

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

Marek Selwet¹ , Mariola Galbas²

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ¹Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, ul. Szydlowska 50, 60-656 Poznań, ²Katedra Biochemii i Biotechnologii, ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań

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 (Selwet i Galbas, 2012). Tak powszechne występowanie tych bakterii stanowi ryzyko zanieczyszczenia produktów pochodzenia zwierzęcego, szczególnie mięsa drobiowego, mięsa czerwonego. Również bliski kontakt z chorym zwierzęciem i nieprzestrzeganie podstawowych zasad higieny może wywołać kamylobakteriozę u ludzi (Wieczorek i Osek, 2017). Od 2005 r. w Europie odnotowano wzmożoną zapadalność na tę chorobę wśród ludzi. W 2015 r. ogólna częstość występowania zakażeń w Unii Europejskiej wynosiła 65,5 przypadków/100 000 mieszkańców (Pölzer i in., 2018). Od 20 do 40% zakażeń wśród ludzi było wywołane kontaktem z drobiem lub mięsem drobiowym (Vellinga i van Loock, 2002). Najczęstsze objawy kliniczne to biegunka, gorączka i bóle brzucha. Infekcja zazwyczaj ustępuje samoistnie, chociaż mogą wystąpić powikłania w postaci zapalenia stawów (Moore i in., 2005). Według najnowszego raportu EFSA (2016), około 200 000 zakażeń rocznie kamylobakteriozą u ludzi było spowodowane spożyciem zanieczyszczonej żywności. Uważa się, że faktyczna liczba przypadków wynosi 9 mln rocznie. Koszty związane z występowaniem kamylobakteriozy w publicznej opiece zdrowotnej w UE EFSA szacuje na 2,4 mld euro rocznie. Coraz częściej izolaty *Campylobacter* spp. pochodzące od

ludzi wykazują oporność na stosowane chemioterapeutyki z grupy chinolonów (Dalhoff, 2012) czy antybiotyki z grupy aminoglikozydów oraz makrolidów, co stanowi zagrożenie dla zdrowia publicznego (Di Giannatale i in., 2014). Nabywanie oporności jest często związane ze spontanicznymi mutacjami punktowymi genów kodujących enzymy syntetyzowane przez *Campylobacter* spp. (Mahdavi i in., 2016). Wykazano także różne właściwości patogenne bakterii, których podłożem jest duże zróżnicowanie genetyczne szczepów. Za patogenność bakterii odpowiadają geny, które warunkują ruchliwość, przyczepność, inwazyjność i syntezę toksyny-CDT (CDT-cytoletal distending toxin), kodowanej przez trzy geny – *cdtA*, *cdtB* i *cdtC*. Cytotoksyna ta powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M (Lara-Tejero i Galan, 2001). 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* (Ge i in., 2008). W konsekwencji może to prowadzić

do zaburzenia wchłaniania w jelitach.

Biegunki u koni często się lekceważy, ponieważ są one traktowane jako skutek uboczny podczas zmiany zadawanej paszy. Dopiero od niedawna zaczęto zwracać uwagę na czynniki zakaźne, które mogą być przyczyną dolegliwości u koni. Z tego względu próbki kału koni bada się pod względem obecności w nich jaj i larw nicieni, toksyn bakterii z rodzaju *Clostridium*, enteropato-genów, domieszki krwi i piasku. Analiz dokonuje się z wykorzystaniem testów immunologicznych. Coraz większego znaczenia nabiera również fakt, że za biegunki u koni odpowiedzialne są bakterie z rodzaju *Campylobacter* (Hurcombe i in., 2009). Łagodnie przebiegająca biegunka rozwija się dość często u źrebiąt. Wiąże się to ze zmianą flory bakteryjnej żrebaka zaczynającego spożywać siano i ziarno. Biegunki bakteryjne mają ostrzejszy przebieg – konie są osowiałe, nie mają apetytu, często mają podwyższoną temperaturę, a ich odchody są wodniste o ostrym, nieprzyjemnym zapachu. Konieczna jest wówczas intensywna kuracja antybakteryjna, uzupełnienie utraty płynów i zaburzeń elektrolitowych oraz opieka weterynaryjna.

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*.

Material i metody

Materiał do badań stanowiły próbki wymazów pobranych *per rectum* (wymazówki z pod-

łożem transportowym) od 100 zdrowych klaczy w wieku do 5 lat ze stajni położonych na terenie Wielkopolski. Próbkę pobierano w trzech kolejnych dniach, transportowano do laboratorium w terminie do 6 godzin w temperaturze 4°C.

Izolacja *Campylobacter* spp. z próbek kału

Próbki kału umieszczano początkowo w 3 ml płynnego podłoża selektywnego Karmali (Oxoid). Następnie inkubowano w anaerostacie CampyGen (Oxoid) w temp. 42°C/24 h (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂). Hodowle bakteryjne po inkubacji zwirowano (1400 x g/15 min), zlano supernatant, a osad dodano do 1 ml podłoża Karmali. Rozprowadzono 200 µl zawiesiny za pomocą głaszczki na podłożu selektywnym Karmali i inkubowano w anaerostacie w temp. 42°C/24 h. W celu potwierdzenia występowania *Campylobacter* spp. wykonano test biochemiczny API Campy (bioMerieux). W badaniach wykorzystano także dwa szczepy referencyjne *C. jejuni* ATCC 33291, *C. coli* ATCC 33559 (DSMZ Germany).

Reakcja PCR

Do identyfikacji bakterii użyto 25 µl mieszaniny reakcyjnej o składzie: 2,5 µl 10 x PCR bufor, 2,5 mM dNTP Mix, 25 mM MgCl₂, stężenie starterów: 5 pM *C. jejuni*, 5 pM *C. coli*, 0,2 µl U *Taq* polimerazy DNA, 2,5 µl DNA, woda. Sekwencje starterów zamieszczono w tabeli 1. Reakcję prowadzono w termocyklerze (Bio-Rad). Profil temperaturowy reakcji: wstępna denaturacja 95°C/6 min, następnie 30 cykli, z których każdy składał się z: denaturacji w 95°C/0,5 min, przyłączania starterów w 59°C/0,5 min, wydłużania w 72°C/0,5 min i 74°C/2 min. Uzyskane produkty analizowano metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym.

Tabela 1. Sekwencje starterów użytych dla wykrycia *C. coli* i *C. jejuni*
 Table 1. Sequences of the primers used to detect *C. coli* and *C. jejuni*

Izolaty <i>Isolates</i>	Startery <i>Primers</i>	Sekwencja 5' → 3' <i>Sequence 5' → 3'</i>	Wielkość produktu (pz) <i>Product size (bp)</i>	Literatura <i>Literature</i>
<i>C. coli</i>	CCF	GTAAAACCAAAGCTTATCGTG	126	Selwet i in./ <i>et al.</i> (2016)
	CCR	TCCAGCAATGTGTGCAATG		
<i>C. jejuni</i>	CJF	ACTTCTTTATTGCTTGCTGC	323	
	CJR	GCCACAACAAGTAAAGAAGC		

Identyfikacja genów wirulencji

Identyfikacji genów *cadF*, *flaA*, *iam* dokonano stosując startery przedstawione w tabeli 2. Reakcję prowadzono w całkowitej objętości 25 µl, skład mieszaniny: 2,5 µl 10 x PCR bufor, 2,5 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTP (2,5 mM), 1 µl starterów (5 pM), 0,2 µl (1U) U *Taq* polimerazy DNA

(Promega Corporation), 2 µl DNA, 15, 5 µl wody.

Profil temperaturowy reakcji: wstępna denaturacja 94°C/1 min, następnie 30 cykli, z których każdy składał się z: denaturacji 94°C/0,5 min, przyłączenia starterów 45°C/1 min, wydłużania 72°C/3 min i 72°C/5 min. Uzyskane produkty analizowano metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym.

Tabela 2. Sekwencje starterów wykorzystanych do wykrycia genów *cadF*, *flaA*, *iam*
 Table 2. Sequences of the primers used to detect the genes *cadF*, *flaA*, *iam*

Startery <i>Primers</i>	Sekwencja 5' → 3' <i>Sequence 5' → 3'</i>	Wielkość produktu (pz) <i>Product size (bp)</i>	Literatura <i>Literature</i>
<i>cad F-F</i>	TGGAGGGTAATTTAGATATTG	400	Konkel i in./ <i>et al.</i> (1999)
<i>cad F-R</i>	CTAATACCTAAAGTTGAAAC		
<i>fla A-F</i>	GGATTTCGTATTAACACAAATGGTGC	1728	Nachamkin i in./ <i>et al.</i> (1993)
<i>fla A-R</i>	CTGTAGTAATCTTAAAACATTTTG		
<i>iam-F</i>	GCGCAAAATATTATCACCC	518	Carvalho i in./ <i>et al.</i> (2001)
<i>iam-R</i>	TTCACGACTACTATGCGG		

Identyfikacja genów warunkujących występowanie toksyny CDT metodą PCR multiplex

Do identyfikacji genów *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* użyto starterów przedstawionych w tabeli 3. Użyto 25 µl mieszaniny reakcyjnej o składzie: 2,5 µl 10 x PCR bufor, 6 x 1 µl starterów (5 pM), 1 µl dNTP (2,5 mM), 0,2 µl *Taq* polimerazy, 1,8

µl DNA, 13,5 µl wody. Warunki temperaturowe reakcji: wstępna denaturacja 94°C/2 min, następnie 30 cykli, z których każdy składał się z: denaturacji 94°C/0,5 min, przyłączenia starterów 50°C/0,5 min, wydłużania 72°C/1 min i 72°C/5 min. Uzyskane produkty analizowano metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym.

Tabela 3 Sekwencje starterów wykorzystanych do wykrycia genów *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*
 Table 3. Sequences of the primers used to detect the genes *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*

Startery Primers	Sekwencja 5' →3' Sequence 5' →3'	Wielkość produktu (pz) Product size (bp)	Literatura Literature
<i>cdtA</i> -F	CTA TTA CTC CTA TTA CCC CAC C	422	Carvalho i in./et al. (2010)
<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		

Ocena wrażliwości na antybiotyki

Wyzolowane szczepy bakterii z rodzaju *Campylobacter* zostały poddane badaniu w kierunku wrażliwości na antybiotyki metodą dyfuzji krążkowej Kirby-Bauera. Metoda była zgodna z EUCAST (2017) Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing i National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Kolonie bakteryjne były przesiewane na podłoże LB Broth (Merck). Po 24 h inkubacji w temperaturze 37°C hodowlę rozcieńczono do gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Ponownie dokonano rozcieńczenia zawiesiny w stosunku 1:10 i wykonano posiew powierzchniowy na podłożu Mueller-Hintona (Merck) z dodatkiem 20 mg/L β-NAD. Następnie nałożono krążki nasączone antybiotykami: ampicylina (AMP) 25 µg, ciprofloksacyna (CIP) 5 µg, erytromycyna (E) 15 µg, gentamycyna (GE) 10 µg, meropenem (MEM) 10 µg, tetracyklina (TE) 30 µg i inkubowano w temperaturze 41±1°C/24 h.

Wyniki i ich omówienie

U 36 spośród 100 klaczy wykryto występowanie pałeczek z rodzaju *Campylobacter*, co stanowiło 36% próbek pozytywnych. Dzięki za-

stosowaniu technik molekularnych w 16 przypadkach oznaczono *C. jejuni* (44%), nie stwierdzono występowania *C. coli*. Odmienne wyniki uzyskali w swoich badaniach Komba i in. (2014), u których próbki pozytywne *Campylobacter* spp. oznaczono u 60% badanych osobników. Baserisalehi i in. (2007) oznaczyli występowanie tej bakterii u 27% spośród 59 próbek pobranych od koni. Moriarty i in. (2015) wykryli w 2 próbkach kałowych obecność *Campylobacter* spp., 1 gatunek termotolerancyjny i 1 oznaczony jako *C. jejuni*.

Uważa się, że monitorowanie występowania pałeczek z rodzaju *Campylobacter* jako potencjalnych sprawców przewlekłych biegunek u koni powinno być przeprowadzane rutynowo (Hurcombe i in., 2009). Z drugiej strony jednak, obecność bakterii *Campylobacter* u tych zwierząt jest rzadko odnotowywana (Hald i in., 2014). Dotychczas opublikowano niewiele doniesień koncentrujących się na identyfikacji tych bakterii u koni. Moriarty i in. (2015) badali występowanie *Campylobacter* spp. w kale u zdrowych dorosłych koniowatych i zidentyfikowali w nim obecność termotolerancyjnego *Campylobacter* spp. oraz *C. jejuni*.

Tabela 4. Występowanie genów *cadF*, *flaA*, *iam*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* u *C. jejuni*
 Table 4. Occurrence of *cadF*, *flaA*, *iam*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* genes in *C. jejuni*

Izotaty – 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.*

Tabela 5. Oporność izolatów *C. jejuni* na antybiotyki
 Table 5. Resistance of *C. jejuni* isolates to antibiotics

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 – ampicilin, CIP – ciprofloxacin, E – erythromycin, GE – gentamicin, MEM – meropenem, TE – tetracycline.

Do dalszych badań na obecność genów wirulencji użyto 16 izolatów *C. jejuni*. U 10 izolatów wykryto obecność genu *cadF*, co stanowi 62,5%. Białko kodowane przez ten gen odgrywa ważną rolę w procesie patogenezy kamylobakteriozy. Odpowiada za połączenie z fibronektyną enterocytów nabłonka jelit, prowadząc internalizację komórek bakteryjnych (Andrzejewska i in., 2010; Szewczyk i in., 2011). U żadnego z izolatów nie stwierdzono występowania genów *flaA* i *iam* (tab. 4). Gen *flaA* jest odpowiedzialny za powstawanie białka – flageliny FlaA, będącej jedną z dwóch podjednostek wici *Campylobacter*, natomiast gen *iam* koduje marker odpowiedzialny za inwazyjność (IAM, *invasion associated marker*) i przeżycie w komórkach gospodarza (Carvalho i in., 2001; Rokosz-Chudziak i Rastawicki, 2014).

Dalszy etap badań dotyczył wykrycia obecności genów *cdtA*, *cdtB* i *cdtC* odpowiedzialnych za występowanie toksyny CDT. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że gen *cdtB* występuje u 6 izolatów (37,5%), nie wykryto natomiast obecności genów *cdtA* i *cdtC* (tab. 4). Powszechnie geny te są stwierdzane u drobiu, kotów, psów i prosiąt (Carvalho i in., 2010), natomiast brak jest opracowań dotyczących koni. Prowadzone badania własne mogą zatem stanowić ważny element informacji dotyczącej występowania tych bakterii u koni. Mogą odpowiedzieć na pytanie, czy biota jelitowa koni może być potencjalnym rezerwuarem patogennych dla człowieka izolatów *Campylobacter* spp.

Stosowane w różnych laboratoriach metody oznaczania antybiotykooporności opartej na dyfuzji substancji antybakteryjnej cechuje duża różnorodność. W przypadku *Campylobacter* spp. uzyskiwane wyniki charakteryzują się dużą rozbieżnością. Należy zaznaczyć, że makrolidy, takie jak erytromycyna są powszechnie stosowane w leczeniu zakażeń *Campylobacter* spp. u ludzi. Szczepy izolowane od zwierząt mogą wykazywać nabytą oporność na tę grupę antybiotyków o cha-

rakterze krzyżowym. Badając antybiotykooporność izolatów stwierdzono, że 7 z nich wykazywało wrażliwość na wszystkie użyte antybiotyki, natomiast wszystkie szczepy wykazywały wrażliwość na ciprofloksacynę (CIP) należącą do chinolonów (należy zaznaczyć, że mutacja genu *gyrA* może skutkować opornością *Campylobacter* spp. na ten antybiotyk), gentamycynę (GE) i meropenem (MEM) (tab. 5). O stosowaniu gentamycyny w walce z kamylobakteriozami piszą w swoich pracach Wasyl i Osek (2008) oraz Rzewuska i in. (2010). Odnotowuje się stały wzrost oporności *Campylobacter* spp. na coraz większą ilość czynników przeciwdrobnoustrojowych. Wyniki badań własnych wskazują także na skuteczne działanie meropenemu stosowanego do zwalczania np. pałeczek z rodzaju *Salmonella* (Wieczorek i Osek, 2017; Karikari i in., 2017).

Podsumowanie i wnioski

Faktem jest niewielka ilość doniesień naukowych dotyczących występowania bakterii z rodzaju *Campylobacter* oraz obecności genów wirulencji u tych bakterii izolowanych od koni. Należy zatem zwrócić szczególną uwagę na stosowanie coraz bardziej nowoczesnych metod izolowania i identyfikacji różnych gatunków pałeczek z rodzaju *Campylobacter* u tej grupy zwierząt. Zadawalający jest fakt, że nie oznaczono w grupie badanych koni występowania dużej ilości genów zjadliwości oraz genów odpowiedzialnych za występowanie toksyny CDT. Pomimo że sama obecność drobnoustroju nie jest równoznaczna z wystąpieniem zakażenia, znaczenie kliniczne, a także ich chorobotwórczość nie są do końca poznane i wymagają dalszych badań. Badania nad tymi bakteriami jako czynnikami ryzyka są niezbędne do lepszego zrozumienia epidemiologii *Campylobacter* spp., jak i położenia nacisku na fakt niebezpieczeństwa wynikającego z nierozsądnego stosowania antybiotyków zarówno w terapii ludzi jak i zwierząt.

Literatura

- Andrzejewska M., Szczepańska B., Śpica D., Klawe J.J. (2010). Prevalence of pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from environmental material. *Environ. Med.*, 13: 57–62.
- Baserisalehi M., Bahador N., Kapadnis B.P. (2007). Isolation and characterization of *Campylobacter* spp. from domestic animals and poultry in South of Iran. *Pak. J. Biol. Sci.*, 10: 1519–1524; [http://doi: 10.3923/pjbs.2007.1519.1524](http://doi:10.3923/pjbs.2007.1519.1524).
- Carvalho A.C., Ruiz-Palacios G.M., Ramos-Cervantes P., Cervantes L.E., Jiang X., Pickering L.K. (2001). Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 1353–1359; [http://doi: 10.1128/JCM.39.4.1353-1359.2001](http://doi:10.1128/JCM.39.4.1353-1359.2001).
- Carvalho A.F., Silva D.M., Azevedo S.S., Piatti R.M., Genovez M.E., Scarcelli E. (2010). Detecção dos genes da toxina citoletal distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62: 1054–1061; [http://doi: org/10.1590/S0102-09352010000500006](http://doi:org/10.1590/S0102-09352010000500006).
- Dalhoff A. (2012). Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdiscip. Perspect. on Infect. Dis.*, 2012, Article ID 976273, 37 pages; [http://doi: org/10.1155/2012/976273](http://doi:org/10.1155/2012/976273).
- Di Giannatale E., Di Serafino G., Zilli K., Alessiani A., Sacchini L., Garofolo G., Aprea G., Marotta F. (2014). Characterization of antimicrobial resistance patterns and detection of virulence genes in *Campylobacter* isolates in Italy. *Sensors.*, 14: 3308–3322; [http://doi: 10.3390/s140203308](http://doi:10.3390/s140203308).
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.*, 2017, 15 (12): 5077, 228 pp.; <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>.
- EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing (2017); www.eucast.org
- Ge Z., Schauer D.B., Fox J.G. (2008). *In vivo* virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol.*, 10: 1599–1607; <http://doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01173.x>.
- Hald B., Skovgård H., Bang D.D., Pedersen K., Dybdahl J., Jespersen J.B., Madsen M. (2014). Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. *Emerg. Infect. Dis.*, 10: 1490–1492; [http://doi: 10.3201/eid1008.040129](http://doi:10.3201/eid1008.040129).
- Hurcombe S.D.A., Fox J.G., Kohn C.W. (2009). Isolation of *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* in a two-year-old Quarterhorse with chronic diarrhea of an undetermined etiology. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 21: 266–269; <http://doi:10.1177/104063870902100218>.
- Karikari A.B., Obiri-Danso K., Frimpong E.H., Krogfelt K.A. (2017). Antibiotic resistance of *Campylobacter* recovered from faeces and carcasses of healthy livestock. *Bio. Med. Res. Int.*, Article ID 4091856, 9 pages; <http://doi.org/10.1155/2017/4091856>.
- Komba E.V.G., Mdegela R.H., Msoffe P.L.M., Matowo Makori D.E., Maro J. (2014). Occurrence, species distribution and antimicrobial resistance of *Campylobacter* thermophilic isolates from farm and laboratory animals in Morogoro, Tanzania. *Vet. World*, 7: 559–565.
- Konkel M., Gray S.A., Kim B.J., Gravis S.G., Yoon J. (1999). Identification of enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* based on the *cadF* virulence gene and its product. *J. Clin. Microbiol.*, 37: 510–517.
- Lara-Tejero M., Galan J.E. (2001). CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect. Immun.*, 69: 4358–4365; <http://doi:10.1128/IAI.69.7.4358-4365.2001>.
- Mahdavi J., Pirincioğlu N., Oldfield N.J., Carlsohn E., Stooft J., Aslam A., Self T., Cawthraw S.A., Petrovska L., Colborne N., Sihlbom C., Borén T., Wooldridge K.G., Ala'Aldeen D.A.A. (2016). A novel O-linked glycan modulates *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein-mediated adhesion to human histo-blood group antigens and chicken colonization. *Open. Biol.*, 4, 130202; [http://doi: 10.1098/rsob.130202](http://doi:10.1098/rsob.130202).
- Moore J.E., Corcoran D., Dooley J.S., Fanning S., Lucey B., Matsuda M., McDowell D.A., Mégraud F., Millar B.C., O'Mahony R., O'Riordan L., O'Rourke M., Rao J.R., Rooney P.J., Sails A., Whyte P. (2005). *Campylobacter*. *Vet. Res.*, 36: 351–382; [http://doi: 10.1051/vetres:2005012](http://doi:10.1051/vetres:2005012).

- Moriarty E.M., Downing M., Bellamy J., Gilpin B.J. (2015). Concentrations of faecal coliforms, *Escherichia coli*, enterococci and *Campylobacter* spp. in equine faeces. *New Zealand Vet. J.*, 63: 104–109; <http://doi:10.1080/00480169.2014.952789>.
- Nachamkin I., Bohachic K., Patton C.M. (1993). Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 1531–1536.
- Pölzer T., Stüger H.P., Lassing H. (2018). Prevalence of most common human pathogenic *Campylobacter* spp. in dogs and cats in Styria, Austria. *Vet. Med. Sci.*, 4: 115–125; <http://doi:10.1002/vms3.93>.
- Rokosz-Chudziak N., Rastawicki W. (2014). Selected mechanisms of pathogenicity of *Campylobacter jejuni*. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 66: 47–58.
- Rzewuska K., Korsak D., Maćkiw E. (2010). Antibiotic resistance of bacteria *Campylobacter* sp. *Prz. Epidemiol.*, 64: 63–68.
- Selwet M., Galbas M. (2012). Monitoring of selected genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from domestic animals. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 56: 507–511; <http://doi:10.2478/v10213-012-0089-y>.
- Selwet M., Galbas M., Borkowski A., Cłapa T., Porzucek F., Auguścik-Lipka M. (2016). The effect of chilling of poultry meat in the presence of *Campylobacter coli*. *Technological Progress in Food Processing*, 1: 58–61.
- Szewczyk R., Wieczorek K., Osek J. (2011). Molekularne mechanizmy chorobotwórczości termotolerancyjnych *Campylobacter*. *Med. Weter.*, 67: 725–732.
- Vellinga A., Looek F. van (2002). The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related *Campylobacter enteritis*. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 19–22; <http://doi:10.3201/eid0801.010129>.
- Wasył D., Osek J. (2008). Monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* strains isolated from animals. *Życie Wet.*, 3: 107–110.
- Wieczorek K., Osek J. (2017). Antimicrobial resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* strains isolated in the European Union Member States in 2015. *Życie Wet.*, 92: 373–375.

**ASSESSMENT OF THE OCCURRENCE OF SELECTED VIRULENCE GENES,
AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ISOLATES
COLLECTED FROM HORSES**

Summary

The study concerned the occurrence of selected virulence genes, antibiotic resistance and hemolytic capacity of *Campylobacter jejuni* strains isolated from horses. Swab samples collected per rectum from 100 horses from stables located in Wielkopolska region were studied. None of the horses exhibited typical disease symptoms. *Campylobacter* bacteria were found in 36 samples (36%) cultured from 100 horses. Molecular techniques resulted in the identification of 16 cases of *C. jejuni* (44%). No *C. coli* were identified in the samples. Sixteen *C. jejuni* isolates were used in further research on the occurrence of virulence genes. The *cadF* gene was found in 10 isolates (62.5%). The presence of the genes responsible for the occurrence of cytolethal distending toxin (CDT) was also investigated. The results showed that the *cdtB* gene was present in 6 isolates (37.5%), whereas *cdtA* and *cdtC* genes were not detected. The antibiotic resistance test revealed that 7 isolates were sensitive to all the antibiotics used in the test. All the strains were sensitive to ciprofloxacin (CIP), gentamicin (GE) and meropenem (MEM). Due to the small number of scientific reports concerning the occurrence of *Campylobacter* bacteria and the presence of virulence genes in the bacteria isolated from the horses it seems sensible to continue research on campylobacteriosis in these animals.

Key words: horses, *C. jejuni*, virulence genes, antibiotic resistance