

CAMPYLOBACTER JEJUNI SUŞLARININ DNA HİDROLİZ VE ALKALİN FOSFATAZ AKTİVİTELERİ

Serdar Diker*

Ersin İstanbulluoğlu**

DNA hydrolysis and alkaline phosphatase activities of *Campylobacter jejuni* strains

Summary: *In this study, two different methods were used for both DNA hydrolysis and alkaline phosphatase activities of Campylobacter jejuni strains isolated from gallbladder of sheep and cattle. Two tests used for DNA hydrolysis and alkaline phosphatase activities were described by Hebert et al. Other two methods for detecting DNA hydrolysis and alkaline phosphatase activities developed by Pham and by Holmberg, respectively, were applied to C. jejuni in our laboratory. Several biochemical tests like H₂S production, hippurat hydrolysis and growth on charcoal yeast extract (CYE) agar were also studied for their usefulness for the examination of C. jejuni strains.*

Of the 63 strains tested, 53 from sheep and 10 from cattle, 22 (34.9 %) hydrolyzed DNA. Alkaline phosphatase activity was detected in 25 (39.6 %) of the strains. In the other biochemical tests, most of the isolates (80.9 %) hydrolyzed sodium hippurate and (84.1 %) grew on charcoal yeast extract agar. Of the 63 C. jejuni strains studied, 49 (77.7 %) produced H₂S in an ordinary media.

DNA hydrolysis and alkaline phosphatase activity tests applied to C. jejuni strains were found to be much suitable than the original ones. The results also showed that these tests with a few additional ones could be used for biotyping of C. jejuni.

Özet: *Bu araştırmada, Campylobacter jejuni suşlarının DNA hidroliz ve alkaline fosfataz aktivitelerini belirlemek için iki farklı yöntem kullanıldı. Ayrıca bu türün identifikasyonundaki kullanılabilirliklerini saptamak için çeşitli biyokimyasal testler yapıldı. Koyunlardan izole edilen 53 ve sığırlardan izole*

* Arş. Gör., A. Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

** Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

edilen 10 adet olmak üzere toplam 63 suşun 22 si (% 34.9) DNA yı hidrolize etti ve 25 i (% 39.6) alkalın fosfataz aktivitesi gösterdi. Laboratuvarımızda *C. jejuni* izolatlarına uygulanan iki yöntem diğerlerinden daha kullanışlı bulundu. Diğer biyokimyasal testlerde, *C. jejuni* suşlarının % 80.9 u hippurati hidrolize etti, % 77.7 si H₂S oluşturdu ve % 84.1 i CYE agarda üredi.

Giriş

Campylobacter jejuni, son yıllarda gerek veteriner hekimlikte gerekse insan hekimliğinde önemi gitikçe artan patojenik bir mikroorganizmadır. Yeni izolasyon yöntemlerinin geliştirilmesi ile ortaya çıkan bu patojen, özellikle insanlardaki gastroenterit olgularının büyük kısmının sorumlusu olarak kabul edilmektedir (3, 12, 15, 17, 20). Bunun yanı sıra, enteritli hayvanlardan da izole edildiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. *C. jejuni* sığır, koyun, köpek, kedi, at ve kemiricilerde infeksiyonlara neden olabilmektedir (1,2, 8, 13, 17, 23). Sağlıklı hayvanların da barsaklarında ve safra keselerinde bulunan bu mikroorganizmanın, gerek hayvansal gıda maddeleri ile ve gerekse direk olarak insanlara bulaştığı ve *C. jejuni* nedenli insan infeksiyonlarının bu kaynaklardan köken aldığı gösterilmiştir (4, 5, 7, 18, 24). Bu mikroorganizmanın Türkiye'deki sağlıklı ve sürgünlü hayvan popülasyonlarında varlığı saptanmıştır (6).

Yukarıda açıklanan nedenler ile üzerindeki ilgi gittikçe artan *C. jejuni*'nin çeşitli kaynaklardan izole edilen suşlarının biyotiplendirilmesi gereği ortaya çıkmıştır. Biyotiplendirme için çeşitli yöntemler öneren araştırmacılardan Skirrow ve Benjamin (21) *C. jejuni*'yi H₂S oluşturma özelliklerine göre iki biyotipe ayırmışlardır. Hebert ve ark. (10) ise, *C. jejuni*'yi hippurat hidrolizi, DNA hidrolizi ve CYE (Charcoal Yeast Extract) agarda üreme testlerinden oluşan bir tabloda biyotiplendirmeye çalışmışlar ve mikroorganizmanın 8 biyotipini ayırmışlardır. Bu kaynaklar, ayrıca diğer bazı biyokimyasal testlerin *C. jejuni*'nin biyotiplendirilmesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Bu araştırmada, DNA hidroliz ve alkalın fosfataz testlerinin *C. jejuni* biyotiplendirilmesinde kullanılma olanakları incelenmiştir. Ayrıca, *C. jejuni*'nin DNA hidroliz ve alkalın fosfataz aktivitelerinin saptanması amacıyla Hebert ve ark. (10) tarafından kullanılandan farklı iki yöntem *C. jejuni* suşlarına uygulanarak bunların pratiklik açısından karşılaştırılmaları yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Kampilobakter suşları : Bu araştırmada, 100 adet sığır safra kesesinden izole edilen 10, ve 100 adet koyun safra kesesinden izole edilen 53 olmak üzere toplam 63 *Campylobacter jejuni* suşu kullanıldı.

İzolasyon : Safra keselerinin iç cidarından steril eküvyonlar ile toplanan örnekler, 10 mg/l vancomycin, 5 mg/ l trimethoprim lactate, 2500 IU/l polymyxin B ve % 7 defibrine koyun kanı içeren Blood Agar Base No.2 (Oxoid) besiyerine ekildi (19). Ekim yapılan besiyerleri, Gas-Pak (Oxoid) ile birlikte katalizörsüz anaerobik jara konularak 37 °C de 3 gün bekletildi. Jarlar bu sürenin sonunda incelenmek üzere açıldı.

İdentifikasyon : Besiyeri üzerinde yaygın şekilde üreyen tipik koloniler Gram yöntemi ile boyandılar ve karanlık saha mikroskopu ile hareket muayeneleri yapıldı. *C. jejuni* suşlarının identifikasyonu için oksidaz, katalaz, hidrojen sülfür, nitrat ve sodyum selenit gibi biyokimyasal testler ile ayrıca, 25°C, 42°C de üreme, % 1 glisin , % 3.5 sodyum klorür ,30 mcg/ ml nalidiksik asit ve 400 mcg/ ml TTC (triphenyl tetrazolium chlorid) 'e tolerans testleri kullanıldı. Ayrıca bu suşların hippuratu hidrolize etme ve CYE agarda üreme yetenekleri incelendi.

DNA hidroliz testi : *C. jejuni* suşlarının DNA'yı hidrolize etme özelliklerini belirlemek için iki farklı yöntem kullanıldı.

I. Yöntem : Hebert ve arkadaşları (10) tarafından geliştirilen metot kullanıldı. Metil yeşilinin (Merck) % 0.5'lik solusyonu hazırlanarak, eritilmiş DNA ase Test Agar (Oxoid) içine % 0.005 oranında katıldı. Kanlı agarda üretilmiş 24 saatlik *C. jejuni* kültüründen bir özde dolusu alınarak, bu besiyeri üzerinde 1 cm çapında bir alana ekildi. Her bir petri kutusuna altı suştan ekim yapıldı. Kültürler mikroaerofilik koşullarda 35°C de 3 gün bekletildi. Bu sürenin sonunda, mavi - yeşil besiyerinin renginin ekim yapılan suşların çevresinde renksizleşmesi, pozitif sonuç, renk değişikliğinin olmaması negatif sonuç olarak değerlendirildi. Her testte bir *Staph. aureus* suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

II. Yöntem : Bu test için Pham ve arkadaşları (16) tarafından geliştirilen yöntem laboratuvarımızda *C. jejuni* suşlarına uygulandı. Taze *C. jejuni* kültüründen bir öze dolusu alınarak DNA ase Test Agar üzerinde bir cm çaplı bir alana ekildi. Besiyerleri mikroaerofilik koşul-

larda 3 gün inkübe edildi. Bu sürenin sonunda besiyeri üzerine 1 N HCl asit dökülerek bir dakika bekletildi. Bulanık bir renk alan besiyerinde, suşların çevresinde renksiz bir alanın oluşması pozitif, bulanık rengin değişmemesi negatif sonuçlar olarak değerlendirildi. Her testte bir *Staph. aureus* suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Alkalin fosfataz aktivitesi: *C. jejuni* suşlarının alkalin fosfataz aktivitelerini belirlemek için iki farklı yöntem kullanıldı.

I. Yöntem: Hebert ve ark. (10) tarafından geliştirilen metot kullanıldı. Fosfataz substratını hazırlamak için 100 mg p-nitrophenyl phosphate disodium tetrahydrate (Sigma) 25 ml distile suda eritildi ve üzerine 0.001 M $MgCl_2$ de 0.1 M glisin içeren karışımdan 25 ml eklendi. Karışım 0.3 ml miktarında küçük şişelere konularak $-20^{\circ}C$ de saklandı. *C. jejuni*'nin 24 saatlik kültüründen bir öze dolusu alınarak, içinde 0.3 ml fizyolojik tuzlu su bulunan vidalı küçük bir tüpte yoğun şekilde süspanse edildi. Bu süspanسیونun üzerine daha önce hazırlanmış olan fosfataz substratı eklenerek $35^{\circ}C$ de 6 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda tüpteki karışımın renginin sarı olması pozitif ,renksiz reaksiyon ise negatif sonuç olarak değerlendirildi.

II. Yöntem: Bu test için, Holmberg (11) tarafından kullanılan metot laboratuvarımızda *C. jejuni* suşlarına uygulandı. Zenginleştirilmiş agara filtrasyon ile sterilize edilmiş % 1 lik phenolphthalein (Oxoid) % 1 oranında katıldı. *C. jejuni*'nin kanlı agardaki 24 saatlik kültüründen bu besiyerine ekim yapılarak $35^{\circ}C$ de 3 gün bekletildi. Bu sürenin sonunda besiyerleri amonyak buharına tutuldu. Kolonilerin pembe renk alması pozitif, renksiz kalması ise negatif sonuç olarak değerlendirildi. Her testte bir *Staph. aureus* suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Bulgular

İdentifikasyon amacı ile yapılan tolerans testleri ve biyokimyasal testlerin tümünde incelenen 63 suş *C. jejuni* için tipik olan özellikleri gösterdiler. 63 suşun % 100'ü oksidaz, katalaz, nitrat ve sodyum selenit testlerinde ve TTC tolerans testlerinde pozitif bulundu. Bu suşların tamamı (% 100) $42^{\circ}C$ 'de üredi, hiç biri $25^{\circ}C$ de ve nalidiksik asit varlığında üremedi. *C. jejuni* olarak ayrılan 63 suşun 51 i (% 80.9) hippurati hidrolize etme, $49^{\circ}u$ (% 77.7) H_2S oluşturma, $53^{\circ}u$ (% 84.1) CYE agarda üreme yeteneğinde bulundular.

İncelenen 63 *C. jejuni* suşunun 22si (% 34.9) DNA hidrolizine neden oldu. DNA hidrolizinin belirlenmesi için kullanılan her iki yöntemde de sonuçlar paralellik gösterdi. Fakat, laboratuvarımızda *C. jejuni* suşlarına uygulanan II. yöntemde sonuçların diğerine göre daha kesin okunduğu belirlendi.

Laboratuvarında *C. jejuni* suşlarına adapte edilen II. yöntem ile çalışılan 63 suşun 25 i (% 39.6) alkalın fosfataz aktivitesi gösterdi. I. yöntem ile incelenen suşların 20 si (% 31.7) pozitif, 12 si (% 19.0) şüpheli bulundu.

Tartışma ve Sonuç

Kampilobakter türlerinin identifikasyonu ve bu türlerin içindeki alt türlerin veya suşların belirlenmesi için çeşitli biyokimyasal testlerden yararlanılmaktadır. *C. jejuni* suşları çeşitli biyokimyasal test sonuçlarına göre heterojen gruplar oluşturma özelliğine sahip mikroorganizmalardır. Suşlar arasındaki bu heterojenitenin, bunların izole edildiği kaynakla ve kültürün yaşı ile ilişkisi olduğunu gösteren belirli kanıtlar yoktur. Buna karşın *C. jejuni* dışında kalan diğer kampilobakter türleri, tür içinde, çeşitli biyokimyasal sistemlerde homojen sonuçlar vermektedirler.

Hebert ve arkadaşları (10) tarafından kullanılan DNA hidroliz testinin esası, mikroorganizmanın salgıladığı DNA az enziminin besiyerindeki DNA'yı parçalaması sonucu, metil yeşilinin DNA kompleksinden ayrılarak besiyerini renksizleştirmesine dayanır. Laboratuvarımızda *C. jejuni* suşlarına adapte edilen yöntemde ise, mikroorganizmanın parçaladığı DNA, besiyeri üzerine dökülen HCl asit ile birleşmemekte ve reaksiyon alanı renksiz kalmaktadır. Her iki yöntem ile incelenen *C. jejuni* suşlarının % 34.9 unun DNA hidrolizine neden olduğunu belirledik. Hebert ve arkadaşları (10) araştırmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara yakın olarak, *C. jejuni* suşlarının DNA'yı hidrolize etme oranlarını % 46 olarak belirlemiştir. Smibert (22) ise, değişik bir besiyeri kullanarak bu oranı % 60 olarak saptamıştır. Bu sonuçlar *C. jejuni* suşlarının heterojenik özelliğini yansıtmaktadırlar. Hebert ve ark. (10) tarafından kullanılan yöntem ile bizim kullandığımız yöntem karşılaştırıldığında *C. jejuni*'ye uyguladığımız yöntemin, sonuçların daha kesin okunması ve besiyerinin daha kolay hazırlanması gibi üstünlükleri olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca, Hebert ve ark. (10) da kendi yöntemlerinde % 4.4 oranında şüpheli reaksiyonla karşılaştığını bildirmişlerdir.

Adapte edilen yöntem ile incelenen *C. jejuni* suşlarının % 39.6'sı alkalın fosfataz aktivitesi göstermiştir. Hebert'in yöntemi ile incelenen suşlarda ise % 31.7 oranında pozitif reaksiyonun yanı sıra % 19 oranında şüpheli reaksiyon saptanmıştır. Smibert (22), üzerinde çalıştığı *C. jejuni* suşlarının % 67'sinin alkalın fosfataz aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir. Hebert ve ark. (10) ise, suşların % 38 'nin pozitif, % 34.6'nın şüpheli sonuçlar verdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, önceden biyotiplendirme amacıyla kullanmayı planladıkları bu testin çok sayıda şüpheli sonuç vermesi üzerine, testi biyotiplendirme şemasından çıkardıklarını açıklamışlardır. Laboratuvarımızda kullanılan yöntem ise oldukça kesin sonuçlar verdiği için, alkalın fosfataz testinin tekrar biyotiplendirme şemasına alınmasını sağlayacak niteliktedir.

Skirrow ve Benjamin (21) tarafından *C. jejuni* suşlarının biyotiplendirilmesinde kullanılan H₂S testi ile araştırmamızda kullanılan H₂S testlerinin yöntemleri farklı olduğundan, bu biyotiplendirme şekli ile bir karşılaştırma yapmak mümkün olmamıştır. Çünkü aynı *C. jejuni* susundan bu iki yöntem ile farklı sonuçlar alınabilmektedir.

Birçok araştırmacı tarafından *C. jejuni*'nin ayırıcı karakteri olarak kabul edilen hippurat hidrolizi yönünden incelenen suşların % 80.9 u bu testte pozitif bulundular (9, 14). Hebert ve ark. (10), insanlardan izole edilen *C. jejuni* suşlarının % 90, hayvanlardan izole edilen suşların ise % 30 oranında hippuratu hidrolize ettiğini bildirmiştir. Bu sonuçlar, testin insan ve hayvan suşları arasında karşılaştırma yapmak amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

Biyokimyasal testlerde oldukça farklı sonuçlar veren *C. jejuni* suşlarının, belirli biyotip sınırları içine sokulması, mikroorganizmanın oluşturduğu infeksiyonların epidemiyolojik yönlerinin daha iyi anlaşılmasını ve infeksiyon ile daha iyi savaşılmasını sağlayacaktır. Yurdumuzda, *C. jejuni* ile ilgili sadece bir araştırma yapılmış olduğundan, araştırmamızın sınırlı sayıdaki materyali ile elde edilen sonuçların, Türkiye geneline getirilmesi ve diğer ülkelerdeki çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılması güçtür. Fakat, en azından, özellikle Kanada, İngiltere ve Amerika Birleşik Devletleri gibi değişik coğrafi konuma sahip ülkelerde izole edilen *C. jejuni* suşları ile yurdumuzda izole edilen suşlar arasında bazı farkların bulunduğu anlaşılmaktadır.

Daha fazla sayıda materyal ile ve Türkiye'nin değişik yörelerinden alınan örneklerle izolasyon çalışmalarının yapılmasının ve izole edilen suşların çeşitli biyotiplerinin saptanması için halen var olan

sistemlerin yanısıra yeni testlerin araştırılmasının bu enfeksiyon sorununun çözümü için gerekli olduğu kanısındayız.

Literatür

- 1- **Al-Mashat, R.R. and Taylor, D.J.** (1980): *Campylobacter spp* in enteric lesions in cattle. Vet. Rec., 107: 31-34.
- 2- **Al-Mashat, R.R. and Taylor, D.J.** (1980): Production of diarrhoea and dysentery in experimental calves by feeding pure cultures of *Campylobacter fetus subsp. jejuni*. Vet. Rec., 107: 459-464.
- 3- **Blaser, M.J. and Reller, L.B.** (1981): *Campylobacter enteritis*. New England J. Med., 305:493-495.
- 4- **Blaser, M.J., Checko, P., Bopp, C., Bruce, A. and Hughes, J.M.** (1982): *Campylobacter enteritis associated with foodborne transmission*. Amer. J. Epidemiol, 116: 886-894.
- 5- **Bolton, F.J., Dawkins, H.C. and Robertson, L.** (1982): *Campylobacter jejuni/ coli* in abattoirs and butchers shops. J. Infect., 4: 243-245.
- 6- **Diker, S. ve İstanbulluoğlu, E.** (1983): Sağlıklı ve sürgünlü hayvanlardan *Campylobacter fetus subsp. jejuni* izolasyonu üzerinde çalışmalar. A. Ü. Vet. Fak. Derg., 30: 28-34.
- 7- **Doyle, M.P. and Roman, D.J.** (1982): Prevalence and survival of *Campylobacter jejuni* in unpasteurized milk. Appl. Environ. Microbiol., 44: 1154-1158.
- 8- **Fox, J.G.** (1982): *Campylobacteriosis-a "new" disease in laboratory animals*. Lab. Anim. Sci., 32: 625-637.
- 9- **Harvey, S.M.** (1980): *Hippurate hydrolysis by Campylobacter fetus*. J. Clin. Microbiol., 11: 435-437.
- 10- **Hebert, G.A., Hollis, D.G., Weaver, R.E., Lambert, M.A., Blaser, M.J. and Moss, C.W.** (1982): 30 years of campylobacters: biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. J.Clin. Microbiol., 15: 1065-1073.
- 11- **Holmberg, O.** (1973): *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. Acta Vet. Scand. Suppl. 45: 1-144.
- 12- **Karmali, M.A., Penner, J.L., Fleming, P.C., Williams, A. and Henessy, J.N.** (1983): The serotype and biotype distribution of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* over a three-year period. J. Infect. Dis., 147: 243-246.
- 13- **Laregina, M. and Lonigro, J.** (1982): Isolation of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* from hamsters with proliferative ileitis. Lab. Anim. Sci., 32: 660-662.
- 14- **Luechtefeld, N.W. and Wang, W-L.L.** (1982): Hippurate hydrolysis by and triphenyl-tetrazolium tolerance of *Campylobacter fetus*. J. Clin. Microbiol., 15: 137-140.
- 15- **Norkrans, G. and Svedhem, A.** (1982): Epidemiological aspects of *Campylobacter jejuni enteritis*. J. Hyg., 89: 163-170.
- 16- **Pham, A.V. and Davis, G.H.G.** (1979): A modified thermonuclease test for *Staphylococcus aureus* identification. Aust. J. Med. Technol., 10: 29-31.

- 17- **Prescott, J.F. and Munroe, D.L.** (1982): *Campylobacter enteritis in man and domestic animals*. J. Amer. Vet. Med. Ass., 181: 1524-1530.
- 18- **Robinson, D.A. and Jones, D.M.** (1981): *Milk borne campylobacter infection*. Br. Med. J., 282:1374-1376.
- 19- **Skirrow, M.B.** (1977): *Campylobacter enteritis: a "new" disease*. Br. Med. J., 2:9-11.
- 20- **Skirrow, M.B.** (1982): *Campylobacter enteritis-the first five years*. J. Hyg., 89: 175-184.
- 21- **Skirrow, M.B. and Benjamin, J.** (1980): *Differentiation of enteropathogenic campylobacter*. J. Clin. Pathol., 33: 1122.
- 22- **Smibert, R.M.** (1974): *Genus II. Campylobacter*. In R.E.Buchanan and N. E. Gibbons (Ed), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8 th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 23- **Vandenbergh, J., Lauwers, S., Plehier, P. and Hoorens, J.** (1982): *Campylobacter jejuni related with diarrhoea in dogs*. Br. Vet. J., 138: 356-361.
- 24- **Wempe, J.M., Genigeorgis, C.A., Farver, T.B. and Yusufu, H. I.** (1983): *Prevalence of Campylobacter jejuni in two chicken processing plant*. Appl. Environ. Microbiol., 45: 355-359.