MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2009, 61: 47 - 61

Sebastian Wardak, Marek Jagielski[1]

OCENA PRZYDATNOŚCI WYBRANYCH METOD GENOTYPOWYCH I FENOTYPOWYCH DO WEWNĄTRZGATUNKOWEGO RÓŻNICOWANIA PAŁECZEK *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ORAZ *CAMPYLOBACTER COLI* IZOLOWANYCH OD LUDZI
I. PRZYDATNOŚĆ BIOTYPOWANIA, OKREŚLANIA PROFILU LEKOOPORNOŚCI I PROFILU PLAZMIDOWEGO ORAZ PLAZMIDOWEGO WZORU RESTRYKCYJNEGO

Zakład Bakteriologii NIZP-PZH w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. *M. Jagielski*

Przeprowadzono ocenę przydatności biotypowania, określenia profili lekooporności oraz określania plazmidowego profilu i plazmidowego wzoru restrykcyjnego do różnicowania izolatów pałeczek *C. jejuni i C. coli*. Wykazano, że powyższe metody charakteryzowały się niewielką przydatnością do wewnątrzgatunkowego różnicowania izolatów tych pałeczek wyosobnionych od ludzi w przypadku sporadycznych zakażeń tymi drobnoustrojami. Stwierdzono wysoki odsetek izolatów badanych drobnoustrojów opornych na ciprofloksacynę i kwas nalidyksowy.

Bakterie z rodzaju *Campylobacter* to Gram-ujemne pałeczki należące do typu *Proteobacteria,* klasy *Epsilonproteobacteria,* rodziny *Campylobacteriaceae* (17). Pałeczki *Campylobacter* są mikroorganizmami szeroko rozpowszechnionymi w środowisku. Drobnoustroje te stanowią naturalną florę jelitową zarówno zwierząt towarzyszących człowiekowi (psy i koty), hodowlanych (drób, świnie, bydło) jak i wolno żyjących (9). Jako etiologiczny czynnik biegunki u ludzi najczęściej izolowane są pałeczki *Campylobacter* należące do dwóch gatunków: *C. jejuni* oraz *C. coli.* Do zakażenia człowieka dochodzi głównie w wyniku spożycia niedopieczonego bądź niedogotowanego mięsa (zwłaszcza drobiowego) (9, 25). Objawy zakażenia są bardzo różnorodne, choć najczęściej występuje stan zapalny jelit z towarzyszącą biegunką z domieszką krwi i śluzu, może wystąpić także gorączka, nudności lub wymioty oraz ból brzucha w okolicy pępkowej (15). Polska należy do krajów Unii Europejskiej z najsłabiej poznaną sytuacją epidemiologiczną dotyczącą zakażeń pałeczkami

1 Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007-2008 jako projekt badawczy nr NN404253233

Campylobacter (3). Spowodowane było to przez wiele lat brakiem rutynowych badań w tym kierunku. Sytuacja ta zaczęła się zmieniać po roku 2004 kiedy to w NIZP-PZH oraz w kilku laboratoriach mikrobiologicznych stacji sanitarno – epidemiologicznych podjęto tego typu badania. Nieliczne krajowe badania nad epidemiologią zakażeń pałeczkami *Campylobacter* wykazują na wysoki udział tych drobnoustrojów w etiologii biegunki u ludzi chorych w Polsce (20, 22, 26). Poprawa laboratoryjnej diagnostyki kampylobakteriozy w Polsce pociąga za sobą konieczność opracowania metod weryfikacji rozpoznawanych w tych placówkach drobnoustrojów, określania pokrewieństwa badanych izolatów w przypadku dochodzenia epidemiologicznego oraz podjęcie prac zmierzających do wewnątrzgatunkowego różnicowania tych patogenów.

Celem podjętych badań była ocena przydatności wybranych metod fenotypowych i genotypowych do wewnątrzgatunkowego różnicowania pałeczek *C. jejuni* oraz *C. coli* izolowanych od ludzi w Polsce ze sporadycznych przypadków kampylobakteriozy jak i z ognisk zakażenia pokarmowego. W pierwszej części pracy przedstawiono różnicowanie badanych izolatów przy użyciu metod fenotypowych takich jak biotypowanie i określenie profilu lekooporności oraz określania plazmidowego profilu i plazmidowego wzoru restrykcyjnego (Restriction Enzyme Analysis of Plasmid - REAP).

MATERIAŁ I METODY

Przedmiot badań oraz dane kliniczne osób od których izolowano pałeczki *Campylobacter*. Przedmiot badań stanowiło 128 izolatów pałeczek *C. jejuni* oraz 17 izolatów pałeczek *C. coli* wyosobnionych od ludzi ze sporadycznych przypadków zakażeń na terenie kraju. Ponadto badano 7 izolatów pałeczek *C. jejuni* z dwóch ognisk zatrucia pokarmowego w Bielsku-Białej i jednego ogniska w Warszawie oraz 3 izolaty pałeczek *C. coli* wyosobnionych od ludzi z ogniska zakażenia pokarmowego w Bielsku-Białej. W badaniach wykorzystano izolaty pałeczek *Campylobacter* wyhodowane w latach 2006-2007 zarówno w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH jak i innych laboratoriach mikrobiologicznych na terenie kraju (Szpital SPZOZ w Nowej Soli oraz mikrobiologiczne laboratoria stacji sanitarno – epidemiologicznych: PSSE Bielsko-Biała, WSSE Poznań, WSSE Kraków, WSSE Olsztyn, WSSE Rzeszów). Większość bo 110 (71%) badanych izolatów pałeczek *C. jejuni* oraz *C. coli* wyosobniono od 107 osób w roku 2006, pozostałe 45 (29%) izolatów wyhodowano od 41 osób w 2007 roku. Na 155 izolatów pałeczek *Campylobacter* będących przedmiotem pracy, wyizolowanych od 148 osób od stycznia 2006 do września 2007 roku, 70 (45,2%) pochodziło od osób płci żeńskiej, a 81 (52,2%) od osób płci męskiej. W czterech przypadkach (2,6%) nie udało się uzyskać informacji o płci chorego. Pałeczki *Campylobacter* najczęściej izolowano od dzieci w wieku do 4 lat - 70,3% (104/148), w tym 79% (82/104) pochodziło od dzieci do 2 roku życia. W sześciu przypadkach (4,1%) nie udało się uzyskać informacji o wieku chorego. Głównym objawem zakażenia była biegunka (89,7%), często z domieszką krwi w kale (42,6%), wymioty (23,9%) oraz bóle brzucha (21,9%). Bezobjawowe zakażenie stwierdzono u 5 (3,4%) pacjentów, w tym w dwu przypadkach pałeczki *Campylobacter* wyizolowano od zdrowych osób z „otoczenia chorego", a w dwu następnych przypadkach drobnoustroje te wyizolowano od zdrowych osób po przebytej wcześniej objawowej kampylobakteriozie („ozdrowieniec"). Zaobserwowano także wielokrotne zakażenia

pałeczkami *Campylobacter*. Od dwojga chorych wyosobniono dwukrotnie izolaty pałeczek *C. jejuni* a od jednego dziecka czterokrotnie wyosobniono pałeczki *Campylobacter* w ciągu badanego okresu. W przypadku 9 pacjentów (6,1%) nie udało się uzyskać informacji o objawach klinicznych przebytej kampylobakteriozy.

Izolacja genomowego DNA. Preparaty DNA badanych izolatów pałeczek *C. jejuni* oraz *C. coli* przygotowano według opisanej wcześniej procedury (21).

Reidentyfikacja izolatów pałeczek *C. jejuni oraz C. coli*. Wszystkie nadsyłane do badań izolaty pałeczek *C. jejuni i C. coli* były reidentyfikowane. Podstawą identyfikacji było stwierdzenie wzrostu w warunkach mikroaerofilnych (Campy Gen OXOID), zdolność wytwarzania katalazy i oksydazy, zdolność ruchu oraz wynik testu na hydrolizę octanu indoksylu i hydrolizę hipuranu sodu. Przynależność do określonego gatunku izolatów pałeczek *Campylobacter* stanowiących przedmiot badań została potwierdzona w reakcji PCR. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z wytycznymi zaproponowanymi przez WHO GSS, zgodnie z metodyką opisaną przez *Vandamme* i wsp. (18). Jako kontrolę użyto referencyjnych szczepów *C. jejuni* ATCC 33560 oraz *C. coli* ATTC 33559.

Określenie biotypu badanych izolatów pałeczek *C. jejuni* oraz *C. coli*. Przynależność badanych izolatów pałeczek *Campylobacter* do określonego biotypu przeprowadzono zgodnie z zaleceniami *Lior* i wsp. (8). Zastosowano następujące testy biochemiczne: test wykrywający zdolność badanego izolatu do hydrolizy DNA, zdolność do hydrolizy hipuranu sodu oraz zdolność do wytwarzania H_2S.

Oznaczanie profilu lekooporności izolatów pałeczek *C. jejuni* oraz *C. coli*. Oznaczanie wrażliwości 135 szczepów *C. jejuni* oraz 20 szczepów *C. coli* na 6 antybiotyków i chemioterapeutyków wykonano na podłożu agarowym Mueller-Hintona z 5% krwi baraniej (Oxoid, Wielka Brytania) zgodnie z zaleceniami Clinical and Laboratory Standards Institute (dawniej NCCLS) (2) oraz firmy AB Biodisk (Szwecja). Stosowano paski E-testu® (AB Biodisk) z następującymi antybiotykami i chemioterapeutykami: erytromycyną, ampicyliną, tetracykliną, gentamicyną, kwasem nalidyksowym oraz ciprofloksacyną. Za najmniejsze stężenie hamujące wzrost pałeczek *Campylobacter* przyjmowano stężenie chemioterapeutyku, przy którym nie obserwowano już wzrostu bakterii. W odniesieniu do ciprofloksacyny, erytromycyny i tetracykliny interpretacji wyników dokonywano zgodnie z zaleceniami CLSI. Natomiast wyniki oceny wrażliwości badanych bakterii na kwas nalidyksowy, ampicylinę i gentamicynę dokonywano stosując kryteria CLSI dla pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, z powodu braku takich wytycznych dla pałeczek z rodzaju *Campylobacter*.

Izolacja plazmidowego DNA. Plazmidowe DNA izolowano z bakteryjnej masy komórkowej metodą alkalicznej lizy zgodnie z metodyką podaną przez innych badaczy (11). Następnie 12 µl przygotowanego preparatu DNA przeznaczano do elektroforetycznego rozdziału w żelu agarozowym w celu wykrycia obecności plazmidów, a pozostałe 8 µl przeznaczano do analizy restrykcyjnej. Preparaty plazmidowego DNA poddawano elektroforezie w 0,7% żelu agarozowym w buforze TAE. Rozdział prowadzono w komorze horyzontalnej w temperaturze około 12-16 ºC przez 4 godziny, przy różnicy potencjałów pomiędzy elektrodami wynoszącej 5 V/cm. Jako wzorzec wielkości stosowano przygotowany we własnym zakresie preparat plazmidowego DNA wyosobnionego ze wzorcowego szczepu *C. jejuni* 81-176. Ponadto używano kolistego wzorca wielkości Supercoiled DNA Ladder, 2-10 kb firmy Promega. Po zakończeniu elektroforezy żele przenoszono do wodnego roztworu

bromku etydyny o stężeniu 0,5 µg/ml na okres 20 min. Następnie żel poddawano płukaniu w wodzie destylowanej przez 15 min. Wynik elektroforezy dokumentowano przy użyciu programu GelScan (Kucharczyk T.E.). Przybliżone wielkości plazmidów obliczono w oparciu o restrykcyjną analizę plazmidowego DNA przy użyciu enzymu BglII z wykorzystaniem programu Gene Profiler 4.05 firmy Scananalytics, inc. W przypadku gdy izolat zawierał więcej niż jeden plazmid przybliżoną wielkość plazmidów obliczano przez porównanie z: plazmidami o obliczonej wcześniej wielkości, plazmidami wyizolowanymi z komórek wzorcowego szczepu *C. jejuni* 81-176 oraz markerem kolistym Supercoiled DNA Ladder, 2-10 kb firmy Promega. Plazmidy o wielkości powyżej 15 kpz nazywano plazmidami – „dużymi" a plazmidy o wielkości poniżej 15 kpz nazywano plazmidami – „małymi".

Restrykcyjna analiza plazmidowego DNA (Restriction Enzyme Analysis of Plasmid - REAP). Poza plazmidami wyosobnionymi z komórek badanych w obecnej pracy izolatów, trawieniu enzymem restrykcyjnym (endonukleazą) Bgl II poddano także plazmid wyosobniony z komórek izolatu *C. jejuni* 23/05 posiadających zdolność do koniugacji. Trawienie plazmidowego DNA enzymem BglII przeprowadzano w mieszaninie reakcyjnej o objętości 20 µl w temp. 37°C przez okres jednej godziny. W tym celu do 13,6 µl jałowej wody dejonizowanej dodawano 4 µl preparatu plazmidowego DNA otrzymanego według procedury opisanej uprzednio oraz 2 µl buforu dostarczonego przez producenta enzymu restrykcyjnego. Po wymieszaniu dodawano 0,4 µl enzymu BglII o stężeniu 10j / µl i ponownie mieszano. Mieszaninę inkubowano przez 16-18 godzin. w temp. 37°C. Elektroforezę prowadzono w 1% żelu agarozowym w buforze TAE w temp. około 12 - 16°C przez 4 godziny w horyzontalnej komorze przy różnicy potencjałów pomiędzy elektrodami wynoszącej 5V/cm. W celu określenia wielkości fragmentów DNA stosowano wzorzec wielkości przygotowany przez firmę SIGMA (DNA bakteriofaga Lambda trawione enzymem Hind III) oraz wzorzec wielkości 1 kb DNA Ladder, ready-to-use firmy Fermentas (Litwa). Po zakończeniu elektroforezy żele przenoszono na 15 min. do wodnego roztworu bromku etydyny o stężeniu 0,5 µg/ml, a następnie płukano w wodzie destylowanej przez 15 min. Wyniki elektroforezy dokumentowano przy użyciu programu GelScan wersja v.1.13 firmy Kucharczyk T.E. (Polska). Przybliżoną wielkość plazmidu obliczono przy użyciu programu Gene Profiler 4.05 firmy Scananalytics, inc. Analizę elektroforegramów przeprowadzono przy użyciu oprogramowania komputerowego GelCompar II Software v. 5.0 firmy Applied Maths, (Belgia).

WYNIKI

Wyniki reidentyfikacji izolatów pałeczek *C. jejuni* oraz *C. coli*. Wyniki badania właściwości biochemicznych umożliwiły zaliczenie 134 izolatów pałeczek *Campylobacter* do gatunku *C. jejuni* oraz 21 izolatów do gatunku *C. coli*. Posługując się techniką Multiplex PCR wszystkie izolaty, poza jednym, zostały zaliczone do gatunku *C. jejuni* lub *C. coli* zgodnie z identyfikacją biochemiczną. Natomiast w wyniku badań Multiplex PCR izolat początkowo określony na podstawie właściwości biochemicznych jako pałeczka *C. coli*, uznano ostatecznie za hipurano-ujemny izolat *C. jejuni.*

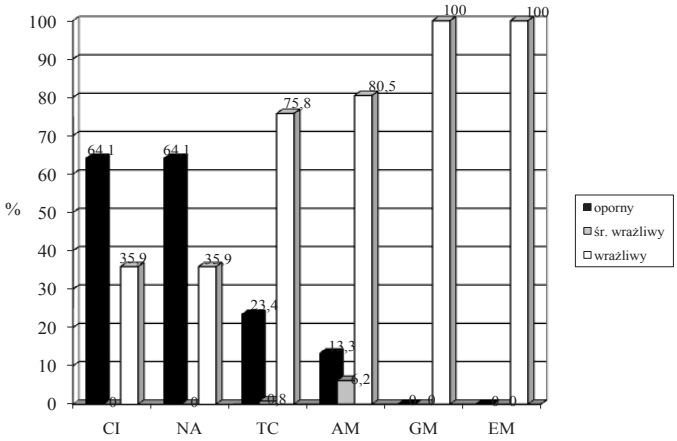
Wyniki biotypowania izolatów pałeczek *C. jejuni* i *C. coli* zgodnie ze schematem Lior. Większość badanych izolatów pałeczek *C. jejuni* (77/128) zaliczono

do biotypu I (60,2%), biotyp II reprezentowany był przez 49 izolatów *C. jejuni* (38,2%) (Tabela 1). Nie wykryto biotypu IV, natomiast do biotypu III zaliczono tylko jeden izolat *C. jejuni* (0,8%). Hipurano-ujemny izolat pałeczek *C. jejuni* nie został przyporządkowany do żadnego z omawianych biotypów (0,8%). W przypadku izolatów pałeczek *C. coli* także dominował biotyp I, do którego zaliczono 12 izolatów (70,6%). Natomiast do biotypu II zaliczono 5 izolatów (29,4%). Wartość indeksu różnicowania (D) metody biotypowania dla izolatów pałeczek *C. jejuni* wyniosła 0,505. Poszczególne izolaty pałeczek *Campylobacter* pochodzące z czterech udokumentowanych ognisk zakażenia pokarmowego zaliczono do tego samego biotypu w obrębie ogniska.

Tabela I. Wyniki biotypowania 128 izolatów pałeczek *C. jejuni* oraz 17 izolatów pałeczek *C. coli*

Biotyp	Liczba izolatów (%) *C. jejuni*	Liczba izolatów (%) *C. coli*
I	77 (60,2%)	12 (70,6%)
II	49 (38,2%)	5 (29,4%)
III	1 (0,8%)	0
IV	0	0
Nie podlegający typowaniu	1 (0,8%)	0

Wyniki określenia profilu lekooporności badanych izolatów pałeczek *C. jejuni* i *C. coli*. Spośród 128 badanych izolatów pałeczek *C. jejuni* większość (64,1%) wykazywało oporność na ciprofloksacynę i na kwas nalidyksowy (Ryc.1). Natomiast 23,4% (30/128) izolatów było opornych na tetracyklinę, 13,3% (17/128) na ampicylinę, a odpowiednio 0,8% (1/128) oraz 6,2% (8/128) było średnio wrażliwych na te antybiotyki. Analiza wyników oznaczeń wrażliwości 128 izolatów pałeczek *C. jejuni* wskazuje, że największe zróżnicowanie wartość MIC stwierdzono w przypadku ampicyliny i tetracykliny. W przy-



Ryc. 1. Wrażliwość badanych izolatów *C. jejuni* (n=128) na wybrane antybiotyki i chemioterapeutyki z wyłączeniem izolatów wyosobnionych z ognisk. Objaśnienia: CI – ciprofloksacyna, NA – kwas nalidyksowy, TC – tetracyklina, AM – ampicylina, GM – gentamicyna, EM – erytromycyna

padku tetracykliny oznaczona wartość MIC tego antybiotyku wynosiła od 0,047 µg/ml do ponad 256 µg/ml. MIC tetracykliny dla 77 (79,4%) spośród 97 izolatów pałeczek *C. jejuni* wrażliwych na ten antybiotyk mieściło się w granicach 0,064 – 0,19 µg/ml. Natomiast w przypadku ampicyliny oznaczona wartość MIC tego antybiotyku wynosiła od 0,38 µg/ml do ponad 256 µg/ml. MIC ampicyliny dla 90 (87,4%) spośród 103 izolatów pałeczek *C. jejuni* wrażliwych na ten antybiotyk mieściło się w granicach 0,75 – 4,0 µg/ml. Oznaczona wartość MIC ciprofloksacyny dla 37 (80,4%) spośród 46 wrażliwych na ten chemioterapeutyk izolatów pałeczek *C. jejuni* izolatów wahała się od 0,064 µg/ml do 0,125 µg/ml. Natomiast dla 80 (97,6%) spośród 82 izolatów pałeczek *C. jejuni* zaliczonych do opornych na ten chemioterapeutyk oznaczona wartość MIC ciprofloksacyny wynosiła powyżej 32 µg/ml. Wartość MIC kwasu nalidyksowego dla 46 izolatów wrażliwych na ten chemioterapeutyk najczęściej, wynosiła od 1,0 do 1,5 µg/ml (29 izolatów - 63%), natomiast w przypadku 74 (90,2%) spośród 82 izolatów opornych, wynosiła powyżej 256 µg/ml. Wszystkie badane izolaty pałeczek *C. jejuni* oporne na ciprofloksacynę wykazywały także oporność na kwas nalidyksowy. Przeprowadzone badania wykazały, że wszystkie izolaty pałeczek *C. jejuni* były wrażliwe na gentamicynę i erytromycynę a oznaczone wartości MIC gentamicyny dla 122 (95,3%) izolatów pałeczek *C. jejuni* i wartości MIC erytromycyny dla 119 (92,9%) izolatów mieściły się w granicach od 0,38 do 1,5 µg/ml.

Analiza wyników oznaczeń wrażliwości 17 izolatów pałeczek *C. coli* na użyte w badaniach antybiotyki i chemioterapeutyki wskazuje, na podobny jak w przypadku izolatów pałeczek *C. jejuni* rozkład wartości MIC poszczególnych antybiotyków i chemioterapeutyków. Tak jak w przypadku izolatów pałeczek *C. jejuni,* wszystkie badane izolaty pałeczek *C. coli* oporne na ciprofloksacynę (15 izolatów) wykazywały także oporność na kwas nalidyksowy. Oznaczona wartość MIC obu tych chemioterapeutyków dla 15 (88, 2 %) spośród 17 izolatów pałeczek *C. coli* wynosiła odpowiednio powyżej 32 i 256 µg/ml. Wszystkie badane izolaty pałeczek *C. coli* wykazywały także wrażliwość na gentamicynę i erytromycynę, natomiast trzy i jeden izolat tego gatunku wykazywało oporność odpowiednio na ampicylinę i tetracyklinę.

Izolaty pałeczek *Campylobacter* z poszczególnych ognisk charakteryzowały się takimi samymi lub podobnymi wzorami lekooporności w zależności od ogniska. Ponadto izolaty te charakteryzowały się zbliżonymi wartościami MIC w obrębie poszczególnych ognisk. Oznaczone wartości MIC użytych w badaniach chemioterapeutyków i antybiotyków pozwoliły na zaliczenie 128 izolatów pałeczek *C. jejuni* oraz 17 izolatów pałeczek *C. coli* do 12 grup (profili) ze względu na ich lekooporność (Tabela II). Wyróżniony jako 1. profil oporności gromadził izolaty wrażliwe na wszystkie użyte w badaniach antybiotyki i chemioterapeutyki. Zaliczono do niego 37 (28,9%) izolatów pałeczek *C. jejuni* i 1 (5,9%) izolat pałeczek *C. coli*. Profil 12 obejmował tzw. izolaty wielolekooporne. Zaliczono do niego 6 (4,7%) izolatów pałeczek *C. jejuni* i 1 (5,9%) izolat pałeczek *C. coli* wykazujący oporność na antybiotyki z trzech różnych grup (ciprofloksacynę, kwas nalidyksowy, ampicylinę i tetracyklinę). Obliczona wartość indeksu różnicowania (D) izolatów pałeczek *C. jejuni* na podstawie wyznaczonych profili lekooporności wyniosła 0,764.

Wyniki określenia plazmidowego profilu badanych izolatów pałeczek *C. jejuni* i *C. coli*. Poszukiwanie plazmidowego DNA metodą alkalicznej lizy pozwoliło na wykrycie obecności plazmidów o wielkości od około 3,3 do około 89 kpz w komórkach 47 (36,7%) izolatów pałeczek *C. jejuni* oraz 3 (17,6%) izolatów pałeczek *C. coli* (Tabela III).

Tabela II. Wzory (profile) oporności 128 badanych izolatów pałeczek *C. jejuni* oraz 17 izolatów pałeczek *C. coli*

Profil	Liczba antybiotyków/ chemioterapeutyków	Wzór lekooporności	Liczba (%) izolatów	
			C. jejuni	*C. coli*
1	0	Wrażliwe na wszystkie badane antybiotyki/chemioterapeutyki	37 (28,9)	1 (5,9)
2	1	AM^R	5 (3,9)	0
3	1	AM^I	3 (2,3)	2 (11,8)
4	1	TC^R	1 (0,8)	0
5	2	$CIP^R + NA^R$	46 (35,9)	11 (64,7)
6	3	$CIP^R + NA^R + AM^R$	6 (4,7)	0
7	3	$CIP^R + NA^R + AM^I$	1 (0,8)	1 (5,9)
8	3	$CIP^R + NA^R + TC^R$	19 (14,8)	0
9	3	$CIP^R + NA^R + TC^I$	0	1 (5,9)
10	4	$CIP^R + NA^R + AM^I + TC^I$	1 (0,8)	0
11	4	$CIP^R + NA^R + AM^I + TC^R$	3 (2,3)	0
12	4	$CIP^R + NA^R + AM^R + TC^R$	6 (4,7)	1 (5,9)

Objaśnienia: CI –ciprofloksacyna, NA – kwas nalidyksowy, TC – tetracyklina, AM – ampicylina, GM – gentamicyna, EM – erytromycyna, R - oporność, I – średnia wrażliwość na dany antybiotyk/ chemioterapeutyk

Wśród 47 izolatów pałeczek *C. jejuni* 44 izolaty posiadały tzw. „duży" plazmid o wielkość od około 15 do około 89 kpz. W tej grupie 26 izolatów posiadało plazmid o wielkości od około 37 do około 48 kpz, z czego u większości bo aż u 20 wykryto plazmid o wielkości około 45 kpz. Plazmidy wykryte w komórkach izolatów *C. coli* należały do tzw. „dużych" plazmidów o wielkości około 25, 29 i 72 kpz. Na podstawie liczby plazmidów i ich wielkości zaliczono badane izolaty pałeczek *C. jejuni* i *C. coli* do odpowiednio 28 i 4 plazmidowych profili (Tabela III). Do profilu 1. zaliczono izolaty nie posiadające plazmidów w tym 81 (63,3%) izolatów pałeczek *C. jejuni* i 14 (82,4%) izolatów pałeczek *C. coli*. Pojedynczy „duży" plazmid wykryto w komórkach 31 (24,2%) izolatów pałeczek *C. jejuni* i 3 (17,6%) izolatach pałeczek *C. coli*. Natomiast „mały" plazmid w komórkach 2 (1,6%) izolatów pałeczek *C. jejuni*. Dwa i 3 plazmidy wykryto w komórkach odpowiednio 11 i 3 izolatów pałeczek *C. jejuni.* Poszczególne izolaty pałeczek *Campylobacter* pochodzące z czterech udokumentowanych ognisk zakażenia pokarmowego nie posiadały plazmidów. Obliczona wartość indeksu różnicowania (D) izolatów pałeczek *C. jejuni* na podstawie wyznaczonych plazmidowych profili wyniosła 0,591. Wśród 30 izolatów pałeczek *C. jejuni* opornych na tetracyklinę, 28 izolatów wykazywało obecność plazmidów. Stwierdzono występowanie istotnego związku pomiędzy opornością na tetracyklinę izolatów pałeczek *Campylobacter* a obecnością plazmidów w ich komórkach ($p<0,0001$).

Wyniki różnicowania izolatów pałeczek *C. jejuni* i *C. coli* na podstawie plazmidowych wzorów restrykcyjnych (REAP). Wykryte metodą alkalicznej lizy tzw. „duże" plazmidy, występujące pojedynczo w komórkach 31 izolatów pałeczek *C. jejuni* i 3 izolatów pałeczek *C. coli* poddano trawieniu endonukleazą BglII, a następnie elektroforezie w żelu agarozowym. Wszystkie uzyskane restrykcyjne wzory plazmidów (REAP) przyporządkowano do odpowiednich profili. Na rycinie 2 przedstawiono

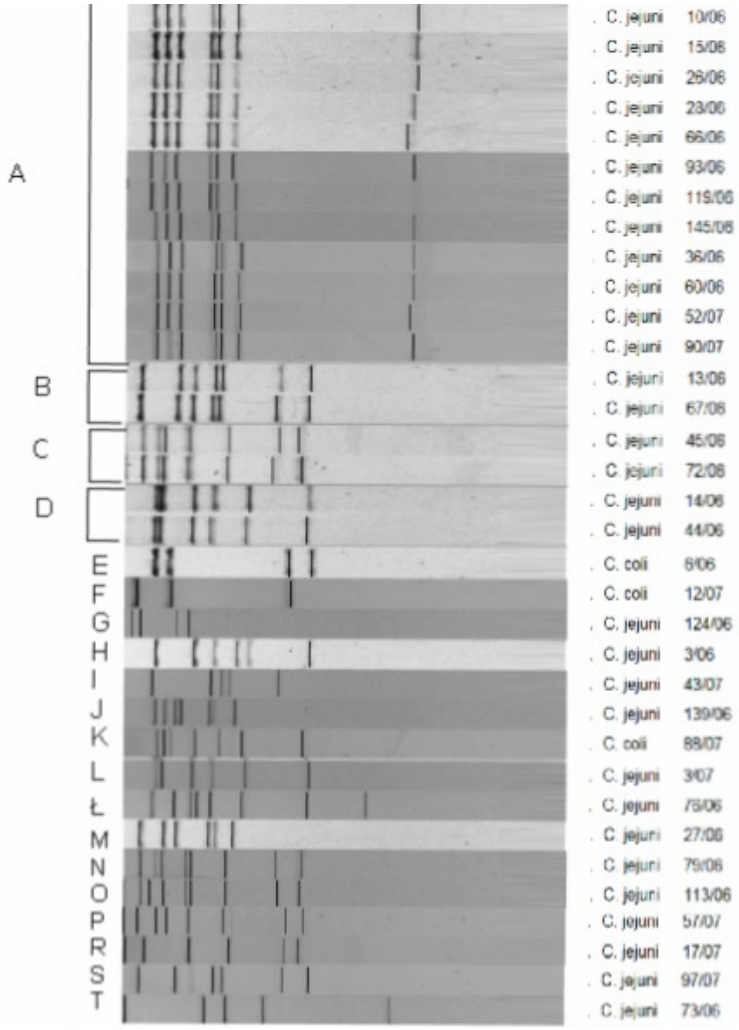
Tabela III. Plazmidowe profile izolatów pałeczek *C. jejuni* i *C. coli*

C. jejuni			
Profil	Liczba wykrytych plazmidów	Wielkość plazmidów	Liczba (%) izolatów
1	0	0	81 (63,3)
2	1	~3,7	1 (0,8)
3	1	~4,2	1 (0,8)
4	1	31*	1 (0,8)
5	1	33*	1 (0,8)
6	1	37*	2 (1,6)
7	1	38*	3 (2,3)
8	1	45*	13 (10,2)
9	1	46*	2 (1,6)
10	1	48*	1 (0,8)
11	1	52*	1 (0,8)
12	1	60*	1 (0,8)
13	1	76*	1 (0,8)
14	1	78*	1 (0,8)
15	1	82*	1 (0,8)
16	1	86*	2 (1,6)
17	1	89*	1 (0,8)
18	2	~3,3; ~45	1 (0,8)
19	2	~3,9; ~45	3 (2,3)
20	2	~3,7; ~86	1 (0,8)
21	2	~4,3; ~76	1 (0,8)
22	2	~22; ~31	1 (0,8)
23	2	~29; ~45	1 (0,8)
24	2	~45; >45	1 (0,8)
25	2	>45; >45	2 (1,6)
26	3	~15; ~29; ~80	1 (0,8)
27	3	~4,6; ~45; >45	1 (0,8)
28	3	~5,9; ~6,5; ~13,7	1 (0,8)
C. coli			
1	0	0	14 (82,4)
2	1	25*	1(5,9)
3	1	29*	1 (5,9)
4	1	72*	1 (5,9)

Objaśnienia: ~ symbol oznacza, że wielkość plazmidowego DNA została obliczona w przybliżeniu na podstawie porównania do wielkości wzorca, * symbol oznacza że wielkość plazmidowego DNA została obliczona w wyniku dodania wielkości fragmentów DNA uzyskanych w trawieniu enzymem restrykcyjnym plazmidowego DNA

zbiorczo, posługując się oprogramowaniem Gel Compar II Software v. 5.0 (Applied Maths, Belgia), profile REAP, które oznaczono literami alfabetu od A do T. W wyniku analizy uzyskanych profili REAP stwierdzono, że 12 izolatów *C. jejuni*, charakteryzowało się obecnością plazmidów należącego do jednego profilu – A, natomiast po dwa izolaty pałeczek *C. jejuni*

charakteryzowało się obecnością plazmidów należących do profili oznaczonych literami B, C i D (Ryc. 2). Pozostałe izolaty pałeczek *C. jejuni* i *C. coli* charakteryzowały się obecnością plazmidów zaliczonych do unikatowych profili REAP i oznaczonych kolejno literami od E do T. Plazmidowe DNA pałeczek *C. jejuni* PZH 93/06 zaliczone do profilu REAP - A porównano z profilem REAP plazmidu wyosobnionego z komórek izolatu *C. jejuni* 23/05 posiadającego zdolność do koniugacji (24). Stwierdzono, że porównywane wzory REAP są nierozróżnialne i należą do jednego profilu -A. Obliczona wartość indeksu różnicowania, 31 izolatów pałeczek *C. jejuni*, na podstawie wyznaczonych profili REAP wyniosła 0,852.



Ryc. 2. Zbiorcze wyniki restrykcyjnej analizy plazmidowego DNA z zastosowaniem endonukleazy BglII izolatów pałeczek *C. jejuni* (n=31) oraz *C. coli* (n=3) od których wyizolowano pojedynczy plazmid (n=34). Objaśnienia: Duże litery alfabetu oznaczają kolejne profile restrykcyjne plazmidowego DNA.

DYSKUSJA

W przeprowadzonych badaniach oceniono przydatność biotypowania, określania profili lekooporności oraz określania plazmidowego profilu i plazmidowego wzoru restrykcyjnego do wewnątrzgatunkowego różnicowania pałeczek *C. jejuni i C. coli* izolowanych od ludzi w Polsce. Do klasycznych metod fenotypowych wykorzystywanych przy typowaniu pałeczek *Campylobacter* należą między innymi biotypowanie, określenie profilu lekowrażliwości izolatów oraz typowanie serologiczne i fagowe. Ze względu na ograniczoną przydatność w rutynowych badaniach diagnostycznych typowania serologicznego i fagowego pałeczek *Campylobacter* metody te nie znalazły szerokiego zastosowania i nie zostały wykorzystane w niniejszej pracy. Pierwszą ocenianą metodą wykorzystywaną do określenia fenotypowych cech izolatów pałeczek *C. jejuni* i *C. coli* było oznaczenie ich biotypów wg schematu zaproponowanego przez Lior i wsp. (8). Wyniki badań *Rożynek* i wsp. (12), przeprowadzone na 277 szczepach *C. jejuni/ coli* wyosobnionych w Polsce od dzieci w latach 1986-1991 wykazały, że wśród pałeczek *C. jejuni* dominował biotyp I i II (odpowiednio 63% i 34% szczepów) a wśród pałeczek *C. coli* dominował biotyp II (52% szczepów). Natomiast autorzy nie wykryli szczepów należących do biotypu IV, a do biotypu III zaliczono jedynie sześć szczepów pałeczek *C. jejuni*. Podobnie, w badaniach własnych stwierdzono, że większość (60,2%) izolatów pałeczek *C. jejuni* należała do biotypu I, rzadziej (38,2%) do biotypu II. Także nie wykryto wśród badanych pałeczek *C. jejuni* izolatów zaliczonych do biotypu IV, a tylko jeden izolat zaliczono do biotypu III. Natomiast w przypadku pałeczek *C. coli,* w obecnych badaniach dominował biotyp I (70,6% izolatów), w odróżnieniu od szczepów tego gatunku badanych przez wspomnianych autorów, które najczęściej zaliczano do biotypu II (52% szczepów). Tak więc przeprowadzone badania własne pozwoliły na uzyskanie wglądu w aktualne rozpowszechnienie występowania poszczególnych biotypów pałeczek *Campylobacter* izolowanych od ludzi na terenie kraju. Należy jednak podkreślić, że wartość indeksu różnicowania pałeczek *C. jejuni* z zastosowaniem biotypowania była najniższa ze wszystkich użytych metod i wyniosła zaledwie 0,505. Było to głównie spowodowane faktem, iż na podstawie biotypowania można wyróżnić jedynie cztery biotypy u pałeczek *C. jejuni* oraz dwa biotypy u pałeczek *C. coli*. Ponadto odsetek izolatów pałeczek *C. jejuni,* zaliczonych w prezentowanej pracy do odpowiednich biotypów, był zbliżony do odsetka izolatów należących do poszczególnych biotypów określonych w badaniach przeprowadzonych przez innych autorów bez względu na obszar geograficzny i okres którego dotyczyły wykonywane badania (1, 4, 10, 12). Z tego względu biotypowanie pałeczek *Campylobacter* w celu ich różnicowania nie ma obecnie większego praktycznego znaczenia.

Następną ocenianą w badaniach metodą różnicowania izolatów pałeczek *C. jejuni* i *C. coli* było określenie profilu lekooporności badanych izolatów na podstawie oceny wartości najmniejszego stężenia wybranych antybiotyków i chemioterapeutyków hamującego wzrost tych pałeczek (MIC). Należy zauważyć, że wewnątrzgatunkowe różnicowanie bakterii na podstawie ich profilu lekooporności jest coraz rzadziej wykorzystywane ze względu na łatwość nabywania cech oporności przez te drobnoustroje. Z drugiej strony właśnie ten stan rzeczy sprawia, że w toku postępowania diagnostycznego wyhodowaniu drobnoustroju musi towarzyszyć oznaczenie jego lekowrażliwości, które może być z powodzeniem wykorzystane w postępowaniu zmierzającym do wykrycia źródła zakażenia. I tak, jeżeli przyjmie się założenie, że w ognisku zakażenia wyosobnione izolaty posiadają wspólnego przodka,

to powinny się one charakteryzować między innymi identycznymi cechami genotypowymi, a co za tym idzie podobnym profilem lekowrażliwości. Tak więc, wyniki antybiogramów poza informacją o możliwości zastosowania etiotropowego leczenia osób z ogniska mogą być jedną z pierwszych wskazówek o prawdopodobnym pokrewieństwie izolowanych drobnoustrojów.

W badaniach przy doborze antybiotyków i chemioterapeutyków kierowano się danymi piśmiennictwa oraz koniecznością zapewnienia reprezentacji największych grup tych leków. Przeprowadzone badania wykazały, że pomimo wyróżnienia 11 profili lekooporności, indeks różnicowania izolatów pałeczek *C. jejuni* charakteryzuje się dość niską wartością wynoszącą 0,764. Było to głównie spowodowane występowaniem wysokiego odsetka izolatów pałeczek *C. jejuni* wrażliwych na wszystkie użyte antybiotyki i chemioterapeutyki (blisko 30% izolatów). Ponadto należy zauważyć, że badane izolaty pałeczek *C. jejuni* i *C. coli* najczęściej charakteryzowały się opornością na dwa chemioterapeutyki - ciprofloksacynę i kwas nalidyksowy (35,9% izolatów pałeczek *C. jejuni* i 64,7% izolatów pałeczek *C. coli*). Tylko 6 (4,7%) izolatów pałeczek *C. jejuni* oraz 1 (5,9%) izolat pałeczek *C. coli* można było uznać za wielolekooporne. Tak niski odsetek badanych izolatów pałeczek *Campylobacter* charakteryzujących się wielolekooprnością z jednej strony obniża wartość różnicującą profili lekooporności z drugiej zaś strony sprawia, że w przypadkach ostrej kampylobakteriozy, gdy należy podjąć etiotropowe leczenie nie czekając na wynik badania laboratoryjnego, nadal istnieje duży wybór opcji terapeutycznych. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem metod genotypowych opisanych w drugiej części pracy wykazały także, co jest godne uwagi, że wielolekoopornych izolatów nie można było zaliczyć do jednego klonu. Tak więc jak się wydaje, nie ma zagrożenia wynikającego z rozprzestrzenienia się w naszym kraju wielolekoopornego klonu pałeczek *C. jejuni* i *C. coli.* Należy jednak mieć na uwadze, że wniosek ten wyciągnięto na podstawie wyników badania stosunkowo niewielkiej liczby izolatów. W przeprowadzonych badaniach wszystkie izolaty pałeczek *C. jejuni* i *C. coli* były wrażliwe na erytromycynę, antybiotyk z grupy makrolidów. Fakt ten potwierdza, że makrolidy są nadal lekami z wyboru w leczeniu kampylobakteriozy. Na całym świecie poważnym problemem zdrowia publicznego jest szybkie narastanie oporności większości bakterii patogennych dla człowieka na leki przeciwbakteryjne, w tym zwłaszcza na grupę chinolonów. Zjawisko to dotyczy także pałeczek z rodzaju *Campylobacter.* Także w wyniku przeprowadzonych w obecnej pracy badań stwierdzono wysoki odsetek izolatów *C. jejuni* i *C. coli* opornych na ciprofloksacynę i kwas nalidyksowy. Badania wykazały, iż 64,1% izolatów pałeczek *C. jejuni* oraz 15 spośród 17 izolatów pałeczek *C. coli* było opornych na te chemioterapeutyki. Badania polskich autorów przeprowadzone w ostatnich latach (2003-2006) także wskazywały na wysoki odsetek izolatów pałeczek *C. jejuni* wyosobnionych od ludzi, które były oporne na ciprofloksacynę – od 55,9 do 74% (13, 22, 23, 24). We wcześniejszych badaniach własnych 55,9% izolatów pałeczek *C. jejuni* wyhodowanych od chorych ludzi w latach 2003-2005 wykazywało oporność na kwas nalidyksowy (24). Zjawisko wysokiej oporności na chemioterapeutyki z grupy chinolonów, poza zawężeniem opcji terapeutycznej w przypadku leczenia kampylobakteriozy, stwarza także pewne ograniczenia przy międzygatunkowym różnicowaniu pałeczek *Campylobacter*. We wcześniejszych latach wielu autorów uznało oznaczenie lekowrażliwości pałeczek *Campylobacter* na kwas nalidyksowy za test przydatny w różnicowaniu gatunków tych pałeczek. Uznawano, że pałeczki *C. jejuni* oraz *C. coli* należą do wrażliwych, natomiast pałeczki *C. fetus* i *C. lari*

należą do drobnoustrojów opornych na ten chemioterapeutyk. Mimo istotnych zmian jakie zaszły w ostatnich latach we wrażliwości tych drobnoustrojów na chinolony w dalszym ciągu w niektórych nowo wydanych podręcznikach test oznaczenia wrażliwości na kwas nalidyksowy jest wymieniony wśród testów różnicujących omawiane bakterie (6, 16, 17).

Oznaczenie lekowrażliwości izolatów pałeczek *C. jejuni* i *C. coli* ze sporadycznych zakażeń wskazują, że określenie wartości MIC większości zastosowanych antybiotyków i chemioterapeutyków dodatkowo nie różnicowało ani izolatów wrażliwych ani izolatów opornych. I tak wartość MIC erytromycyny i gentamicyny hamujących wzrost pałeczek *C. jejuni*, najczęściej oscylowała między 0,38 - 1,5 mg/ml. Niemal wszystkie izolaty pałeczek *C. jejuni* i *C. coli,* które były oporne na ciprofloksacynę i kwas nalidyksowy, wykazywały wysoką oporność na te chemioterapeutyki z MIC powyżej 32 mg/ml dla ciprofloksacyny oraz powyżej 256 mg/ml dla kwasu nalidyksowego. Wartości te przekraczały górny próg dostępnego zakresu oznaczalności MIC w metodzie E-testów. Największe zróżnicowanie wartości MIC a tym samym odsetka opornych, średnio wrażliwych i wrażliwych izolatów pałeczek *Campylobacter* zaobserwowano jedynie w przypadku tetracykliny i ampicyliny. Pomimo dość niskiej wartości różnicującej określonych w badaniach profili lekooporności, należy zauważyć, że wszystkie izolaty pochodzące z ognisk zakażenia pokarmowego posiadały te same charakterystyczne dla danego ogniska wzory lekooporności, z takimi samymi lub podobnymi wartościami MIC dla poszczególnych antybiotyków. Może to świadczyć o wspólnym źródle zakażenia w obrębie każdego z wykrytych ognisk. Powyższe badania wskazują na przydatność oznaczenia wartości MIC w celach oznaczenia pokrewieństwa izolatów pałeczek *Campylobacter* pochodzących od osób z ognisk. Tym niemniej każdorazowo w przypadku podejrzenia, że badane izolaty pałeczek *Campylobacter* spowodowały zbiorowe zakażenie należałoby przeprowadzić dodatkowe badania z użyciem innych metod typowania. Wynik antybiogramu należałoby natomiast traktować jako pierwszy krok w dochodzeniu ewentualnego pokrewieństwa izolatów.

Analiza profili plazmidowych jest jedną z najwcześniej stosowanych metod służących do genotypowania bakterii. Izolacja plazmidów i ustalenie ich profili po elektroforezie w żelu agarozowym może posłużyć do różnicowania badanych szczepów (7, 14). Przeprowadzone badania wykazały obecność plazmidowego DNA jedynie w komórkach 47 (37%) izolatów pałeczek *C. jejuni* i 3 izolatów pałeczek *C. coli* spośród 20 badanych. Tak niski odsetek izolatów posiadających plazmidy sprawił, że indeks różnicowania izolatów pałeczek *C. jejuni* metodą typowania plazmidowego wynosił zaledwie 0,591. Wartość ta była najniższa w porównaniu z wartościami indeksu różnicowania innych metod genotypowych, opisanych w drugiej części pracy (19). Analiza pojedynczo występujących w komórkach pałeczek *C. jejuni* i *C. coli* plazmidów o wielkości powyżej 15 kpz przy użyciu restryktazy BglII (Restriction Enzyme Analysis of Plasmid - REAP), pozwoliła na dalsze ich różnicowanie pod względem wielkości oraz wzoru restrykcyjnego. Należy jednak zaznaczyć, że zastosowanie metody REAP pomimo znacznego podniesienia wartości indeksu różnicowania pałeczek *C. jejuni* (0,852), może być celowe jedynie w przypadkach różnicowania izolatów posiadających pojedynczy plazmid. Pojedynczo występujące plazmidy izolowane z komórek pałeczek *C. jejuni* najczęściej charakteryzowały się wielkością w zakresie około 37 - 46 kpz. Podobne obserwacje poczynili *Pratt i Korolik* (11), którzy stwierdzili obecność pojedynczego plazmidu o wielkości od 30 do 40 kpz u 30 z pośród 34 izolatów pałeczek *Campylobacter*. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że w obecnych badaniach 28 z pośród

30 izolatów pałeczek *C. jejuni* opornych na tetracyklinę wykazywało obecność plazmidów. Dane piśmiennictwa wskazują, że oporność na tetracyklinę jest najczęściej wynikiem nabycia przez pałeczki *Campylobacter,* genu *tetO* kodującego białko chroniące rybosom komórki bakteryjnej przed antybiotykiem. Gen ten często występuje w plazmidzie posiadającym zdolność do przekazywania DNA na drodze koniugacji do komórek nieposiadających plazmidu (5, 11, 24). We wcześniejszych badaniach własnych przeprowadzonych metodą hybrydyzacji typu Southern, z użyciem izolatów pałeczek *Campylobacter* wyosobnionych w naszym kraju zaobserwowano, iż wszystkie izolaty oporne na tetracyklinę wykazywały obecność genu *tetO*, który u 94% izolatów znajdował się w plazmidzie o wielkości od 34 do 46 Kb. Ponad połowa izolatów *Campylobacter sp.* opornych na teracyklinę posiadała gen *tetO* zlokalizowany w plazmidzie koniugacyjnym (24). Co ciekawe, w obecnej pracy, pośród izolatów posiadających pojedynczy, duży plazmid zaobserwowano również jeden dominujący profil REAP (profil A), który jest tożsamy z dominującym profilem otrzymanym we wcześniejszych badaniach plazmidów mających zdolność do koniugacji. Tak więc chociaż w niniejszej pracy nie przeprowadzono badań nad zdolnością do koniugacyjnego przekazywania plazmidów, to ze względu na liczne publikacje i wcześniejsze badania własne oraz obecność wśród badanych izolatów plazmidów o wzorach REAP tożsamych z wzorami plazmidów koniugacyjnych można wnioskować, że niektóre z badanych plazmidów posiadają tę zdolność. Obecność genu *tetO* w plazmidzie koniugacyjnym może prowadzić do horyzontalnego przenoszenia się oporności na tetracyklinę na wrażliwe szczepy, co może spowodować zawężenie opcji terapeutycznej w przypadku gdyby zaistniała konieczność użycia tego antybiotyku w leczeniu kampylobakteriozy.

Podsumowując, uzyskane w obecnej pracy wyniki pozwalają stwierdzić, że oceniane metody fenotypowe charakteryzowały się dość niskim stopniem różnicowania pałeczek *C. jejuni* oraz *C. coli* izolowanych od osób ze sporadycznymi zakażeniami. Metoda analizy plazmidowego DNA ze względu na zbyt dużą liczbę izolatów nieposiadających w komórkach tych pozachromosomalnych elementów genetycznych także wydaje się być mało przydatna w różnicowaniu pałeczek *C. jejuni* i *C. coli*. W przypadku badania izolatów pochodzących z ogniska zakażenia pokarmowego określenie ich profilu lekooporności może dostarczyć pierwszą cenną informację o ewentualnym ich pokrewieństwie. Jednak uzyskane wyniki powinny zostać potwierdzone przy wykorzystaniu metod genotypowych, które jak to wykazano w drugiej części pracy charakteryzują się wysokim stopniem różnicowania pałeczek *Campylobacter* (19).

S. Wardak, M. Jagielski

EVALUATION OF GENOTYPIC AND PHENOTYPIC METHODS FOR THE DIFFERENTIATION OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI* AND *CAMPYLOBACTER COLI* CLINICAL ISOLATES FROM POLAND. I. BIOTYPING, RESISTANCE PATTERN, PLASMID ANALYSIS, RESTRICTION ENZYME ANALYSIS OF PLASMID

SUMMARY

A total of 128 clinical isolates of *C. jejuni* and 17 clinical isolates of *C. coli* were characterized by their plasmid profiles, susceptibility to six antimicrobial agents and the Lior biotypes. We also

analyzed seven isolates from three *C. jejuni* family outbreaks and three isolates from one *C. coli* family outbreak. Plasmids were found in 47 *C. jejuni* (36,7%) and 3 *C. coli* (17,6%) isolates. The sizes of plasmids detected ranged from about 3,3 to 89 kb. The majority of *Campylobacter* isolates (n=33) had a single plasmid, 11 and three isolates of *C. jejuni* had two and three plasmids, respectively. The most frequently isolated plasmids ranged from 37 to 48 kb (n=26). The single plasmids were discriminated on the basis of their BglII patterns. The majority of 45 kb (n=12) plasmids had the indistinguishable pattern. The significant association ($p<0,0001$) between tetracycline resistance and plasmid carriage was observed. All except one (hippuric-negative *C. jejuni* isolate) *C. jejuni* isolates were biotyped using the Lior biotyping scheme. Three biotypes of *C. jejuni* and 2 biotypes of *C. coli* were identified among the isolates; 60,2% were *C. jejuni* I, 38,2% *C. jejuni* II, 0,8% *C. jejuni* III, 70,6% *C. coli* I and 29,4% *C. coli* II. In this study the least discriminatory subtyping method was biotyping (D=0,505). *C. jejuni* isolates were the most resistant to ciprofloxacin and nalidixic acid (64,1%) followed by tetracycline (23,4%) and ampicillin (13,3%). Fifteen isolates of *C. coli* were resistant to ciprofloxacin and nalidixic acid (88,2%), three to ampicillin and one to tetracycline. All of the *C. jejuni* and *C. coli* isolates were sensitive to erythromycin and gentamicin. Resistance to ciprofloxacin was found in all quinolone-resistant isolates. Thirty seven isolates (28,9%) were susceptible to all antimicrobial agents tested. Six *C. jejuni* (4,7%) and one *C. coli* isolates showed resistance to more than three drugs.

The fact that the most of the *C. jejuni* and *C. coli* isolates tested were biotype I and possessed no plasmid limited the usefulness of biotyping and plasmid analysis as epidemiological markers. The results of susceptibility testing of *C. jejuni* and *C. coli* isolates showed high percentage of resistance to quinolones.

PIŚMIENNICTWO

1. *Aboaba OO*, *Smith SI.* Occurrence of *Campylobacter* species in poultry forms in Lagos area of Nigeria. J Environ Biol 2005;26(2 Suppl):403-8.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline M45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa; 2006.
3. EFSA report: The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006 http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports/zoonoses_report_2006.html
4. *Figura N, Gugliemetti P, Zanchi A i* inni. Species, biotype and serogroup of *Campylobacter spp*. isolated from children with diarrhoea over a ten-year period. New Microbiol 1997;20:303-10.
5. *Gibreel A, Tracz DM, Nonaka L* i inni. Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to *tet(O)*-mediated tetracycline resistance. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:3442-50.
6. *Grzybowski J, Reiss J.* Praktyczna bakteriologia lekarska i sanitarna. Rozdział 19. Pałeczki Gram-ujemne, mikroaerofilne (rodzaj *Helicobacter* i *Campylobacter*), Warszawa, Dom Wydawniczy Bellona, 2001: 230-4.
7. *Krawczyk B, Kur J.* Diagnostyka molekularna w mikrobiologii. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 2008.
8. *Lior H.* New, extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and "*Campylobacter laridis*". J Clin Microbiol 1984;20:636-40.
9. *Miller WG, Mandrell RE.* Prevalence of *Campylobacter* in the food and water supply: Incidence, outbreaks, isolation and detection, [W] Ketley JM i Konkel ME. *Campylobacter*. Molecular and cellular biology, Norfolk, UK, Horizon Bioscience 2005:101-64.
10. *Patton CM, Wachsmuth IK, Evins GM* i inni. Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic-associated *Campylobacter* strains. J Clin Microbiol 1991;29:680-8.

11. *Pratt A, Korolik V.* Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. J Antimicrob Chemother 2005;55:452-60.
12. *Rożynek E*, *Dzierżanowska D.* Dystrubucja biotypów i serogrup według schematu Lior pałeczek *Campylobacter jejuni/coli* izolowanych od dzieci w Polsce w latach 1986-1991.Alpe Adria Microbiol J 1994; 1: 20-29.
13. *Rożynek E, Dzierżanowska-Fangrat K, Korsak D* i inni. Comparison of antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from humans and chicken carcasses in Poland. J Food Prot. 2008;71:602-7.
14. *Singh A, Goering RV, Simjee S* i inni. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev. 2006;19:512-30.
15. *Skirrow MB, Blaser MJ.* Clinical aspects of *Campylobacter* infection, [W:] Nachamkin I i Blaser M J. *Campylobacter*, wydanie II, Washington, DC, ASM Press 2000:69-88.
16. *Szewczyk EM. Campylobacter* i *Helicobacter*, [W:] Szewczyk EM. Diagnostyka bakteriologiczna, Warszawa, PWN, 2006:138-142.
17. *Vandamme P, Dewhirst FE, Paster BJ, On SLW. Campylobacteraceae* Vandamme and De Ley 1991, [W:] Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's manual of systematic bacteriology, wydanie II, Vol. 2, Część C, New York, Springer 2005: 1145-1160.
18. *Vandamme P, van Doorn LJ, al Rashid ST* i inni. *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Véron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. Int J Syst Bact 1997;47:1055-60.
19. *Wardak S, Jagielski M.* Ocena przydatności wybranych metod genotypowych i fenotypowych do wewnątrzgatunkowego różnicowania pałeczek *Campylobacter jejuni* oraz *Campylobacter coli* izolowanych od ludzi. II. Przydatność metod PFGE, ERIC-PCR, PCR-*flaA*-RFLP i MLST. Med Dośw Mikrobiol 2009;61: 63-77
20. *Wardak S, Duda U, Szych J.* Epidemiologiczna analiza zakażeń wywołanych przez pałeczki *Campylobacter sp*. wykrytych przez stację sanitarno-epidemiologiczną w Bielsku-Białej. Med Dośw Mikrobiol 2007;61:417-424.
21. *Wardak S, Szych J, Cieślik A*. Wykorzystanie techniki PCR-RFLP do wykrywania mutacji w kodonie 86 genu *gyrA* związanej z opornością na fluorochinolony pałeczek *Campylobacter jejuni*. Med Dośw Mikrobiol 2005;57:295-301.
22. *Wardak S, Szych J, Cieślik A* i inni. Zakażenia pałeczkami *Campylobacter* u dzieci leczonych w SZPZOZ im. Dzieci Warszawy w Dziekanowie Leśnym, Oddział w Warszawie w latach 2003-2004. Pediatria Pol 2005;80:1108-1112.
23. *Wardak S, Szych J, Duda U*. Wrażliwość na antybiotyki i chemioterapeutyki szczepów pałeczek *Campylobacter* sp. izolowanych od ludzi w latach 2005-2006 w regionie bielsko-bialskim. Med Dośw Mikrobiol 2007;59:43-49.
24. *Wardak S, Szych J, Zasada AA, Gierczyński R*. Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* clinical isolates from Poland. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1123-5.
25. *Wingstrand A, Neimann J, Engberg J* i inni. Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis, Denmark. Emerg Infect Dis 2006;12:280-4.
26. *Żurawska-Olszewska J, Krzesłowska I, Długosz G* i inni. Etiolgia ostrych biegunek u dzieci w regionie łódzkim. I. Częstość występowania czynników etiologicznych. Med. Dośw Microbiol 2002;54:129-36.

Otrzymano: 10 II 2009

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii NIZP-PZH
e-mail: swardak@pzh.gov.pl