

## Tavuk Orijinli Campylobacter Suşlarının Hemolitik Aktivitelerinin Saptanması

Mehmet AKAN<sup>1</sup> K.Serdar DİKER<sup>1</sup> Murat YILDIRIM<sup>1</sup> Gülay ALTAY<sup>1</sup> Gülşen HASÇELİK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> A. Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dışkapı , Ankara, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, TÜRKİYE

Geliş tarihi: 06 Mayıs 1997

### Hemolytic Activities of Campylobacter Strains Isolated from Poultry

**Summary:** A total of 20 Campylobacter jejuni and C.coli strains isolated from chickens were examined for hemolytic activity by blood agar and microplate assay. Rabbit, sheep and chicken erythrocytes were used to determine hemolytic activity. Rabbit erythrocytes were more susceptible to Campylobacter hemolysin than chicken and sheep erythrocytes on agar assay. The incubation conditions, temperature and gaseous environment, appeared to be important for the detection of this activity. Incubation in aerobic atmosphere and 42 °C were suitable for testing hemolysis. Distinct hemolysis was detected in 80% of C.jejuni strains and 60% of C.coli strains on rabbit blood agar after incubation for 4 day aerobically at 42 °C.

**Key words:** Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, hemolysis, chicken

**Özet:** Tavuklardan izole edilen toplam 20 adet Campylobacter jejuni ve C.coli suşunun hemolitik aktiviteleri agar ve mikropleyt yöntemi ile araştırıldı. Hemolitik aktiviteyi belirlemek amacıyla tavşan, koyun ve tavuk eritrositleri kullanıldı. Agar metodunda tavşan eritrositlerinin tavuk ve koyun eritrositlerine göre hemolizine daha daha duyarlı olduğu belirlendi. Hemolitik aktivite üzerine inkubasyon ısısının ve atmosfer koşullarının önemli etkisi olduğu bulundu. Hemolizi belirlemek için en uygun ortamın aerobik koşullarda ve 42 °C'de inkubasyon olduğu saptandı. C.jejuni suşlarının %80'i ve C.coli suşlarının %60'ı tavşan eritrositlerini 42 °C'de 4 gün inkubasyon sonucunda lize etti.

**Anahtar kelimeler:** Campylobacter jejuni, Campylobacter coli, hemoliz, tavuk

### Giriş

İnsanlarda ve hayvanlarda akut enteritise neden olan Campylobacter jejuni ve C. coli aynı zamanda hayvanların ve tüm kanatlıların gastrointestinal kanalında kommensal olarak bulunur (2,3,4,11). Termofilik campylobacter olarak da tanımlanan bu mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonların patogenezi henüz tam olarak anlaşılmamıştır.

Campylobacter türlerinin patojenitesinde, flagella, lipopolisakkarid ve dış membran proteinleri (OMP) oldukça önemlidir (10,15). Flagella, gastrointestinal sisteme kolonizasyonda, LPS ve OMP hücrelere yapışma, invazyon, serum dirençliliği, fagositoza dirençlilik ve demir kazanmada etkindir (8,15). Gastrointestinal sistem infeksiyonlarından izole edilen Campylobacter suşlarının, enterotoksin (ısıya duyarlı sitotoksik toksin) ve sitotoksin olmak üzere en az iki ekzotoksin sentezlendiği ve bu toksinlerin suşların patojenitesinde önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (6,7,13). Klasik kaynaklarda Campylobacter'lerin hemolitik aktiviteye sahip olmadıkları belirtilmesine karşın, son yıllarda yapılan çalışmalarda, Campylobacter türlerinin çeşitli hayvan eritrositlerini lize eden hemolizine sahip olduğu gösterilmiştir (1,5,10,12,14). Bu nedenle, hemolitik aktivitenin saptanmasında, hemolizi etkileyen faktörlerin bulunduğu anlaşılmaktadır. C.jejuni suşlarında hemolizin üretiminin pH, CO<sub>2</sub> konsantrasyonu ve inkubasyon süresi ile ilgili olduğunu saptanmıştır (10). C.jejuni suşlarının

besiyerindeki oluşturdukları hemoliz, Streptococcus pyogenes (beta hemolitik) ve S.pneumoniae (alfa hemolitik)'nin hemolizleri ile karşılaştırarak alfa-benzeri ve beta-benzeri hemoliz olarak sınıflandırılmıştır (10). Ayrıca tavuk orijinli suşların hemolitik aktiviteleri ile ilgili bir çalışma da yapılmamıştır.

Bu çalışmada, tavuklardan izole edilen C.jejuni ve C.coli suşlarının hemoliz özelliklerinin, agar ve mikropleyt yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

**Mikroorganizmalar:** Bu çalışmada, tavuk dışkılarından Blood-Free Campylobacter Selective agarda (Oxoid, sefoperazon 32 mg/L) izole edilen 10 adet C.jejuni ve 10 adet C.coli suşu kullanıldı. Suşların pasajlarının yapılmasında Muller-Hinton agar (Oxoid) kullanıldı. İzole edilen suşların identifikasyonları, biyokimyasal ve tolerans özelliklerine göre yapıldı (9). Bakteri süspansiyonları fosfat buffer solusyonunda (PBS, pH 7.2) hazırlandı.

**Eritrositler:** Tavşan, koyun ve tavuklardan steril sodyum sitrat (1:10) ile alınan kan, üç kez PBS ile yıkandı. Son yıkama işleminde üstte kalan sıvı kısım uzaklaştırılarak yıkanmış eritrosit elde edildi. Agar metodunda %2 mikropleyt metodunda ise %1'lik eritrosit kullanıldı.

**Agar Metodu:** PBS içinde %1 oranında agar ve %2 eritrosit bulunan besiyeri kullanıldı. Besiyeri otoklavda sterilize edildi ve 45 °C de %2 oranında

yıkanmış eritrosit ilavesi yapılarak petri kutularına (10 cm çapında) 15 ml miktarında döküldü. Tüm besiyerleri kurutulduktan sonra kullanıldı. PBS içinde hazırlanan bakteri süspansiyonlarından ( $10^8$  cfu/ml) bir petri kutusuna beş suş olmak üzere dairesel ekimler yapıldı. Ekim işlemi üç farklı türün eritrositlerini içeren agarlara dört seri olarak yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri aerobik ve mikroaerobik (%5 O<sub>2</sub>, %10 CO<sub>2</sub>, %85 N<sub>2</sub>) koşullarda 37 °C ve 42 °C'lerde 96 saat süreyle inkube edildi. Sonuçlar ekim bölgesinde oluşan lizise göre değerlendirildi.

**Mikropleyt metodu:** Bu metotta, 96 çukurlu ve "U" tabanlı mikropleytlar (Greiner) kullanıldı. Tüm çukurlara 50 µl PBS konuldu. Mikropleytların ilk çukurlarına test edilecek bakteri süspansiyonlarından ( $10^8$  cfu/ml) 50 µl ilave edildi ve iki katlı sulandırıldı. Daha sonra tüm çukurlara 100 µl, %1'lik eritrosit ilave edildi. Testler iki seri olarak yapıldı ve 37 °C ve 42 °C'de 96 saat süreyle inkube edildi. Bu süre sonunda eritrositlerde oluşan lizise göre sonuçlar değerlendirildi. Bu yöntemde ayrıca hemolitik aktivite titresi de saptandı. Steril PBS ve eritrosit süspansiyonu negatif kontrol olarak kullanıldı.

**İstatistik:** Gruplar arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde ki-kare yöntemi kullanıldı.

### Bulgular

Agar ve mikropleyt metodu sonuçları Tablo 1.de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, suşların hemolitik aktivitesini belirlemede tavşan eritrositlerinin kullanıldığı agar metodu ile mikropleyt yöntemi arasında önemli bir fark olmadığı belirlendi ( $p>0.05$ ). Aerobik koşullarda 42 °C'de inkube edilen 20 suşun 14'ü agarda ve 13'ü

mikropleytle tavşan eritrositlerini lize etti. Agar metodunda 37 °C'deki inkubasyonda 14 pozitif reaksiyon saptanırken, 42 °C'de 41 pozitif reaksiyon saptandı. Mikropleyt yönteminde ise 37 °C'deki inkubasyonda 14, 42 °C'de ise 23 pozitif reaksiyon belirlendi. Her iki metotta da hemoliz üzerine inkubasyon ısısının önemli bir faktör olduğu saptandı ( $p<0.05$ ).

İncelenen suşların hemolitik aktivitelerinin eritrositlerin orijinlerine göre değiştiği belirlendi. Agar metodunda koyun ve tavuk eritrositleri 11 reaksiyonda, tavşan eritrositleri 33 reaksiyonda pozitif bulundu. Mikropleyt metodunda tavuk eritrositlerinde 17 ve tavşan eritrositlerinde 20 pozitif reaksiyon saptandı. Mikropleyt metodunda koyun eritrositlerinde hemoliz belirlenemedi. Mikropleyt metodunda tavşan eritrositleri ile tavuk eritrositleri arasında önemli bir fark bulunamazken ( $p > 0.05$ ), agar metodunda tavşan eritrositleri ile diğer grup eritrositler arasındaki farkın önemli olduğu belirlendi ( $p<0.01$ ). Mikropleyt yönteminde, hemolitik aktivite 1:4-1:8 sulandırmalarda belirlenirken en yüksek hemolitik aktivite, bir C. jejuni suşunda tavşan eritrositleri üzerinde 1:32 sulandırmada saptandı.

C. jejuni ve C. coli suşları arasında 42 °C'de ve aerobik koşullarda inkube edilen tavşan eritrositi içeren agarda, 10 C. jejuni suşunun 8'inde ve 10 C.coli suşunun 6'sında hemolitik aktivite belirlendi. Mikropleyt metodunda ise 7 adet C.jejuni ve 6 adet C.coli suşunda pozitif sonuç elde edildi. Mikropleyt yönteminde C. jejuni ve C. coli suşları arasında pozitiflik oranı olarak 42 °C'de önemli bir fark bulunamazken, 37 °C'de C.jejuni suşlarının 5'i ve C.coli suşlarının sadece 2'si pozitif bulundu.

**Tablo 1.** C.jejuni ve C.coli suşlarının hemoliz sonuçları

Metod	Mikroorganizma	Aerobik 37° C			Aerobik 42° C			Mikroaerofilik 37° C			Mikroaerofilik 42° C		
		K <sup>a</sup>	T	Ta	K	T	Ta	K	T	Ta	K	T	Ta
Agar	C. jejuni <sup>b</sup>	1 <sup>d</sup>	1	0	3	8	4	2	5	1	1	5	2
	C. coli <sup>c</sup>	2	1	0	2	6	2	0	1	0	0	6	2
	<b>Toplam</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>4</b>
Mikropleyt	C. jejuni	0	5	5	0	7	6						
	C. coli	0	2	2	0	6	4						
	<b>Toplam</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>10</b>						

<sup>a</sup>: K: koyun, T: tavşan, Ta: tavuk eritrositi; <sup>b, c</sup>: 10 adet C.jejuni ve C.coli; <sup>d</sup>: pozitif suş sayısı

### Tartışma

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Campylobacter türlerinin patojenitesinde hemolizinlerin de önemli bir faktör olabileceği düşünülmektedir (1,5,10). Konu ile ilgili olarak bugüne kadar az sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada tavuk orijinli C.jejuni ve C.coli suşlarının

hemoliz özellikleri agar ve mikropleyt yöntemi ile araştırıldı.

Araştırmada hemolitik aktivitenin belirlenmesi için kullanılan her iki yöntemde de inkubasyon ortamının etkili olduğu saptandı. Hemolitik aktivitenin aerobik ve 42 °C'deki inkubasyonda optimal sonuç verdiği saptandı. Bu koşullarda inkube edilen suşların agar yönteminde %70'i ve mikropleyt yönteminde ise %65'i pozitif

sonuç verdi. Sonuçlar dikkate alındığında metodlar arasında önemli bir fark olmadığını gösterdi. *Campylobacter* türlerinin hemolitik aktivitelerini saptamak amacıyla Tay ve ark.(14), mikropleyt yönteminin agar yöntemine göre daha duyarlı olduğunu saptamışlar ve agar yönteminde %56 pozitiflik oranına karşılık mikropleyt yönteminde %94 oranında pozitiflik elde etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen mikropleyt yöntemi sonuçları, Tay ve ark.(14)'nın sonuçlarına göre düşük bulunmuştur. Bu farklılığın nedeni araştırmacıların sığır eritrositleri kullanmış olmasından kaynaklanabilir. Araştırmacılar agar yönteminde farklı eritrosit kullanmalarına karşılık mikropleyt yönteminde sadece sığır eritrositlerini kullanmışlardır.

Suşların hemolitik aktiviteleri üzerine inkubasyon ortamı ve ısı derecelerinin etkileri incelendiğinde, her iki metotta da aerobik koşullarda ve 42 °C'deki inkubasyonun hemolitik aktiviteyi artırıcı etki yaptığı belirlendi. Diğer ısı ve inkubasyon koşullarında inkubasyonun suşların hemolitik aktivitesini belirgin derecede azalttığı gözlemlendi. Bu faktörler ile ilgili diğer çalışmalarda, Tay ve ark. (14) yüksek inkubasyon ısısının hemolitik aktiviteyi etkilediğini belirtmişlerdir. *Campylobacter* türlerinin hemolitik aktiviteleri üzerine etkili faktörlerin araştırıldığı diğer bir çalışmada, Misawa ve ark.(10), *Campylobacter* türlerinde iki tip hemolizin olduğunu ve bunların pH ve inkubasyon süresi ile değiştiğini saptamışlardır.

Bu çalışmada *Campylobacter* türlerinin hemolitik aktiviteleri koyun, tavuk ve tavşan eritrositleri üzerinde test edildi. Her iki metotta da tavşan eritrositlerinin tavuk ve koyun eritrositlerine göre *Campylobacter* hemolizinlerine daha duyarlı olduğu belirlendi. Konu ile ilgili olarak Misawa ve ark.(10), eritrosit orijininin *Campylobacter* hemolizinleri için önemli olmadığını ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre koyun eritrositlerinin duyarlılığı ile tavşan eritrositlerinin duyarlılığı arasında önemli bir istatistiksel fark olması bu araştırmacıların sonuçları ile çelişmektedir.

C.jejuni suşlarının %80'i ve C.coli suşlarının %60'ı agar metodunda pozitif bulundu. Mikropleyt yönteminde her iki suşun 42 °C'de inkube edilen suşları arasında fark bulunamadı. Ancak 37 °C'de inkube edilen kültürlerde C.jejuni suşlarında %50 ve C.coli suşlarında %20 oranında pozitiflik saptandı. Tay ve ark.(14), inceledikleri *Campylobacter* suşlarında %94 oranında pozitiflik saptamıştır. Araştırmacıların elde ettikleri değerler, bu çalışmada elde edilen değerlere göre yüksektir. Bu yüksek değer, araştırmacıların çalışmada kullandıkları suşların klinik izolatlar olmaları ve metod farklılığı ile açıklanabilir.

Sonuç olarak bu çalışma ile, tavuk orijinli C.jejuni ve C.coli suşlarında hemolitik aktivite belirlendi. Bu çalışmada elde edilen veriler,

*Campylobacter* türlerinde hemolizin pozitifliği ile insan ve hayvanlarda *Campylobacter* infeksiyonlarının patogenezi arasında ilişkiyi belirlemek amacıyla yapılacak daha ileri çalışmalara ışık tutacak nitelik taşımaktadır.

#### Kaynaklar

- 1- Arimi, S.M., Park, R.W.A., Fricker, C.R. (1990) Study of haemolytic activity of some *Campylobacter* spp. on blood agar plates. *J. Appl. Bacteriol.*, 69,384-389.
- 2- Butzler, J.P., Skirrow, M.B. (1979) *Campylobacter* enteritis. *Clin. Gastroenterol.*, 8,737-765.
- 3- Diker, K.S. (1987) *Campylobacter* türlerinin çeşitli hayvanlardan izolasyonu ve zoonotik yönlerinin değerlendirilmesi. *Mikrobiol. Bül.*, 21,268-273.
- 4- Garcia, M.M., Eaglesome, M.D., Rigby, C. (1983) *Campylobacter* important in veterinary medicine. *Vet. Bull.*,53,793-818.
- 5- Hossain, A., Stewart-Tull, D.E.S., Freer, J.H. (1993) Heat-labile and heat-stable haemolysins of *C. jejuni*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 6,331-340.
- 6- Johnson, W.M., Lior, H. (1984). Toxins produced by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lancet* i, 229-230.
- 7- Klipstein, F.A., Engert, R.F., Short, H., Schenk, E.A. (1985) Pathogenic properties of *Campylobacter jejuni*: assay and correlation with clinical manifestations. *Infect. Immun.*, 50, 43-49.
- 8- Lindblom, G., Kaijser, B. (1995) In vitro studies of *Campylobacter jejuni/coli* strains from hens and humans regarding adherence, invasiveness, and toxigenicity. *Avian Dis.*, 39,718-722.
- 9- Lior, H. (1984) New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lariidis*. *J. Clin. Microbiol.*, 20,636-640.
- 10- Misawa, N., Hirayama, K., Itoh, K., Takahashi, E. (1995) Detection of alfa- and beta-hemolytic- like activity from *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, 33,729-731.
- 11- On, S.L.W. (1996) Identification methods for *Campylobacter*, *Helicobacter*, and related organisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 9,405-422.
- 12- Pickett, C.L., Aufferberg, T., Pesci, E.C., Sheen, V.L., Jusuf, S.S.D. (1992) Iron acquisition and haemolysin production by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.*, 60,3872-3877.
- 13- Ruiz-Palacios, G.M., Torres, J., Escamila, N.I., Ruiz-Palacios, B., Tamayo, J. (1983) Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni* characterization and clinical significance. *Lancet* ii,250-251.
- 14- Tay, S.T., Devi, S., Puthuchery, S.D., Kautner, I.M. (1995) Detection of haemolytic activity of *Campylobacter* by agarose haemolysis and microplate assay. *J. Microbiol.*, 42,175-180.
- 15- Walker, R.I., Caldwell, M.B., Lee, E.C., Guerry, P., Trust, T.J., Ruiz-Palacios, G.M. (1986) Pathophysiology of *Campylobacter enteritis*. *Microbiol. Rev.*, 50,81-94.