

Monitoring wybranych genów zjadliwości u izolatów *Campylobacter* spp. pozyskanych od koni

dr hab. inż. Marek Selwet,
prof. UPP

Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

https://doi.org/10.18388/pb.2021_384

✉ autor korespondujący: marek.selwet@gmail.com

Słowa kluczowe: *Campylobacter* spp., konie, geny wirulencji, CDT

Wykaz skrótów: CDT – cytolethal distending toxin

STRESZCZENIE

Badania dotyczyły określenia u bakterii *Campylobacter* spp. częstotliwości występowania wybranych genów wirulencji (*cadF*, *flaA*, *iam*) oraz genów odpowiedzialnych za powstawanie cytotoksyny CDT (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*). Obiekt badawczy stanowiło 100 próbek kału pobranych od ogierów niewykazujących objawów kamylobakteriozy. Obecność bakterii z rodzaju *Campylobacter* spp. stwierdzono u 25 osobników (25%). Zastosowane w badaniach techniki biologii molekularnej pozwoliły spośród próbek pozytywnych wyodrębnić następujące gatunki bakterii: *C. jejuni* (68%); *C. coli* (28%) i *C. lari* (4%). Łącznie w obrębie oznaczonych gatunków stwierdzono występowanie genów: *cadF* (n=10); *flaA* (n=5); *iam* (n=3); *cdtA* (n=1); *cdtB* (n=10) i *cdtC* (n=2). U żadnego z pozyskanych izolatów nie stwierdzono jednoczesnego występowania genów odpowiedzialnych za syntezę toksyny CDT.

WSTĘP

Występowanie biegunek u koni często jest lekceważone, są one traktowane jako skutek radykalnej zmiany diety [1]. Dopiero od niedawna zaczęto zwracać uwagę na czynniki zakaźne, które mogą być przyczyną pewnych dolegliwości u koni. Próbkę kału koni bada się głównie pod względem występowania w nich jaj i larw nicieni [2], toksyn bakterii z rodzaju *Clostridium* [3], enteropatogenów, obecności krwi i piasku. Łagodnie przebiegające biegunki często obserwowane są u źrebiąt. Wiąże się to ze zmianą mikrobioty przewodu pokarmowego źrebiąt, które zaczynają spożywać w diecie siano i ziarno. Biegunki bakteryjne mają natomiast ostrzejszy przebieg i obserwowane mogą być u osobników dorosłych. Konie stają się apatyczne, nie mają apetytu, często mają podwyższoną temperaturę, a ich odchody są wodniste o ostrym, nieprzyjemnym zapachu. Konieczne staje się w tym czasie leczenie antybiotykami, uzupełnianie utraconych płynów i elektrolitów oraz opieka weterynaryjna. Coraz większego znaczenia nabiera fakt, że za biegunki u koni odpowiedzialne są bakterie z rodzaju *Campylobacter* [4]. Termotolerancyjne bakterie z rodzaju *Campylobacter* (np. *C. jejuni*, *C. coli* i *C. lari*) stanowią część naturalnej bioty jelitowej ssaków, głównie ptaków, są również obecne w zanieczyszczonej odchodami wodzie i glebie [5].

Bliski kontakt pomiędzy chorymi zwierzętami i brak podstawowych zasad higieny może być wektorem powodującym kamylobakteriozę u zwierząt i ludzi [6]. W ostatnich latach w Europie odnotowano wzmożoną zapadalność na kamylobakteriozę wśród ludzi. W 2019 r. ogólna częstość występowania zakażeń w Unii Europejskiej wynosiła 22 682 potwierdzonych przypadków [7]. Prawie 40% zakażeń wśród ludzi było wywołane kontaktem z drobiem lub mięsem drobiowym [8]. Niepokojący wydaje się fakt, że izolaty *Campylobacter* spp. pochodzące od zwierząt i ludzi wykazują oporność na stosowane chemioterapeutyki z grupy chinolonów [9] czy antybiotyki z grupy aminoglikozydów oraz makrolidów, co stanowi ogromne zagrożenie dla zdrowia publicznego [10]. Wzmocniona antybiotykooporność jest zapewne związana z występowaniem spontanicznym mutacji punktowych genów kodujących enzymy syntetyzowane przez *Campylobacter* spp. [11]. Zróżnicowane właściwości patogenne bakterii z rodzaju *Campylobacter*, mogą być uwarunkowane dużym zróżnicowaniem genetycznym szczepów. Za patogenność tych bakterii odpowiadają geny, które warunkują np. ruchliwość, przyczepność, inwazyjność i syntezę toksyny CDT (ang. CDT-cytolethal distending toxin), kodowanej przez trzy geny: *cdtA*, *cdtB* i *cdtC*. Cytotoksyna ta odpowiedzialna jest za zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M [12]. Wśród ogromnej puli genów wirulencji u *Campylobacter* spp. wymienić można: *fla*, *cad*, *rac*, *vir*, *cia*, *pld*, *iam*. Geny *fla* (*flaA* i *flaB*) odpowiadają za ruchliwość bakterii, kodują białka rzęski (flagelinę), umożliwiającą ruch komórek bakterii. Gen *cadF* koduje białko wiążące fibronektynę enterocytów uczestniczące w adherencji. Istnieją opracowania w których czytamy, 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

Tabela 1. Zestaw starterów użytych do identyfikacji genów *cad*, *flaA*, *iam*

Startery	Sekwencja 5' → 3'	Wielkość produktu (pz)	Literatura
<i>cadF</i> -F <i>cadF</i> -R	TGGAGGGTAATTTAGATATIG CTAATACCTAAAGTTGAAAC	400	[14]
<i>flaA</i> -F <i>flaA</i> -R	GGATTTCGTATTAACACAAATGGTGC CTGTAGTAATCITAAAACATTTTG	1728	[15]
<i>iam</i> -F <i>iam</i> -R	GCGCAAATATTATCACCC TTCACGACTACTATGCGG	518	[16]

obecny) i również koduje białka odpowiedzialne za patogenność. Produkt białkowy genu *iam* jest odpowiedzialny za przyczepność i inwazyjność, występuje on częściej u *C. coli* niż u *C. jejuni* [13]. Ekspresja wyżej wymienionych genów może prowadzić do zaburzeń we wchłanianiu treści pokarmowej w jelitach.

Celem podjętych badań było:

- określenie częstotliwości występowania pałeczek z rodzaju *Campylobacter* w kale badanych koni;
- wykorzystanie techniki BAX System Real-Time PCR Assay for *Campylobacter* do molekularnego różnicowania szczepów *Campylobacter* izolowanych z próbek kału;
- identyfikacja wybranych genów zjadliwości u wyizolowanych szczepów bakterii oraz
- genów związanych z syntezą toksyny CDT. Należy zaznaczyć, że prowadzone badania są kontynuacją wcześniej prowadzonych oznaczeń w Województwie Wielkopolskim i Podkarpackim, prowadzonych przez ten sam zespół badawczy.

MATERIAŁY I METODY

Materiał do badań stanowiły próbki kału pobranego (wymazówki z podłożem transportowym) od 100 zdrowych ogierów (bez objawów biegunki) w wieku do 10 lat ze stajni położonych na terenie Województwa Dolnośląskiego. Próbki transportowano do laboratorium w temperaturze 4°C, do 6 godzin od momentu pobrania.

POZYSKANIE IZOLATÓW *CAMPYLOBACTER* SPP.

Próbki kału umieszczano w 3 ml płynnego podłoża selektywnego Karmali (Oxoid). Inkubowano w anaerostacie CampyGen (Oxoid) w temp. 42°C/24 h w atmosferze mikroaerofilnej (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂). Hodowle *Campylobacter* spp. po inkubacji zwirowano (1400 x g/15 min.), zlano supernatant, a osad dodano do 1 ml podłoża Karmali. Inokulowano 200 µl zawiesiny i rozprowadzono za pomocą głaszczki na podłożu selektywnym Karmali, inkubowano w

anaerostacie w temp. 42°C/24 h w warunkach mikroaerofilnych. W celu potwierdzenia obecności *Campylobacter* spp. wykonano test biochemiczny API Campy (BioMerieux).

RÓŻNICOWANIE GATUNKOWE SZCZEPÓW *CAMPYLOBACTER*

Do różnicowania gatunków bakterii zastosowano metodę Real-time PCR z systemem BAX System Real-Time PCR Assay for *Campylobacter* (product No. D12683449 KIT2018, Hygiena). Tą samą procedurę zastosowano w stosunku do szczepów referencyjnych: *C. jejuni* ATCC 33291, *C. coli* ATCC 33559 i *C. lari* ATCC 35221.

WYKRYWANIE GENÓW ZJADLIWOŚCI W BADANYCH SZCZEPACH BAKTERII METODĄ PCR

Wykrywania genów *cadF*, *flaA*, *iam* dokonano z zastosowaniem starterów, których sekwencje przedstawiono w tabeli 1. 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, (5 µl). Profil temperaturowy reakcji: wstępna denaturacja 94°C/1 min., następnie 30 cykli, z których każdy składał się z: denaturacji 94°C/0,5 min., przyłączania starterów 45°C/1 min., wydłużania 72°C/3 min. i 72°C/5 min. Uzyskane produkty weryfikowano metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym (dokumentacji żelu dokonano systemem VWR, Smart 3).

OZNACZANIE GENÓW *CDTA*, *CDTB*, *CDTC* ZWIĄZANYCH Z SYNTEZĄ TOKSYNY CDT

Identyfikacji genów *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* dokonano z użyciem starterów zestawionych w tabeli 2. W reakcji PCR zastosowano 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, (5 µl). Warunki temperaturowe reakcji: wstępna denaturacja 94°C/2 min., następnie 30 cykli, z których każdy składał się z: denaturacji 94°C/0,5 min., przyłączania starterów 50°C/0,5 min., wydłużania 72°C/1 min. i 72°C/5 min. Uzyskane produkty weryfikowano metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym (dokumentacji żelu dokonano systemem VWR, Smart 3).

Tabela 2. Zestaw starterów użytych do identyfikacji genów *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*

Startery	Sekwencja 5' → 3'	Wielkość produktu (pz)	Literatura
<i>cdtA</i> -F <i>cdtA</i> -R	CTA TTA CTC CTA TTA CCC CAC C AAT TTG AAC CGC TGT ATT GCT C	422	[17]
<i>cdtB</i> -F <i>cdtB</i> -R	AGG AAC TTT ACC AAG AAC AGC C GGT GGA GTA TAG GTT TGT TGT C	531	
<i>cdtC</i> -F <i>cdtC</i> -R	ACT CCT ACT GGA GAT TTG AAA G CAC AGC TGA AGT TGT TGT TGG C	339	

WYNIKI I DYSKUSJA

Na podstawie przeprowadzonych analiz mikrobiologicznych występowanie bakterii z rodzaju *Campylobacter* wykryto u 25 (n=25) ogierów spośród 100 (n=100) badanych osobników, co stanowiło 25% próbek pozytywnych. Zastosowanie technik biologii molekularnej pozwoliło na wyodrębnienie poszczególnych gatunków *Campylobacter* z pozyskanych izolatów. W 17 (n=17) przypadkach zidentyfikowano *C. jejuni*, co stanowiło 68% wszystkich próbek pozytywnych; w 7 (n=7) *C. coli* (28%) i w 1 (n=1) *C. lari* (4%). Oznaczone do poziomu gatunku izolaty posłużyły do dalszych badań nad występowaniem wybranych genów wirulencji: *cadF*, *flaA*, *iam* oraz genów *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* związanych z syntezą toksyny CDT. W tabeli 3 przedstawiono zestawienie oznaczonych genów dla *C. jejuni*, *C. coli* i *C. lari*. W przypadku *C. jejuni* u 7 izolatów stwierdzono obecność genu *cadF* (41,2%) u 3 genu *flaA* (17,6%) i u 2 genu *iam* (11,8%). Relatywnie u tego gatunku stwierdzono obecność genu *cdtA* i *cdtC* w 1 izolacie (5,9%) i gen *cdtB* u 9 izolatów (52,9%). Analizując *C. coli* gen *cadF* oznaczono u 2 izolatów (28,6%), gen *flaA* w 1 izolacie (14,3%), gen *iam* w 1 izolacie (14,3%), gen *cdtB* w jednym izolacie (14,3%), gen *cdtC* w 1 izolacie (14,3%), nie stwierdzono występowania genu *cdtA*. Jeden oznaczony izolat *C. lari* cechowała obecność genu *cadF* i genu *flaA*, nie odnotowano występowania genów: *iam*, *cdtA*, *cdtB* i *cdtC*. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że żaden z pozyskanych od ogierów izolatów nie posiadał

Tabela 3. Geny *cadF*, *flaA*, *iam* oznaczone u *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*

Izolat	Geny					
	<i>cadF</i>	<i>flaA</i>	<i>iam</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>
<i>C. jejuni</i>						
1	+				+	
2	+					+
3				+		
4		+				
5		+				+
6	+					
7	+					+
8			+			
9						+
10	+					
11						+
12		+				
13						+
14						+
15	+					
16	+					+
17			+		+	
<i>C. coli</i>						
1		+				
2	+					
3						
4					+	
5	+		+			
6						
7						+
<i>C. lari</i>						
1	+	+				
Łącznie	10	5	3	1	10	2

całej puli wybranych do analiz genów wirulencji i genów odpowiedzialnych za tworzenie toksyny CDT. Największą częstotliwość występowania w obrębie 3 oznaczonych gatunków *Campylobacter* zaobserwowano dla genów *cadF* i *cdtB* i wynosiła ona 40%.

W literaturze światowej istnieje niewiele opracowań dotyczących występowania *Campylobacter* spp. u koniowatych. Analizując wyniki badań własnych jak i opracowań innych autorów można dokonać pewnej dyskusji uzyskanych wyników. Obecność *Campylobacter* spp. u koni była odnotowywana bardzo rzadko [18]. Obecnie istnieją poglądy wskazujące na bardziej rutynowe monitorowanie częstotliwości występowania pałeczek z rodzaju *Campylobacter* jako potencjalnych czynników etiologicznych przewlekłych biegunk w tym także u koni [4]. Należy mieć na uwadze liczebność osobników w badanych populacjach koni. Moriarty i in. [19] badając populację 59 osobników koni oznaczyli tylko w 2 próbkach występowanie *Campylobacter* spp. Stosując technikę PCR, autorzy jako pierwsi na terenie Nowej Zelandii oznaczyli obecność w próbkach kału jednego izolatu termotolerancyjnego gatunku *C. jejuni*, który został pozyskany od zdrowego dorosłego osobnika (co stanowiło 3,4%). W literaturze można znaleźć duże rozbieżności dotyczące częstotliwości pozyskiwanych od koniowatych izolatów *Campylobacter* spp. Baserisalehi i in. [20] prowadząc badania w południowym Iranie oznaczyli w populacji 78 koni występowanie bakterii z rodzaju *Campylobacter* u 27% osobników. Biorąc pod uwagę zróżnicowanie gatunkowe *Campylobacter* spp. autorzy oznaczyli: 10 izolatów *C. jejuni* (47%); 5 izolatów *C. coli* (23%) i 6 izolatów oznaczonych do rodzaju (28%). Autorzy nie odnotowali występowania *C. lari*. Komba i in. [21] w Tanzanii oznaczyli obecność *Campylobacter* spp. w 5 próbkach na 8 zbadanych co stanowiło 62,5%. W 2 próbkach pozytywnych (40%) zidentyfikowano gatunek *C. jejuni*, a w jednej próbce *C. coli*. Wyniki badań własnych opublikowanych w latach wcześniejszych [22] prowadzonych na terenie Wielkopolski pozwoliły stwierdzić obecność *Campylobacter* spp. u 36 ze 100 badanych klaczy (36%). W 16 przypadkach (44%) oznaczono występowanie *C. jejuni*, nie stwierdzono obecności *C. coli*. Badaniami nie był objęty gatunek *C. lari*. W badaniach, którymi objęto 100 klaczy prymitywnej rasy koni Huculskich [23] z rejonu Województwa Podkarpackiego spośród pozyskanych izolatów oznaczono jedynie 9 jako *Campylobacter* spp. (9%). Techniki biologii molekularnej pozwoliły przypisać 8 izolatów (89%) do gatunku *C. jejuni*, nie wykryto występowania *C. coli* i *C. lari*. Nowoczesne metody molekularne np. real-time PCR mogą stanowić skuteczne i szybkie narzędzie do detekcji *C. coli* i *C. jejuni* w różnych próbkach środowiskowych [24]. Jednocześnie stosowanie technik PCR w celu detekcji genów pozwala na odróżnienie gatunków, których nie można oznaczyć metodami tradycyjnymi [25]. Wyniki badań własnych uzyskanych w latach 2019 [22] i 2020 [23] przeprowadzone na koniach nie potwierdziły występowania *C. coli* i *C. lari*. Występowanie genów wirulencji i odpowiedzialnych za powstawanie toksyny CDT oznaczano tylko dla *C. jejuni*. Gen *cadF* odpowiedzialny za połączenie enterocytów nabłonka jelit z fibronektyną, prowadząc internalizację komórek bakteryjnych [26] oznaczono u 41,2% izolatów. W latach 2019 i 2020 częstotliwość ta była wyższa i wynosiła odpowiednio 62,5% i 56%; nie wykryto obecności genów *flaA* i *iam*. Gen *flaA* jest odpo-

wiedzialny za powstawanie białka – flageliny FlaA, będącej jedną z dwóch podjednostek budującej rzęski *Campylobacter*. Gen *iam* koduje marker odpowiedzialny za inwazyjność (IAM, invasion associated marker) i przeżywalność w komórkach gospodarza [27]. Badania prowadzone na terenie Województwa Dolnośląskiego wykazały obecność genów *flaA* i *iam* u dwóch gatunków *C. jejuni* i *C. coli*.

Toksyna CDT jest jedną z najlepiej scharakteryzowanych toksyn występujących u *Campylobacter* spp. [28]. Badania własne wykazały, że spośród genów warunkujących powstawanie genotoksyny CDT najwyższą częstotliwość występowania wykazał gen *cdtB* (52,9%) oznaczony u *C. jejuni*. W wynikach badań własnych z lat 2019 i 2020 również ten gen oznaczano najczęściej, odpowiednio: 37,5% i 33% u *C. jejuni*. Geny *cdtA* i *cdtC* występowały w przypadku *C. jejuni* i *C. coli* w niewielkim procencie (5,9%) lub wcale u *C. lari*. U żadnego z pozyskanych izolatów nie oznaczono występowanie trzech genów jednocześnie. Toksyna CDT należy do nowej klasy toksyn AB₂. Budują ją trzy jednostki CdtA, CdtB i CdtC, które kodowane są odpowiednio przez geny *cdtA*, *cdtB* i *cdtC*. Za aktywność enzymatyczną w toksynie odpowiedzialna jest podjednostka CdtB, natomiast CdtA i CdtC prawdopodobnie są odpowiedzialne za rozpoznanie komórek gospodarza i transport podjednostki CdtB do wnętrza komórki [29]. Należy zaznaczyć, że powszechność badań nad występowaniem genów *cdtA*, *cdtB* i *cdtC* u koniowatych jest niewielka. Występowanie tych genów jest rozpowszechnione u ludzi i takich zwierząt gospodarskich jak drób, koty, psy lub trzoda chlewna [14].

Podsumowując należy zwrócić szczególną uwagę na wzrost częstości stosowania nowoczesnych technik molekularnych w monitorowaniu kampylobakterioz. Badaniach te powinny koncentrować się na zwiększaniu liczby analizowanych próbek, zmniejszaniu czasu oczekiwania i poniesionych kosztów analiz. Różnice w częstotliwości występowania wybranych genów u bakterii z rodzaju *Campylobacter* mogą w dużej mierze być spowodowane dobrostanem zwierząt czy też uwarunkowaniami genetycznymi lub transmisją pomiędzy różnymi gatunkami. Bardzo ważnym jednak pozostaje konieczność stałego monitorowania mikrobiomu koni na obecność *Campylobacter* spp. i **częstotliwość** występowania u tych bakterii genów odpowiedzialnych za wirulencję i toksyczność.

PIŚMIENNICTWO

- Wiśniwski E, Dąbrowska J (2002) Diagnosis of horse diseases with diarrhea. *Med Wet* 58: 934-937
- Kornas S, Skalska M, Nowosad B, Gawor J (2007) The communities of cyathostomes (*Cyathostominae*) in one year old and two year old Pure Blood Arabian mares. *Wiadomości Parazytologiczne* 53: 325-329
- Wiśniwski E, Dąbrowska J (1998) Colitis X (typhlocolitis) u koni. *Med Wet* 54: 230-235
- Hurcombe SDA, Fox JG, Kohn CW (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>
- 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>
- 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
- EFSA Journal (2021) The European Union One Health 2019 Zoonoses Report 19(2): 6406 <http://doi:10.2903/j.efsa.2021.6406>
- Vellinga A, Looek F (2002) The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related *Campylobacter enteritis*. *Emerg Infect Dis* 8: 19-22 <http://doi:10.3201/eid0801.010129>
- 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>
- Mahdavi J, Pirinccioglu N, Oldfield NJ, Carlsohn E, Stoof J, Aslam A, Self T, Cawthraw SA, Petrovska L, Colborne N, Sihlbom C, Borén T, Wooldridge KG, Ala'Aldeen DAA (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>
- Lara-Tejero M, Galan JE (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>
- Ge Z, Schauer DB, Fox JG (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>
- Konkel M, Gray SA, Kim BJ, Gravis SG, 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
- Nachamkin I, Bohachic K, Patton CM (1993) Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 31: 1531-1536
- Carvalho AC, Ruiz-Palacios GM, Ramos-Cervantes P, Cervantes LE, Jiang X, Pickering LK (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>
- Carvalho AF, Silva DM, Azevedo SS, Piatti RM, Genovez ME, 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>
- Hald B, Skovgård H, Bang DD, Pedersen K, Dybdahl J, Jespersen JB, Madsen M (2014) Flies and *Campylobacter* infection of broiler flocks. *Emerg Infect Dis* 10: 1490-1492 <http://doi:10.3201/eid1008.040129>
- Moriarty EM, Downing M, Bellamy J, Gilpin BJ (2015) Concentrations of faecal coliforms, *Escherichia coli*, enterococci and *Campylobacter* spp. in equine faeces. *New Zeland Vet J* 63: 104-109; <http://doi:10.1080/00480169.2014.952789>
- Baserisalehi M, Bahador N, Kapadnis BP (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>
- Komba EVG, Mdegela RH, Msoffe PLM, Matowo Makori DE, 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
- Selwet M, Galbas M (2019) Assessment of the occurrence of selected virulence genes, and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolates collected from horses. *Wiad zootech R LVII* 3: 55-62
- Selwet M (2020) An Assessment of the Occurrence of Selected Virulence and Antibiotic Resistance Genes in Bacteria of the Genus *Campylobacter* Collected from Horses. *Open Vet Sci* 1: 15-19 <https://doi.org/10.1515/ovs-2020-0100>
- Leblanc-Maridor M, Beaudeau F, Seegers H, Denis M, Belloc C (2011) Rapid identification and quantification of *Campylobacter coli* and *Cam-*

Campylobacter jejuni by real-time PCR in pure cultures and in complex samples. BMC Microbiol 11: 113

25. Boer P, Rahaoui H, Leer RJ, Montijn RC, van der Vossen JMBM (2015) Real-time PCR detection of *Campylobacter* spp.: A comparison to classic culturing and enrichment. Food Microbiol 51: 96-100 [https://doi:10.1016/j.fm.2015.05.006](https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.05.006)
26. Szewczyk R, Wieczorek K, Osek J (2011) Molekularne mechanizmy chorobotwórczości termotolerancyjnych *Campylobacter*. Med Weter 67: 725-732

27. Rokosz-Chudziak N, Rastawicki W (2014) Selected mechanisms of pathogenicity of *Campylobacter jejuni*. Med Dośw Mikrobiol 66: 47-58
28. Wysok B, Wojtacka J, Wiszniewska-Łaszczych A, Sztejn J (2020) Antimicrobial Resistance and Virulence Properties of *Campylobacter* Spp. Originating from Domestic Geese in Poland. Animals 10, 742 [https://doi:10.3390/ani10040742](https://doi.org/10.3390/ani10040742)
29. Kobińska P, Wyszynska A, Jagusztyn-Krynicka EK (2013) Charakterystyka genotoksyn CDT (cytolethal distending toxin). Post Microbiol 52: 315-324

Monitoring of selected virulence genes in *Campylobacter* spp. isolates obtained from horses

Marek Selwet

Department of General and Environmental Microbiology, Poznań University of Life Sciences

Corresponding author: marek.selwet@gmail.com

Keywords: *Campylobacter* spp., horses, virulence genes, CDT

ABSTRACT

The research concerned the determination of the frequency of occurrence of selected virulence genes (*cadF*, *flaA*, *iam*) and genes responsible for the formation of the CDT cytotoxin (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*) in *Campylobacter* spp. The research object consisted of 100 faecal samples collected from stallions showing no symptoms of campylobacteriosis. The presence of bacteria of the genus *Campylobacter* spp. was found in 25 individuals (25%). The molecular biology techniques used in the research allowed us to distinguish the following species from the positive samples: *C. jejuni* (68%); *C. coli* (28%) and *C. lari* (4%). In total, the following genes were found within the marked species: *cadF* (n=10); *flaA* (n=5); *iam* (n=3); *cdtA* (n=1); *cdtB* (n=10) and *cdtC* (n=2). In none of the obtained isolates, the simultaneous presence of genes responsible for the synthesis of CDT toxin was found.

