

ANNA SZOSLAND-FALTYN, BEATA BARTODZIEJSKA

Pracownia Mikrobiologii
Zakład Jakości Żywności
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego
Piłsudskiego 84, 92-202 Łódź
E-mail: anna.szosland@ibprs.pl

CAMPYLOBACTER JEJUNI KAMELEON WŚRÓD BAKTERII – FORMY MORFOLOGICZNE ORAZ ICH PATOGENNOŚĆ*

WPROWADZENIE

Kształt komórek bakteryjnych jest jedną z podstawowych (obok budowy ściany komórkowej, przetrwalników czy zdolności ruchu) cech morfologicznych umożliwiających ich identyfikację. Również nazewnictwo bakterii opiera się na kształcie komórek zaobserwowanym pod mikroskopem. Tymczasem, dzięki mikroskopii elektronicznej wykazano, że nie jest to cecha stała mikroorganizmów. Transformacja pałeczek bakteryjnych w formy sferyczne, ziarniakowate lub kokoidalne (ang. coccoid form, CF) jest właściwością coraz częściej potwierdzaną wśród drobnoustrojów Gram-ujemnych. Proces ten inicjowany jest stresowymi dla bakterii warunkami, np. niedoborem substancji odżywczych, podwyższoną temperaturą lub obecnością substancji toksycznych. Występowanie postaci CF związane jest ściśle z drugą formą morfologiczną bakterii, żywą, lecz nie dającą się hodować (ang. viable but non culturable, VBNC). Istnienie wspomnianych stanów wykazano m.in. dla takich drobnoustrojów jak: *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* oraz dla szerzej omawianego w artykule gatunku *Campylobacter jejuni* (KREBS i TAYLOR 2011, OLSZEWSKA i ŁANIEWSKA-TROKENHEIM 2013, MOGHOOFEI i współaut. 2015). Odkrycie odrębnych morfologicznie

form zapoczątkowało dyskusję na temat nie tylko stanu fizjologicznego i aktywności metabolicznej, ale również potencjalnej patogenności. Pałeczki *C. jejuni* są obecnie jednym z najczęstszych czynników etiologicznych zaburzeń żołądkowo-jelitowych u ludzi. Szeroko rozprzestrzenione w przyrodzie, wykrywane w produktach pochodzenia zwierzęcego oraz w zanieczyszczonej wodzie pitnej, mogą doprowadzić do zakażenia człowieka, które w ostrym przebiegu określane jest jako kampylobakterioza (PIETRZAK 2010). Czynnikiem odpowiedzialnym za wirulencję pałeczek *C. jejuni* są między innymi: zdolności ruchu, czynniki adhezyjne (CadF, JlpA, PEB1, MOMP, CapA, FlaC, FspA), zdolność do chemotaksji i energotaksji, obecność lipooligosacharydu i otoczki polisacharydowej, wytwarzanie toksyn i białek sekrecyjnych, obecność plazmidu czy też zmienność genetyczna (FRIRDICH i współaut. 2012, MELO i współaut. 2013, ROKOSZ-CHUDZIAK i RASTAWICKI 2014, KOOLMAN i współaut. 2016). Ze względu na nie w pełni wyjaśniony mechanizm chorobotwórczości *C. jejuni* sugeruje się, że odmienne stadia rozwoju mogą również odgrywać istotną rolę w przeżyciu i rozprzestrzenianiu się tego patogenu w środowisku, jak również w wirulencji. Celem artykułu jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat morfologicznych form *C. jejuni* i czynników stymulujących ich powstanie, a także ich znaczenia w patogenności tej pałeczki.

Słowa kluczowe: *Campylobacter jejuni*, formy morfologiczne, patogen

*Publikacja została sfinansowana ze środków tematu badawczego: „Zdolności adhezyjne szczepów *Campylobacter* spp. wyizolowanych z mięsa drobiowego”. Badania statutowe Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego Zakładu Jakości Żywności Pracowni Mikrobiologii w Łodzi nr tematu: 500-01-ZJ-01.

FORMY PAŁECZKOWATE *C. JEJUNI* I ICH MECHANIZM PATOGENNOŚCI

W badaniu mikroskopowym *C. jejuni* jest Gram-ujemną, helikalną pałeczką o zagiętym kształcie, długości do 5,0 μm i szerokości do 0,8 μm , nie tworzącą spor. Jest termofilnym, mikroaerofilnym i kapnofilnym gatunkiem wymagającym do wzrostu atmosfery o zwiększonej zawartości dwutlenku węgla. Wykazuje ruch korkociągowy. Jest to możliwe dzięki obecności pojedynczej rzęski, zbudowanej z ciała podstawowego, haka i filamentu, umieszczonej na jednym, bądź na obu biegunach komórki (SILVA i współaut. 2011, FRIRDICH i współaut. 2012, EPPS i współaut. 2013, BOLTON 2015, JOSEFSEN i współaut. 2015). Filament rzęski składa się z dwóch homologicznych białek FlaA i FlaB (z przewagą tego pierwszego), kodowanych przez dwa geny, odpowiednio *flaA* i *flaB*. Wyłączenie obu genów powoduje powstanie nieruchliwych mutantów pałeczek *C. jejuni*, przez co obniża się ich zdolność do kolonizacji i inwazji śluzówki jelita (MELO i współaut. 2013, ROKOSZ-CHUDZIAK i RASTAWICKI 2014). Pałeczki *C. jejuni* cechuje ponadto obecność białka CadF (ang. *Campylobacter adhesion to fibronectin*) o masie 37 kDa. Białko CadF odgrywa istotną rolę w patogenie zakażenia, łącząc się z fibronektyną enterocytów nabłonka jelit, i umożliwiając w ten sposób adhezję bakterii do komórek nabłonka. Mutanty *C. jejuni* nieprodukujące białka CadF nie mają zdolności do kolonizacji komórek nabłonkowych (ROKOSZ-CHUDZIAK i RASTAWICKI 2014). Kolejnym z mechanizmów wirulencji pałeczek *C. jejuni* jest zdolność produkcji toksyn. Najlepiej poznana z nich jest cytoletalna genotoksyna (ang. *cytolethal distending toxin*, CDT), kodowana przez trzy geny: *cdtA* i *cdtB* *cdtC*. Mechanizm działania tej toksyny polega na uszkodzeniu materiału genetycznego komórek eukariotycznych, zatrzymania ich cyklu komórkowego i śmierci. Dla zachowania pełnej aktywności przez toksynę CDT konieczna jest obecność trzech podjednostek genowych (LAI i współaut. 2016).

W odpowiedzi na stres wywołany głodem, zbyt wysoką lub niską temperaturą, hiperosmolarnością, niskim pH, obecnością tlenu, formy pałeczkowate (ang. rod form, RF) *C. jejuni* przechodzą zmiany morfologiczne i metaboliczne, prowadzące do ekspresji ściśle określonych genów, regulowanych na poziomie transkrypcji i translacji. Do najczęściej wymienianych w literaturze genów, których produkty uczestniczą w odpowiedzi komórki na stres należą: *spoT*, *fliA*, *rpoD* i

rpoN, *htrA*. Białko SpoT, produkt genu *spoT* uczestniczy w degradacji nukleotydu czterofoforanu guanozynowego (ppGpp) w reakcji pirofosforolizy. ppGpp jest cząsteczką sygnałową, generowaną pod wpływem zmian środowiskowych. Dzięki niej w komórce bakteryjnej następuje ograniczenie wielu aktywności metabolicznych, co określa się mianem odpowiedzi ścisłej. Za inicjację transkrypcji genów odpowiedzialne są alternatywne czynniki sigma, które w kompleksie z rdzeniem polimerazy RNA regulują ten proces. Do alternatywnych czynników sigma charakterystycznych dla *C. jejuni* należą trzy: FliA (sigma28), RpoD (sigma54), RpoN (sigma 54). Czynniki te są kodowane odpowiednio przez geny *fliA*, *rpoD* i *rpoN* i odpowiedzialne są między innymi za biosyntezę flageliny, ruchliwość, wydzielanie białek i inwazyjność (NIEROP GROOT i współaut. 2014).

FORMY KOKOIDALNE

Początkowo przyjmowano, iż jedyną formą morfologiczną *C. jejuni* jest postać pałeczkowata. Jednak w 1962 r. ukazały się publikacje na temat form kokoidalnych występujących u bakterii *Campylobacter* spp. Dotyczyły one innego gatunku, *Vibrio fetus*, który w 1994 r. został zaklasyfikowany do rodziny *Campylobacteraceae* (OGG 1962). W 1993 r. Griffiths wykazał, że transformacja komórek *C. jejuni* zależna jest od faz wzrostu. Formy pałeczkowate charakterystyczne są dla fazy logarytmicznego wzrostu, zaś postaci CF dla fazy stacjonarnej. Dalsze badania wykazały, że formy kokoidalne, mimo obecności rzęsek, pozbawione są ruchu. Będąc w stanie uśpienia, wykazują deficyt energii potrzebnej do rotacji wici, pochodzącej z gradientu protonów w poprzek wewnętrznej błony cytoplazmatycznej (MOORE 2001). Mikroskopia elektronowa wykazała odmienną wielkość komórek kokoidalnych od form pałeczkowatych oraz różnice w budowie ściany komórkowej, co potwierdziło także barwienie Grama. Komórki w formie CF nie były zdolne zatrzymać odpowiedniej ilości fuksyny czy safraniny. W porównaniu do form pałeczkowatych, komórki kokoidalne charakteryzowały się niższą zawartością kwasów nukleinowych i polipeptydów, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa. Ponadto, zawierały mniej peptydoglikanu, który w trakcie przechodzenia komórek w stadium kokoidalne ulegał częściowej degradacji. Podejrzewa się, że pewną rolę w przemianie do formy kokoidalnej mogą odgrywać następujące białka:

- AmiA amidaza N-acetyl-muramyl-L-alaninowa (amidaza N-MurAc- L-Ala), enzym z grupy hydrolaz hydrolizujący peptydoglikan;

- PBP 2 uczestniczące w syntezie mureiny, tworzącej cylindryczną część komórki tzw. mureinę elongacyjną;

- RodA regulujące aktywność PBP 2 i wraz z nim tworzące kompleks syntetazy peptydoglikanu;

- MreB aktywnopodobne białko stabilizujące kształt komórki, nadające jej sztywność oraz odpowiedzialne za utrzymanie stałej szerokości komórki.

Pomimo stwierdzenia obecności w genomie *C. jejuni* genów *amiA*, *mreB*, *pbp2* i *rodA* kodujących te białka, ich rola w powstawaniu form CF nie jest jednak w pełni wyjaśniona (CHAPUT i współaut. 2006). Nadal ukazują się sprzeczne informacje co do żywotności form kokoidalnych.

FORMY VBNC

Pierwsze wzmianki na temat istnienia stadium VBNC bakterii pojawiły się w latach 89. XX w. Od tego momentu wykrywa się coraz więcej drobnoustrojów mających tę zdolność, wraz z czynnikami stymulującymi przechodzenie w ten stan. Stadium VBNC komórek cechuje brak zdolności wzrostu na znanych klasycznych pożywkach hodowlanych, a indukowane jest, podobnie jak przy przechodzeniu w formy CF, niesprzyjającymi warunkami środowiska (OLSZEWSKA i ŁANIEWSKA-TROKENHEIM 2013, ADAMIAK i współaut. 2015). Pałeczki wchodzące w stan VBNC podlegają morfologicznym, fizjologicznym i genetycznym przemianom, które pozwalają im przetrwać w niesprzyjającym środowisku przez dłuższy czas, zachowując zdolność infekcji. Przemiany te są odwracalne. W stanie VBNC komórki wydłużają się lub przechodzą w formę kulistą, mogą zmniejszać swoją objętość od 15 do 300 razy. Następuje stabilizacja ściany i błony komórkowej, wzrost gęstości cytoplazmy, poprzez zmniejszenie ilości lipidów i białek, spadek zawartości kwasów nukleinowych i rybosomów. W składzie błon komórkowych form VBNC pojawiają się białka indukowane stresem, m.in. białka szoku cieplnego należące do grupy Hsp (ang. heat shock protein), białka głodowe (ang. starvation proteins), w wyniku czego powstałe formy wykazują zdecydowanie większą oporność na niekorzystne warunki. W celu podtrzymania potencjału membranowego obserwuje się też obniżenie transportu aktywnego i aktywności respiracyjnej. Komórki *C. jejuni* w stanie VBNC charakteryzują się wirulencją oraz adherencją do różnego typu powierzchni abiotycznych. Mogą wchodzić w skład biofilmu znacznie oporniejszego na biocydy niż komórki planktoniczne.

W doświadczeniach PATRONE i współaut. (2013) przez trzy tygodnie obserwowano w formach VBNC *C. jejuni* wysoki poziom ekspresji genu *cadF*. Ponadto, bakterie w stadium VBNC były zdolne w warunkach *in vitro* przylegać do komórek nabłonka jelitowego linii komórkowej Caco-2. Należy jednak podkreślić, że zdolność powrotu ze stanu VBNC do formy wegetatywnej zależy od stopnia intensywności zmian postępujących w komórce oraz od długości okresu przebywania w takiej postaci, gdyż przekroczenie pewnej granicy może doprowadzić do rozpadu komórki zamiast do jej reaktywacji. Właściwość ta jest jednak bardzo indywidualna i zależna od rodzaju drobnoustroju, a nawet szczepu.

CZYNNIKI STYMULUJĄCE INDUKCJĘ INNYCH NIŻ PAŁECZKOWATE FORM *C. JEJUNI*

Wśród warunków mogących wpływać na indukcję innych niż RF stanów *C. jejuni* należy wymienić przede wszystkim stres temperaturowy, stres oksydacyjny, niedobór substancji odżywczych, obecność substancji toksycznych i programowaną śmierć komórki - apoptozę (KONOPELSKI i DYNOWSKA 2014). Potwierdzają to badania KLANČNI i współaut. (2009). Wynika z nich, że w trakcie długiego czasu inkubacji *C. jejuni* wynoszącego 42 dni, w warunkach głodowych 80% komórek bakteryjnych uległo transformacji do form kokoidalnych. Jednocześnie, w hodowli stwierdzano obecność form VBNC co sugeruje, że jest to zupełnie odmienne stadium niż CF. HE i CHEN (2010), hodując przez tydzień *C. jejuni* w warunkach stresowych (w atmosferze tlenowej, temperaturze 25°C i w podłożu ubogim pod względem składników odżywczych), otrzymali 99% komórek w formie kokoidalnej, lecz nie dającej się wyhodować. W doświadczeniach OH i współaut. (2015), z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego dowiedziono, że w warunkach stresu oksydacyjnego, trwającego dwanaście godzin, 49% populacji *C. jejuni* przyjmowało postać kokoidalną, podczas gdy w warunkach mikroaerofilnych formy te stanowiły zaledwie ok. 3%. CHAISOWWONG i współaut. (2012), inkubując przez 38 dni w temperaturze 4°C bakterie *C. jejuni* otrzymali, barwiąc fluorescencyjnie zestawem Baclight, 70% żywych, lecz nie dających się hodować bakterii. Naukowcy potwierdzili, że stres zimna indukuje powstanie form VBNC, w których dochodzi do ekspresji genów odpowiedzialnych za wirulencję tj. *flaA*, *flaB*, *cadF*, *ciaB*, *cdtA*, *cdtB* i *cdx*, co stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego.

PODSUMOWANIE

Znalezienie odpowiedzi na pytania, czy istnienie innych form niż pałeczki *C. jejuni* jest sposobem na przetrwanie tej bakterii poza organizmem gospodarza, jakie inne czynniki stymulują przekształcanie do postaci CF i VBNC oraz wyjaśnienie mechanizmu transformacji, może być podstawą zrozumienia chorobotwórczości tej bakterii oraz opracowania skutecznych metod jej inaktywacji.

Streszczenie

Pałeczki *Campylobacter jejuni* są obecnie jednym z najczęstszych czynników etiologicznych zaburzeń żołądkowo-jelitowych u ludzi. Szeroko rozprzestrzenione w przyrodzie, wykrywane w produktach pochodzenia zwierzęcego oraz w zanieczyszczonej wodzie pitnej, mogą doprowadzić do zakażenia człowieka, które w ostrym przebiegu określane jest jako kamylobakterioza. Wyniki badań przemawiają za tym, że w przeżyciu i ekspansji tego patogenu w środowisku, jak również w wirulencji, istotną rolę mogą odgrywać odmienne morfologicznie stadia komórkowe *C. jejuni*. Celem artykułu jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy na temat transformacji pałeczek *C. jejuni* do innych form oraz czynników stymulujących te procesy, a także ich znaczenia w patogenności tej bakterii.

LITERATURA

- ADAMIAK J., OTLEWSKA A., GUTAROWSKA B., 2015. *Współczesne metody stosowane w analizie biodeterioracji obiektów zabytkowych*. Kosmos 64, 57-69.
- BOLTON D. J., 2015. *Campylobacter virulence and survival factors*. Food Microbiol. 48, 99-108.
- CHAIOWWONG W., KUSUMOTO A., HASHIMOTO M., HARADA T., MAKLON K., KAWAMOTO K., 2012. *Physiological characterization of Campylobacter jejuni under cold stresses conditions: its potential for public threat*. J. Vet. Med. Sci. 74, 43-50.
- CHAPUT C., ECOBICHON C., CAYET N., GIRARDIN S. E., WERTS C., GUADAGNINI S., PRÉVOST M.-C., MENGIN-LECREULX D., LABIGNE A., BONECA I. G., 2006. *Role of AmiA in the morphological transition of Helicobacter pylori and in immune escape*. PLoS Pathog. 2, 97.
- EPPS S. V. R., HARVEY R. B., HUME M. E., PHILLIPS T. D., ANDERSON R. C., NISBET D. J., 2013. *Foodborne Campylobacter: infections, metabolism, pathogenesis and reservoirs*. Int. J. Environ. Res. Publ. Health 10, 6292-6304.
- FRIRDICH E., BIBOY J., ADAMS C., LEE J., ELLERMEIER J., GIELDA L. D., DIRITA V. J., GIRARDIN S. E., VOLLMER W., GAYNO E. C., 2012. *Peptidoglycan-modifying enzyme Pgp1 is required for helical cell shape and pathogenicity traits in Campylobacter jejuni*. PLoS Pathog. 8, 1002602.
- HE Y., CHEN C.-Y., 2010. *Quantitative analysis of viable, stressed and dead cells of Campylobacter jejuni strain 81-176*. Food Microbiol. 27, 439-446.
- JOSEFSEN M. H., BHUNIA A. K., ENGVALL O. E., FACHMANN M. S. R., HOORFAR J., 2015. *Monitoring Campylobacter in the poultry production chain- from culture to genes and beyond*. J. Microbiol. Meth. 112, 118-125.
- KLANČNI A., GUZEJ B., JAMNIK P., VUČKOVIĆ D., ABRAM M., SMOLE MOŽINA S., 2009. *Stress response and pathogenic potential of Campylobacter jejuni cells exposed to starvation*. Res Microbiol. 160, 345-352.
- KONOPELSKI P., DYNOWSKA A., 2014. *Programowana śmierć komórki a białka z rodziny inhibitorów apoptozy (IAP) i ich rola w nowotworzeniu*. Kosmos 63, 1-12.
- KOOLMAN L., WHYTE P., BURGESS C., BOLTON D., 2016. *Virulence gene expression, adhesion and invasion of Campylobacter jejuni exposed to oxidative stress (H₂O₂)*. Inter. J. Food Microbiol. 220, 33-38.
- KREBS S. J., TAYLOR R. K., 2011. *Nutrient-dependent, rapid transition of Vibrio cholera to coccoid morphology and expression of the toxin co-regulated pilus in this form*. Microbiol. 157, 2942-2953.
- LAI C. K., CHEN Y. A., LIN C. J., LIN H. J., KAO M. C., HUANG M. Z., LIN Y. H., CHIANG-NI C., CHEN C. J., LO U. G., LIN L. C., LIN H., HSIEH J. T., LAI C. H., 2016. *Molecular mechanisms and potential clinical applications of Campylobacter jejuni cytolethal distending toxin*. Front. Cell. Infect. Microbiol., doi: 10.3389/fcimb.2016.00009.
- MELO R. T., NALEVAIKO P. C., MENDONÇA E. P., BORGES L. W., FONSECA B. B., BELETTI M. E., ROSSI D. A., 2013. *Campylobacter jejuni strains isolated from chicken meat harbour several virulence factors and represent a potential risk to humans*. Food Control. 33, 227-231.
- MOGHOOFEI M., FAZELI H., POURSINA F., ESFAHANI B. N., MOGHIM S., VAEZ H., HADIFAR S., SAFAEI H. G., 2015. *Morphological and bactericidal effects of amikacin, meropenem and imipenem on Pseudomonas aeruginosa*. Jundishapur J. Microbiol. 8, 1-5.
- MOORE J. E., 2001. *Bacterial dormancy in Campylobacter: abstract theory or cause for concern?* Int. J. Food Sci. Technol. 36, 593-600.
- NIEROP GROOT M. N., DE BOER A. G., VAN PELT W., VAN DER HULST-VAN ARKEL M. C., DE LEUW P., WIDJAJA H. C., SMITS M. A., VAN DER WAL F. J., 2014. *A SpoT polymorphism correlates with chill stress survival and is prevalent in clinical isolates of Campylobacter jejuni*. Poultry. Sci. 93, 2900-2909.
- OGG J. E., 1962. *Studies on the coccoid form of ovine Vibrio fetus I. Cultural and serologic investigations*. Am. J. Vet. Res. 23, 354-358.
- OH E., MCMULLEN L., BYEONGHWA J., 2015. *Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in Campylobacter jejuni under aerobic conditions*. Front. Microbiol. 6, 1-8.
- OLSZEWSKA M., ŁANIEWSKA-TROKENHEIM Ł., 2013. *Odpowiedź bakterii fermentacji mlekowej na stres - stadium VBNC*. Żyw. Nauk. Technol. Jak. 5, 15-28.
- PATRONE V., CAMPANA R., VALLORANI L., DOMINICI S., FEDERICI S., CASADEI L., GIOACCHINI A. M., STOCCHI V., BAFFONE W., 2013. *CadF expression in Campylobacter jejuni strains incubated under low-temperature water microcosm conditions which induce the viable but non-culturable (VBNC) state*. Anton. Leeuw. 103, 979-988.
- PIETRZAK D., 2010. *Perspektywy stosowania wysokich ciśnień w produkcji żywności wygodnej z mięsa drobiowego*. Żyw. Nauk. Technol. Jak. 2, 16-28.
- ROKOSZ-CHUDZIAK N., RASTAWICKI W., 2014. *Wybrane mechanizmy chorobotwórczości pałeczek*

Campylobacter jejuni. Med. Dośw. Mikrob. 66, 47-58.
SILVA J., LEITE D., FERNANDES M., MENA C., GIBBS P. A., TEIXEIRA P., 2011. *Campylobacter spp.*

as a foodborne pathogen: A review. Front. Microbiol. 2, 1-12.

KOSMOS Vol. 67, 3, 591-595, 2018

ANNA SZOSLAND-FALTYN, BEATA BARTODZIEJSKA

Laboratory of Microbiology, Department of Food Quality, Piłsudskiego 84, 92-202, Łódź, Poland, E-mail: anna.szosland@ibprs.pl

CAMPYLOBACTER JEJUNI A CHAMELEON AMONG BACTERIA – MORPHOLOGICAL FORMS AND THEIR PATHOGENICITY

Summary

The rods of *Campylobacter jejuni* are currently regarded as one of the most common etiologic agents of gastrointestinal disorders in humans. Widespread occurrence in nature, presence in contaminated animal products, and in drinking water can lead to human infection, which in the acute form is called as campylobacteriosis. Results of studies suggest, that distinct morphological stages of the *C. jejuni* cells may play an important role in the expansion and survival of the pathogen in the environment, as well as for their virulence. The aim of this paper is to present the current state of knowledge on the transformation of *C. jejuni* into other forms and factors that stimulate these processes, and also their significance for the pathogenicity of the bacteria.

Key words: *Campylobacter jejuni*, morphological forms, pathogen