic differentiation of *C. jejuni* and *C. coli* strains.

**Key words:** *Campylobacter*, differentiation, *flaA* typing, PCR-RFLP, ERIC-PCR ☒