

UDK 579.67
616.33-002-078
078

Ispitivanje virulencije različitih sojeva kampilobaktera u mišjem modelu

Comparative virulence of four different *Campylobacter* strains in a mouse model

Darinka Vučković^{*1}, Maja Abram¹

SAŽETAK. Cilj: Bakterije roda *Campylobacter* najčešći su uzročnici bakterijskog gastroenteritisa u ljudi širom svijeta. Najčešćim izvorom infekcije ljudi s *C. jejuni* i *C. coli* smatra se pileće meso. Dijelom i zbog nedostatka odgovarajućeg životinjskog modela za *in vivo* istraživanja, još uvijek nije objašnjeno jesu li svi izolati iz namirnica virulentni i mogu li izazvati infekciju u čovjeka. Cilj našeg istraživanja bio je utvrditi razliku u virulenciji između sojeva kampilobaktera različitog podrijetla koristeći prethodno uspostavljeni model miše kampilobakterioze. **Metode:** BALB/c miševi intravenski su inficirani različitim sojevima kampilobaktera. Ispitana su tri soja *C. jejuni* (dva klinička izolata i jedan izolat iz pilećeg mesa) i jedan *C. coli* (klinički izolat). Broj bakterija u homogenatima organa (jetre i slezene) praćen je osam dana. **Rezultati:** Nakon inokulacije, bez obzira na ispitivani soj, uspostavljena je sustavna infekcija koja je potvrđena izolacijom bakterija iz jetre i slezene. S obzirom na razlike u broju izoliranih kampilobaktera iz homogenata ispitivanih organa, zapažena je razlika u virulenciji ispitivanih sojeva. Najveći broj bakterija dokazan je u jetri i slezeni životinja inficiranih *C. jejuni* izolatom iz pilećeg mesa, dok je *C. coli* pokazao najslabiju virulenciju. **Zaključci:** Bakterije roda *Campylobacter* pokazuju razlike u virulenciji ovisno o vrsti i podrijetlu izolata. U opisanom mišjem modelu virulencija je najznačajnije izražena u slučaju *C. jejuni* izolata iz namirnice, upućujući na značajnost pilećeg mesa u uspostavi humane kampilobakterioze.

Ključne riječi: kampilobakteri, klinički izolat, miševi, pilećina, virulencija

SUMMARY. Aim: *Campylobacter* spp. is recognized as the most common bacterial cause of human gastroenteritis worldwide. Poultry meat is considered to be a major source of *C. jejuni* and *C. coli*. However, partly due to the lack of appropriate animal model of infection, it is still not clear whether all of food isolates are virulent and can cause disease in humans. The aim of this study was to affirm possible virulence differences of *Campylobacter* spp. from different origin in a previously established mouse model. **Methods:** BALB/c mice were intravenously infected with four different *Campylobacter* strains. Three different strains of *C. jejuni* (two isolates recovered from diarrhoeal patients and one poultry derived isolate), and one *C. coli* (human clinical isolate) were tested. Infected mice were sacrificed at different time points and the number of recovered bacteria (CFU/organ) in the organ homogenates (spleen and liver) was determined. **Result:** The isolates were differentially virulent for mice according to different numbers of bacteria recovered from the examined organs. The highest numbers of bacteria were recovered from livers and spleens of animals infected with food isolate of *C. jejuni*. *C. coli* showed the least virulence potential. **Conclusions:** *Campylobacter* spp., a major human enteric pathogen, exhibits significant strain-to-strain differences in pathogenic potential in a mouse model. Mouse virulence of tested strains showed a trend toward food isolate indicating chicken meat associated risk of campylobacteriosis.

Key words: campylobacters, clinical isolate, food isolate, mice, virulence

¹ Zavod za mikrobiologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Primljeno: 18. 7. 2008.

Prihvaćeno: 25. 9. 2008.

Adresa za dopisivanje:

^{*} Darinka Vučković,
Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju,
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci,
Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka
tel. +385 51 651 172; faks: +385 51 651 177
e-mail: dara@medri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Kampilobakteri, gram-negativni zavijeni štapići, normalni su stanovnici probavnog sustava toplokrvnih životinja i ptica. Ima ih više od 17 vrsta, a u humanoj patologiji najznačajniji su *Campylobacter jejuni* koje se može naći i u peradi, mačaka, pasa i glodavaca, te *C. coli* koji se izolira pretežno iz svinja^{1,2}. Ove su vrste, a posebno *C. jejuni*, danas prepoznate kao vodeći uzročnici bakterijskog gastroenteritisa u zemljama u razvoju i razvijenim zemlja-

Kampilobakteri, posebno *C. jejuni* i *C. coli*, danas su vodeći uzročnici bakterijskog gastroenteritisa u zemljama u razvoju i razvijenim zemljama. Glavnim izvorom infekcije u ljudi smatra se nedovoljno termički obrađeno pileće meso, no još uvijek nije poznato jesu li svi sojevi izolirani iz mesa peradi sposobni izazvati infekciju.

ma i izoliraju se znatno češće od ostalih crijevnih patogena, salmonela i šigela³. Poznat je cijeli niz činitelja virulencije kampilobaktera. Jedan od najranije upoznatih je bič, flagela, koja ima važnu ulogu u kolonizaciji sluznice probavnog sustava^{4,5}. Dokazano je također da neke tvari, kao što su žuč ili mucin, djeluju kao kemoatraktanti za kampilobaktere, što olakšava naseljavanje u probavnom sustavu i žučnom mjehuru životinja, a vjerojatno i ljudi⁶. Kampilobakteri također mogu proizvoditi i niz toksina od kojih je najpoznatiji citoletalni toksin (engl. *cytolethal distending toxin*, CTD), zatim vero toksin, shiga-like toksin, hepatotoksin itd., međutim njihova uloga u patogenezi nije sasvim razjašnjena⁷⁻⁹.

Zbog velike prevalencije *C. jejuni* u peradi, nedovoljno termički obrađeno pileće meso ili križna kontaminacija druge hrane smatra se glavnim izvorom infekcije u ljudi. Izvor infekcije može biti i meso drugih domaćih životinja, naročito svinja, ali i nepasterizirano mlijeko, voda i druge namirnice zagađene ekskretima inficiranih životinja te izravni kontakt s inficiranim životinjama (profesionalno ili s kućnim ljubimcima)¹⁰. Prema podacima laboratorija za kontrolu hrane u Hrvatskoj, tijekom 2005. utvrđeno je tri posto uzoraka hrane životinjskog podrijetla kontaminirane kampilobakterom¹¹.

Iako je uočena veza između konzumacije kontaminiranog pilećeg mesa i kampilobakterioze u ljudi, još uvijek nije poznato jesu li svi sojevi izolirani iz mesa peradi sposobni izazvati infekciju u čovjeka. Nedostatak pogodnog životinjskog modela za istraživanje virulencije kampilobaktera *in vivo* otežava izučavanje patogeneze kampilobakterioze, stoga smo odlučili usporediti virulenciju nekoliko sojeva kampilobaktera različitog podrijetla na prethodno uspostavljenom eksperimentalnom mišjem modelu sustavne kampilobakterioze koji se pokazao visoko reproducibilnim i pogodnim za istraživanje patogeneze ove bolesti¹².

MATERIJAL I METODE

Pokusne životinje. U radu su korišteni BALB/c (H-2d) miševi, ženke starosti 8 – 10 tjedana. Miševi su uzgojeni u uzgojnoj koloniji Medicinskog fakulteta u Rijeci, a hranjeni su hranom za laboratorijske mišve (Dieta M Standard, Mucedola s. r. l., Italija).

Bakterijski sojevi. Ispitana su dva klinička izolata *C. jejuni* (A i B) izolirana iz stolice bolesnika s izraženim enteralnim simptomima, jedan izolat *C. jejuni* (C) izoliran iz namirnice (pileće meso) te jedan klinički izolat *C. coli* iz stolice bolesnika s proljevom. Bakterijski sojevi su do upotrebe zamrznuti u moždano srčanom bujonu (BHI od engl. *brain heart infusion*) (Difco, Detroit, SAD) uz 15% (v/v) glicerola na -80°C. Inokulum je pripreman odleđivanjem bakterija te presađivanjem na krvni agar s dodatkom 5% ovčje krvi. Nakon inkubacije od 48 sati u mikroaerofilnim uvjetima (CampyPak vrećice, Becton Dickinson, Maryland, SAD) i pri temperaturi od 42°C radila se svježa suspenzija za inokulaciju. Miševi su inficirani intravenski (i.v.) dozom od 2.5 – 5x10⁸ bakterijskih stanica (CFU od engl. *colony forming unit*) po životinji u volumenu 0,2ml BHI. Broj bakterija u suspenziji određivan je spektrofotometrijski, a potvrđen nasađivanjem serijskih desetorostrukih razrjeđenja na krvni agar s dodatkom 5% ovčje krvi.

Određivanje broja kampilobaktera u organima. Broj bakterija u homogenatima tkiva/organa praćen je tijekom osam dana. Nakon žrtvovanja aseptički su odstranjene jetra i slezena. Svaki organ je propasiran u 5 ml sterilne puferirane fiziološke otopine (PBS od engl. *phosphate buffered saline*). Homogenati organa su zatim centrifugirani na

1300g kroz 5 minuta, supernatant je odstranjen, a talog resuspendiran u 5ml destilirane vode i ostavljen 15 minuta na sobnoj temperaturi. Bakterije su zatim isprane u fiziološkoj otopini te resuspendirane u 5ml BHI bujona. Broj bakterijskih stanica određen je nasađivanjem serijskih desetostrukih razrjeđenja homogenata organa na krvni agar s 5% ovčje krvi nakon inkubacije od 48 sati u mikroaerofilnim uvjetima.

Statistička obrada. Razlike između pojedinih parova bakterija određivane su pomoću Mann-Whitney testa. Razina statističke značajnosti postavljena je na 95% ($p < 0,05$).

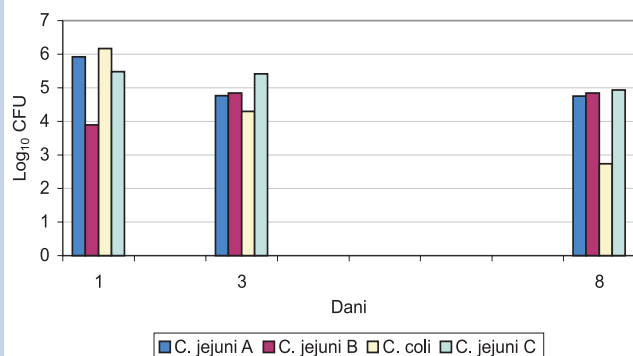
REZULTATI

BALB/c miševi su intravenski (i.v.) inficirani različitim sojevima kampilobaktera. Infekcija je praćena osam dana, a miševi su žrtvovani prvi, treći i osmi dan nakon inokulacije. Tijekom promatranog razdoblja niti jedna životinja nije uginula. Uspostava sistavne infekcije potvrđena je izolacijom kampilobaktera iz jetre i slezene inficiranih miševa.

Najveći broj bakterija iz tkiva jetre (slika 1) izoliran je prvi dan nakon infekcije kliničkim izolatom

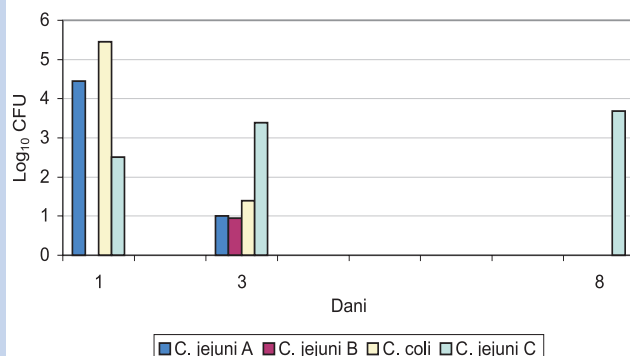
C. coli. Broj je bio statistički značajno veći nego u slučaju infekcije kliničkim izolatima *C. jejuni* A ($p=0,024$) i B ($p=0,036$), dok se statistički značajna razlika nije mogla uočiti kod infekcije izolatom iz pilećeg mesa. Treći dan po infekciji nema statistički značajne razlike u broju bakterija izoliranih iz jetre, bez obzira na soj kojim je infekcija izazvana. Osmog dana po infekciji još uvijek nije došlo do sterilnog iščišćavanja bakterija iz jetre eksperimentalnih miševa. Ipak, izolirano je značajno manje bakterija iz jetre životinja inficiranih *C. coli* u slučajevima infekcije kliničkim izolatima *C. jejuni* (soj A $p=0,014$ i soj B $p=0,034$).

Usporedba virulencije nekoliko sojeva kampilobaktera različitog podrijetla na eksperimentalnom mišjem modelu sistavne kampilobakterioze pokazala je razlike u virulenciji ovisno o vrsti i podrijetlu korištenog bakterijskog soja. Virulencija je bila najsnažnije izražena u slučaju *C. jejuni* izolata iz namirnice, ukazujući na značaj pilećeg mesa u uspostavi kampilobakterioze.



Slika 1. Broj kampilobaktera u jetri BALB/c miševa. Životinje su inficirane intravenski s $2.5 - 5 \times 10^8$ CFU kampilobaktera različitog podrijetla. Ispitivani su klinički izolati *C. jejuni* A (■), *C. jejuni* B (■), *C. coli* (■) i *C. jejuni* C (■) izolat iz namirnice. U različitim vremenskim razmacima miševi su žrtvovani i određen je broj bakterija u jetri. Rezultati su prikazani kao medijane vrijednosti grupe 3 – 5 miševa i izraženi su kao \log_{10} CFU po organu.

Figure 1. Growth curve of *C. jejuni* in the liver of BALB/c mice. The animals were infected intravenously with $2.5 - 5 \times 10^8$ CFU campylobacters from different origin. *C. jejuni* A (■), *C. jejuni* B (■) and *C. coli* (■) were clinical isolates and *C. jejuni* C (■) was food isolate. Mice were sacrificed at different time points and the number of bacteria in the liver was determined. The results are presented as the median values of bacteria recovered from groups of 3 – 5 mice and expressed as \log_{10} CFU per organ.



Slika 2. Broj kampilobaktera u slezeni BALB/c miševa. Životinje su inficirane intravenski s $2.5 - 5 \times 10^8$ CFU kampilobaktera različitog podrijetla, klinički izolati *C. jejuni* A (■), *C. jejuni* B (■), *C. coli* (■) i *C. jejuni* C (■) izolat iz namirnice. U različitim vremenskim razmacima miševi su žrtvovani i određen je broj bakterija u slezeni. Rezultati su prikazani kao medijane vrijednosti grupe 3 – 5 miševa i izraženi su kao \log_{10} CFU po organu.

Figure 2. Growth curve of *C. jejuni* in the spleen of BALB/c mice. The animals were infected intravenously with $2.5 - 5 \times 10^8$ CFU campylobacters from different origin. *C. jejuni* A (■), *C. jejuni* B (■) and *C. coli* (■) were clinical isolates and *C. jejuni* C (■) was food isolate. Mice were sacrificed at different time points and the number of bacteria in the spleen was determined. The results are presented as the median values of bacteria recovered from groups of 3 – 5 mice and expressed as \log_{10} CFU per organ.

Prateći broj bakterija u slezeni (slika 2) zamijetili smo da je početni broj izoliranih kampilobaktera prvog dana po infekciji bio najmanji u slučaju infekcije s *C. jejuni* B u usporedbi s *C. jejuni* A ($p=0,007$), *C. coli* ($p=0,017$) i *C. jejuni* pilećim izolatom ($p=0,033$). Do kraja eksperimentalnog razdoblja u slezeni je došlo do potpunog iščišćavanja svih kliničkih izolata kampilobaktera. Za razliku od njih, broj CFU *C. jejuni* C izolata iz namirnice osmog se dana po infekciji u slezeni čak povećava, te je broj bio značajno veći u usporedbi s brojem *C. jejuni* A ($p=0,044$) i *C. coli* ($p=0,049$).

RASPRAVA

Gastroenteritis uzrokovan kampilobakterima jedna je od najčešćih akutnih dijarealnih bolesti svugdje u svijetu. Budući da je poznato da je infektivna doza potrebna za izazivanje bolesti različita, a isto tako varira i težina kliničke slike, od blagih proljeva do učestalih krvavo sluzavih stolica s lošim općim stanjem bolesnika, jasno je da patogenost kampilobaktera ovisi o cijelom nizu čimbenika od strane bakterije, ali i domaćina. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi izazivaju li različiti izolati kampilobaktera sustavnu infekciju u miša, te postoje li razlike u virulenciji ispitivanih sojeva, s obzirom na broj bakterija izoliranih iz jetre i slezene inficiranih životinja. Nakon intravenzne infekcije postignuta je diseminacija bakterija u jetru i slezenu. Tijekom osam dana trajanja eksperimenta, broj izoliranih bakterija i kinetika iščišćavanja iz analiziranih organa razlikovali su se među ispitivanim bakterijskim sojevima. Kod svih ispitivanih sojeva kampilobaktera prvog dana po infekciji uočeno je značajno manje bakterija u jetri od početnog inokuluma, što se može objasniti aktivacijom nespecifičnih imunoloških mehanizama domaćina, posebice makrofaga, čiju smo izraženu aktivnost dokazali u ranijim istraživanjima¹³. Ovaj broj bakterija ostao je podjednak kod većine ispitivanih sojeva i nakon osam dana. Najviše je opao broj *C. coli* čija se virulencija u ovom pokusnom modelu pokazala najslabijom. Sterilno iščišćavanje bakterija postignuto je u slezeni u slučaju infekcije kliničkim izolatima kampilobaktera. Nasuprot tome, izolat *C. jejuni* C je i nakon osam dana izoliran u značajnom broju, upućujući na virulenciju izolata iz pilećeg mesa i

potencijalnu ulogu ove namirnice u humanoj kampilobakteriozi.

Naš se pokusni *in vivo* model pokazao vrlo dobrim za istraživanje razlika u virulenciji bakterijskih sojeva. Razlike su posebno uočljive i naglašene ukoliko se eksperimentalna sustavna infekcija i broj bakterija prate na razini slezene. Korišteni pokusni model primjenjiv je i za *in vivo* istraživanja patogeneze kampilobakterioze te praćenje imunološkog odgovora domaćina.

ZAHVALA

Rad je potpomognut sredstvima znanstveno-istraživačkog projekta broj 062-0621273-0949 koje je financiralo Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske.

LITERATURA

1. Newell DG. The ecology of *Campylobacter jejuni* in avian and human hosts and in the environment. *Int J Infect Dis* 2002;6:16-21.
2. Studahl A, Andersson Y. Risk factors for indigenous campylobacter infection: a Swedish case-control study. *Epidemiol Infect* 2000;125:269-75.
3. Allos BM. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis* 2001;32:1201-6.
4. Nachamkin I, Yang XH, Stern NJ. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:1269-73.
5. Guerry P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends Microbiol* 2007;15:456-61.
6. Hugdahl MB, Beery JT, Doyle MP. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1988;56:1560-6.
7. Abuoun M, Manning G, Cawthraw SA, Ridley A, Ahmed IH, Wassenaar TM et al. Cytolethal distending toxin (CDT)-negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. *Infect Immun* 2005;73:3053-62.
8. Ge Z, Schauer DB, Fox JG. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin. *Cell Microbiol* 2008;10:1599-607.
9. Wassenaar TM. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:466-76.
10. Kapperud G, Espeland G, Wahl E, Walde A, Herikstad H, Gustavsen S et al. Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway. *Am J Epidemiol* 2003;158:234-42.
11. Gross-Bošković A. EFSA – *Campylobacteriosis* Outran Salmonellosis! *HČJZ* 2007;3:58.
12. Vučković D, Abram M, Dorić M. Primary *Campylobacter jejuni* infection in different mice strains. *Microb Pathog* 1998;24:263-8.
13. Vučković D, Dorić M. Changes in macrophage function during chemotherapy. *Folia Biol (Praha)* 1997;43:33-8.