MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2013, 65: 233 - 243

Analiza profilu genetycznych markerów chorobotwórczości pałeczek *Yersinia enterocolitica* bioserotypu 1B/O8 wyizolowanych z materiału klinicznego w Polsce w 2009 r.

Investigation of molecular virulence factors of *Yersinia enterocolitica* 1B/O8 human clinical isolates collected in Poland in 2009

Katarzyna Zacharczuk

Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Przeprowadzono analizę częstości występowania wybranych markerów chorobotwórczości u pałeczek *Yersinia enterocolitica* należących do bioserotypu 1B/O8 wyizolowanych z materiału klinicznego w Polsce w 2009 r. z użyciem metody multiplex-PCR. Wszystkie badane izolaty *Y. enterocolitica* 1B/O8 wyosobnione w Polsce posiadały ten sam wirulotyp (*ail*$^+$, *ystA*$^+$, *myfA*$^+$, *myfB*$^+$, *myfC*$^+$, *irp1*$^+$, *irp2*$^+$, *fuyA*$^+$, *yst1*$^+$, *chiY*$^+$, *ysrS*$^+$). Badane izolaty posiadały podstawowy zestaw determinant chorobotwórczości (*ail*$^+$, *ystA*$^+$, *myfA*$^+$, *myfB*$^+$, *myfC*$^+$) obecny zarówno u szczepów należących do amerykańskiej jak i europejskiej linii filogenetycznej tego gatunku. Obecność genów warunkujących wytwarzanie jersiniabaktyny (*irp1*$^+$, *irp2*$^+$, *fuyA*$^+$), chromosomalnego systemu sekrecji białek Ysa (*chiY*$^+$, *ysrS*$^+$) oraz Yst1 (*yst1*$^+$) świadczyła o przynależności badanych izolatów do grupy wysoce zjadliwych szczepów amerykańskich podgatunku *Y. enterocolitica* ssp. *enterocolitica*.

Słowa kluczowe: *Yersinia enterocolitica bioserotyp1B/O8, czynniki chorobotwórczości, wirulotypowanie, multiplex – PCR*

ABSTRACT

Introduction: The high-pathogenicity *Y. enterocolitica* bioserotype 1B/O8 has been isolated from human clinical samples since 2004 year in Poland. The group of "American" strains of *Y. enterocolitica* is considered to be the second, major causative agent of yersiniosis in Poland, after the predominant bioserotype 4/O3. The high-pathogenicity of *Y. enterocolitica* 1B/O8 is likely attributed to the presence of a couple of chromosomally encoded virulence factors including yersiniabactin (Ybt). The aim of the present study was to examine the

occurrence of known virulence factors in human clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 1B/O8, isolated in Poland.
Methods: The group of 64 isolates of *Y. enterocolitica* bioserotype 1B/O8, isolated from clinical specimens in Poland in 2009 year was examined for the presence of the selected virulence determinants by multiplex-PCR.
Results: All of the tested *Y. enterocolitica* 1B/O8 isolates have the same virulotype (*ail*$^+$, *ystA*$^+$, *myfA*$^+$, *myfB*$^+$, *myfC*$^+$, *irp1*$^+$, *irp2*$^+$, *fuyA*$^+$, *yst1*$^+$, *chiY*$^+$, *ysrS*$^+$), specific for the high-pathogenicity American strains of *Y. enterocolitica.*
Conclusions: Presence of the genes encoding yersiniabactin (*irp1*$^+$, *irp2*$^+$, *fuyA*$^+$), chromosomal secretion system Ysa (*chiY*$^+$, *ysrS*$^+$) and Yst1 (*yst1*$^+$) may argue for the extended pathogenic potential of the *Y. enterocolitica* bioserotype 1B/O8 in Poland.

Key words*: Yersinia enterocolitica, bioserotype1B/O8, virulotype, multiplex – PCR*

WSTĘP

Chorobotwórcze pałeczki *Yersinia enterocolitica* wywołują u ludzi odzwierzęcą chorobę zakaźną zwaną jersiniozą, przebiegającą najczęściej pod postacią zatrucia pokarmowego, powodując stan zapalny jelita cienkiego i węzłów chłonnych krezki. Zakażenie tymi drobnoustrojami może mieć również przebieg uogólniony (np. ropnie narządów wewnętrznych) oraz prowadzić do wystąpienia powikłań w postaci rumienia guzowatego czy reaktywnego zapalenia stawów (3).

W obrębie gatunku *Y. enterocolitica* wyróżnia się 2 główne podgatunki, linie filogenetyczne: *Y. enterocolitica* ssp. *enterocolitica* (linia filogenetyczna amerykańska) i *Y. enterocolitica* ssp. *palearctica* (linia filogenetyczna europejska) oraz trzecią grupę: pałeczki *Y. enterocolitica* należące do biotypu 1A. Pierwsza wymieniona grupa jest reprezentowana głównie przez wysoce chorobotwórcze („high-pathogenicity") szczepy amerykańskie należące przede wszystkim do bioserotypu 1B/O8. Do podgatunku *Y. enterocolitica* ssp. *palearctica*, zaliczane są szczepy europejskie o niskim potencjale chorobotwórczym („weakly-pathogenicity"), należące do biotypu 2-5 i różnych grup serologicznych (m.in.: O3; O9; O5,27). Natomiast pałeczki *Y. enterocolitica* 1A powszechnie uznawane są za niechorobotwórcze dla ludzi (3, 6, 25).

Obecnie dominującym czynnikiem etiologicznym jersiniozy na świecie są szczepy europejskie, wśród których przeważają pałeczki *Y. enterocolitica* należące do bioserotypu 4/O3, w mniejszym stopniu do bioserotypu 2/O9. W Polsce istotnym etiologicznym czynnikiem jersiniozy są pałeczki *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8. Pojawienie się w 2004 r. po raz pierwszy w kraju amerykańskich szczepów *Y. enterocolitica* wzbudziło obawy ze względu na wysoki potencjał chorobotwórczy przypisywany tym drobnoustrojom. Na przestrzeni kolejnych lat liczba wykrytych przypadków jersiniozy, wywoływanych przez pałeczki z bioserotypu 1B/O8 systematycznie wzrastała i jednocześnie doszło do rozprzestrzenienia się tych drobnoustrojów na terenie całego kraju (10, 26, 27). Przeprowadzone w Polsce badania dotyczące bakterii *Y. enterocolitica* 1B/O8 wyosobnionych od ludzi w latach 2004-2008 wykazały wysokie genetyczne podobieństwo tych izolatów i wskazywało na ich wspólne źródło pochodzenia (14, 15).

Wśród najważniejszych determinant wirulencji odpowiedzialnych za chorobotwórczość pałeczek *Y. enterocolitica* wyróżnia się plazmid wirulencji *pYV* (for *Yersinia* virulence plasmid), o wielkości 70 kb, obecny również u pałeczek *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis*. W obrębie plazmidu *pYV* znajdują się geny kodujące poszczególne czynniki chorobotwórczości, takie jak: system sekrecji typu III (T3SS), określany mianem Ysc (Yersinia secretion system), a także adhezynę YadA (3, 4). Determinanty chorobotwórczości kodowane chromosomalnie to: białko inwazyna (Inv), adhezyna Ail, enterotoksyna YstA oraz fmbrie Myf. Działanie efektorowych, plazmidowych białek Yop, które są wydzielane bezpośrednio do komórki eukariotycznej za pośrednictwem systemu Ysc (T3SS) zapewnia pałeczkom *Y. enterocolitica* ochronę przed odpowiedzią układu immunologicznego oraz umożliwia zewnątrzkomórkowe namnażanie się w organizmie gospodarza. Cząsteczki białka YadA pałeczek *Yersinia* pełnią funkcję adhezyny, umożliwiającej ścisły kontakt komórki bakteryjnej z komórką gospodarza oraz chronią bakterie m.in. przed bakteriobójczym działaniem układu dopełniacza. W procesie adhezji do komórek eukariotycznych oraz wnikaniu do ich wnętrza ważną rolę pełni białko błony zewnętrznej Ail oraz białko Inv (2, 3, 4). Fimbrie Myf prawdopodobnie biorą udział w kolonizacji jelita poprzez zwiększenie zdolności adhezyjnych bakterii do komórek nabłonka jelitowego, enterocytów oraz chronią bakterie przed fagocytozą (19).

Drobnoustroje *Y. enterocolitica* ssp. *enterocolitica* określane mianem wysoce chorobotwórczych (high-pathogenicity) przedstawicieli swojego gatunku, oprócz charakterystycznych czynników wirulencji dla wszystkich chorobotwórczych pałeczek *Y. enterocolitica*, które zostały wymienione powyżej, posiadają dodatkowe determinanty wirulencji. Należąca do nich yersiniabaktyna Ybt, jest sideroforem stanowiącym kluczowy element aktywnego systemu pozyskiwania żelaza, natomiast fosfolipaza A (YplaA) posiada zdolność do uszkadzania błon komórek eukariotycznych (5, 32). Rola systemu sekrecji białek Ysa (system chromosomalny sekrecji typu III, (T3SS)) oraz Yst1 (chromosomalny system transportu białek typu II, (T2SS)) nie została dotychczas dokładnie określona. Przypuszcza się, iż pierwszy z nich, system Ysa może odgrywać istotną rolę w początkowej fazie zakażenia, inwazji i kolonizacji tkanki jelita. W późniejszych etapach zakażenia, obejmujących wnikanie komórek bakteryjnych do głębszych tkanek organizmu prawdopodobnie bierze udział system Yst1 (9, 20).

Celem opisanych w niniejszej pracy badań była ocena częstości występowania genetycznych determinant chorobotwórczości u pałeczek *Yersinia enterocolitica* bioserotypu 1B/O8 wyizolowanych z materiału klinicznego w Polsce w 2009 r. Prezentowane wyniki stanowią cześć badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej pt:" Molekularna charakterystyka pałeczek *Yersinia enterocolitica* 1B/O8 wyizolowanych od ludzi w Polsce w 2009 roku" (NIZP-PZH, Warszawa, 2012).

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Materiał do prezentowanych badań stanowiły 64 izolaty *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8 wyosobnione w Polsce z materiału klinicznego od ludzi w 2009 roku, pochodzące z kolekcji Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH. W badaniach posłużono się również szczepami referencyjnymi *Y. enterocolitica* 1B/O8 z kolekcji Referencyjnego

Ośrodka WHO ds. Yersinia (Instytut Pasteura, Francja) (n=10) i kolekcji Instytutu Max von Pettenkofer w Monachium (n=1, szczep WA-314), 3 szczepami kontrolnymi *Y. enterocolitica* 1B/O8 (DM0110, DM0102, DM0138), wyizolowanymi w Polsce w latach 2004 – 2008 (kolekcja Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH) i szczepem kontrolnym *Y. enterocolitica* 4/O3 (DM0002, kolekcja Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH). Dodatkowo badaniom poddano 20 szczepów potencjalnie niepatogennych pałeczek *Y. enterocolitica* biotypu 1A, wyosobnionych od ludzi (n=5) oraz świń (n=15). Pozostałe szczepy referencyjne *Y. enterocolitica*, które zostały użyte w pracy: *Y. enterocolitica* 108P (bioserotyp 4/O3), *Y. enterocolitica* 96P (bioserotyp 2/O9), *Y. enterocolitica* O5,27 (bioserotyp 2/O5,27) (kolekcja Instytutu Max von Pettenkofer w Monachium).

Izolacja DNA. Izolację genomowego DNA badanych izolatów wykonano zgodnie z opisaną wcześniej procedurą (13).

Badanie metodą multiplex-PCR. Do wykrywania obecności fragmentów genów kodujących wybrane genetyczne determinanty chorobotwórczości pałeczek *Y. enterocolitica* zastosowano technikę PCR. Sekwencje nukleotydowe starterów oraz funkcje poszczególnych, poszukiwanych w pracy determinant podano w Tabeli 1. W badaniach posłużono się metodą multiplex-PCR, umożliwiającą w jednej reakcji PCR wykrycie kilku markerów chorobotwórczości. Zastosowano następujące układy multiplex-PCR: a) *ystA, ail, irp1,* 16S rRNA; b) *fuyA, irp2, ystA*; c) *chiY, ysrS, yst1M*, 16S rRNA; d) *myfA, myfB, myfC*.

W celu potwierdzenia prawidłowego przebiegu amplifikacji DNA jako kontroli dodatniej używano preparatu DNA uzyskanego ze szczepu referencyjnego *Y. enterocolitica* WA-314 (bioserotyp 1B/O8) oraz dodatkowo preparatu DNA szczepu *Y. enterocolitica* DM002 (bioserotyp 4/O3), zaś jako kontroli ujemnej mieszaniny reakcyjnej bez matrycowego DNA. Ponadto, jako dodatkową kontrolę dodatnią reakcji PCR zastosowano startery pozwalające na amplifikację genu 16S rRNA pałeczek *Y. enterocolitica,* w szczególności dla tych szczepów *Y. enterocolitica*, które nie posiadały wymienionych wyżej genów.

Reakcję PCR przeprowadzano w końcowej objętości 25 µl. Mieszanina reakcyjna zawierała: jałową wodę dejonizowaną, 2,5 µl 10 x buforu (Stratagene), 1 µl 25 mM roztworu MgCl2 (Fermentas), 0,5 µl mieszaniny deoksyrybonukleotydów - dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Sigma) (końcowe stężenie każdego deoksyrybonukleotydu – 10 mM), 1,5 µl mieszaniny starterów (w przypadku starterów 16S rRNA użyto ilości 0,25 µl mieszaniny starterów) (końcowe stężenie każdego ze starterów – 0,2 mM), 0,5 µl polimerazy DNA (Paq5000 Stratagene). W końcowym etapie dodawano preparatu matrycowego DNA w ilości 2,5 µl. Reakcję amplifikacji prowadzono w termocyklerze Mastercycler (Eppendorf).Warunki temperaturowe poszczególnych etapów reakcji amplifikacji: wstępna denaturacja w temperaturze 94 °C przez 5 min., następnie 35 cykli składających się z trzech etapów, kolejno denaturacji, przyłączania starterów (annealing), elongacji odpowiednio w temp. 94 °C przez 45 s, 58 °C przez 45 s i 72 °C przez 45s. Końcowe wydłużanie przez 5 min w temp. 72 °C.

Analiza elektroforetyczna. Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji PCR przeprowadzano w 2% lub 3% żelu agarozowym (MP Biomedicals, Francja) w buforze 1xTBE (90 mM Tris, 90 mM kwas borowy, 2 mM EDTA) przy napięciu prądu 90 V przez okres od 40 min. do 90 min., w zależności od planowanej długości drogi migracji DNA w żelu. Jako wzorca wielkości DNA używano markera GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

Tabela 1. Oznakowanie, sekwencja starterów, oczekiwana wielkość produktów amplifikacji obszaru DNA badanych szczepów *Y. enterocolitica*

Gen lub marker	Produkt ekspresji genu	Sekwencja startera (forward)	Sekwencja startera (reverse)	Oczekiwana wielkość produktu PCR (pz)	Piśmiennictwo
16S rRNA	-	GAGGATGACCAGCCACACTGG	CATCACGTGCTGGCAACAAAGG	842	(14)
ystA	Enterotoksyna YstA	AATGCTGTCTTCATTTGGAGC	GCAACATACATCACAGCAATC	163	(18)
ail	Adhezyna Ail	CCTGAAGTACCGTTATGAAC	TTGACGTCTTACTTGCACTG	251	(11)
myfA	MyfA, antygen Myf	CAGATACACCTGCCTTCCATCT	CTCGACATATTCCTCAACACGC	272	(12)
myfB	MyfB - peryplazmatyczne białko opiekuńcze	AAGTTTTCAGTGAGGACTGG	CTGTTGTCCATTACGGTGCC	458	Prezentowana praca
myfC	MyfC- białko błony zewnętrznej	CTGAATCTCAATTGGTCGCG	GTAAATCGGTAGTTTCCAGC	672	Prezentowana praca
irp1	syntetaza HMWP	GTACAGACCGCCTGCTCCAGTT	TGTAACCTACCTGCCTGTCGTC	412	(14)
irp2	syntetaza HMWP2	CTCCGCAGAACAGGTAGCCGA	CGACATACTCAATCTGTCCGG	500	(14)
fyuA	białko FuyA, receptor błony zewnętrznej	CTACGACATGCCGACAATGCC	TGCTTCCCGCGCCATAACGTG	650	(29)
yts1M	Yst1M, białko błony wewnętrznej systemu sekrecji Yst1	ACACAAAACCTACACAGCGC	CAACGTGGTGATATGAACCC	324	(14)
chiY	Przypuszczalnie substrat systemu sekrecji Yst1	CGATTCATTAGATCTGACGC	TCGAAATGAATAGCCAGTGC	618	(15)
ysrS	kinazaYsrS, element systemu dwuskładnikowego YsrS/ YsrR Ysa-PI	GCTCCTCATTACATAAATCGG	ATTCTCTCGTACAGATAGCG	455	(14)

WYNIKI

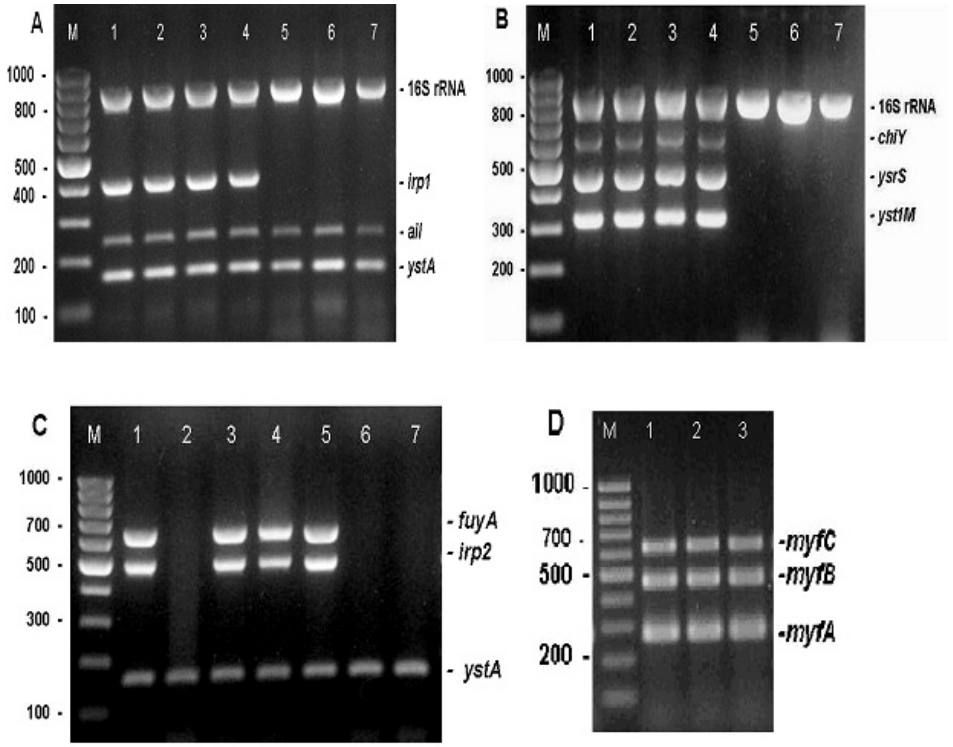
Występowanie markerów związanych z chorobotwórczością pałeczek *Y. enterocolitica* 1B/O8 w genomach badanych izolatów określano przy użyciu techniki multiplex - PCR. W badaniu analizowano występowanie genów związanych z: wytwarzaniem czynników wirulencji typowych dla chorobotwórczych pałeczek *Y. enterocolitica* tj.: enterotoksyny YstA (*ystA*); adhezyny Ail (*ail*); antygenu Myf (*myfA, myfB, myfC*) oraz aktywnością mechanizmów charakterystycznych dla podgatunku *Y. enterocolitica* ssp. *enterocolitica* tj.: zdolność do wytwarzania oraz transportu jersiniabaktyny (*irp1, irp2* oraz *fuyA*), chromosomalny system sekrecji białek typu drugiego Yst1 (*yst1M, chiY*) i trzeciego Ysa (*ysrS*) (Ryc.1). Izolaty *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8 wyosobnione na terenie Polski w 2009 roku, szczepy kontrolne *Y. enterocolitica* 1B/O8 wyosobnione w Polsce w latach 2004-2008, szczepy referencyjne pochodzące z kolekcji Ośrodka Referencyjnego WHO ds. *Yersinia,* Instytut Pasteura (Francje) i szczep WA-314 posiadały identyczny profil determinant chorobotwórczości (*ail*$^+$*, ystA*$^+$*, irp1*$^+$*, irp2*$^+$*, fuyA*$^+$*, yst1M*$^+$*, chiY*$^+$*, ysrS*$^+$*, myfA*$^+$*, myfB*$^+$*, myfC*$^+$*)* z wyjątkiem jednego polskiego izolatu oznaczonego jako: DM0235, którego dwukrotne badanie w teście multiplex-PCR wykazało brak produktu dla genu *irp1,* przy obecności produktu dla genu *irp2*.

W przypadku badanych izolatów pałeczek *Y. enterocolitica* należących do biotypu 1A w teście multiplex-PCR u wszystkich izolatów stwierdzono obecność produktu PCR dla markera 16S rRNA, zaś u blisko 30% izolatów stwierdzono obecność produktu PCR o wielkości oczekiwanej dla genu *myfA*.

DYSKUSJA

Pałeczki *Y. enterocolitica* 1B/O8 do końca lat 80. były izolowane od ludzi przede wszystkim na terenie USA, gdzie występowały endemicznie. Znacznie rzadziej przypadki zakażeń pałeczkami bioserotypu 1B/O8 u ludzi i zwierząt, odnotowywano w Japonii w latach 90. XX i na początku XXI (17, 28). Według piśmiennictwa krajowego oraz zagranicznego w Europie największa liczba odnotowanych przypadków zakażeń ludzi spowodowanych przez szczepy *Y. enterocolitica* 1B/O8 miała miejsce w Polsce oraz w Niemczech (10, 27). Problem zakażeń pałeczkami *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8 u ludzi jest istotny, ponieważ bakterie te zaliczane są do grupy wysoce chorobotwórczych przedstawicieli gatunku *Yersinia enterocolitica* (6).

W celu określenia chorobotwórczego potencjału badanych izolatów *Yersinia enterocolitica* przeprowadzono analizę obecności wybranych markerów genetycznych przy użyciu metody multiplex-PCR. Metoda ta, używana także przez innych autorów, umożliwiła wykrycie obecności 2 lub 3 poszukiwanych determinant wirulencji w jednej reakcji PCR (15, 22, 23, 31). Grupa genów: *ail, ystA* oraz *myfA, myfB, myfC*, kodujących odpowiednio adhezynę Ail, termostabilną enterotoksynę YstA i fimbrie Myf (geny *myfA, myfB, myfC)*, stanowiła podstawowy panel analizowanych determinant wirulencji, charakterystyczny dla chorobotwórczych pałeczek *Y. enterocolitica* należących zarówno do europejskiej jak i amerykańskiej linii filogenetycznej tego gatunku. W genomie badanych izolatów poszukiwano także genów *irp1, irp2, fuyA, ysrS* i *chiY*. Powyższe geny warunkują wytwarzanie swoistych



Rycina 1. Elektroforegramy przedstawiające wyniki testów multiplex-PCR zastosowanych do określenia wirulotypów badanych pałeczek *Y. enterocolitica*. Markery wykrywane w poszczególnych testach multiplex-PCR przedstawiono po prawej stronie elektroforegramów w położeniu odpowiadającym otrzymanym amplifikatom. Ścieżka M – marker wielkości (GeneRuler100 bp, Fermentas; długość DNA wyrażono w parach zasad). **A**- Ścieżki 1-4: pałeczki *Y. enterocolitica* 1B/O8, odpowiednio: szczep referencyjny WA-314, szczep referencyjny DM0160 (Instytut Pasteura), szczep kontrolny DM0110, izolat DM0240 (izolat wyosobniony w 2009 r. w Polsce); Ścieżka 5- *Y. enterocolitica* DM002 (bioserotyp 4/O3); Ścieżka 6 – *Y. enterocolitica* 96P (bioserotyp 2/O9); Ścieżka 7 – *Y. enterocolitica* O5,27 (bioserotyp 2/O5,27); **B** - Ścieżki 1-4: pałeczki *Y. enterocolitica* 1B/O8, odpowiednio: szczep referencyjny WA-314, szczep referencyjny DM0160 (Instytut Pasteura), szczep DM0110, izolat DM0240, Ścieżka 5- *Y. enterocolitica* DM002 (bioserotyp 4/O3), Ścieżka 6 – *Y. enterocolitica* 96P (bioserotyp 2/O9), Ścieżka 7 - *Y. enterocolitica* O5,27 (bioserotyp 2/O5,27); **C** - Ścieżki 1, 3, 4, 5: pałeczki *Y. enterocolitica* 1B/O8, odpowiednio: szczep referencyjny WA-314, szczep referencyjny DM0160 (Instytut Pasteura), szczep DM0110, izolat DM0240; Ścieżka 2- *Y. enterocolitica* DM002 (bioserotyp 4/O3), Ścieżka 6 - *Y. enterocolitica* 96P (bioserotyp 2/O9), Ścieżka 7 - *Y. enterocolitica* O5,27 (bioserotyp 2/O5, 27); **D**- Ścieżki 1,2: pałeczki *Y. enterocolitica* 1B/O8, odpowiednio: szczep referencyjny WA-314, izolat DM0240, Ścieżka 3- *Y. enterocolitica* DM002 (bioserotyp 4/O3).

dla *Y. enetrocolitica* ssp. *enterocolitica* determinant chorobotwórczości, takich jak: jersiniabaktyna Ybt , chromosomalny system sekrecji białek (T3SS) Ysa; chromosomalny ystem sekrecji białek (T2SS) Yst1 (5, 20, 32). Niektórzy autorzy prac dla potrzeb zweryfikowania chorobotwórczych zdolności szczepów *Y. enterocolitica* stosowali w badaniach plazmidowe markery: *yadA* i *virF*, których obecność umożliwia wytwarzanie: adhezyny YadA i białka VirF (7, 33). Jednakże biorąc pod uwagę zjawisko gubienia plazmidu wirulencji *pYV* przez komórki bakteryjne w czasie kolejnych generacji podczas prowadzonej inkubacji w temp. 37 °C (24), w niniejszej pracy do badań wirulotypów wykorzystano jedynie chromosomalne determinanty chorobotwórczości.

Izolaty *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8, wyosobnione na terenie Polski w 2009 roku oraz szczepy referencyjne reprezentowały identyczny profil determinant chorobotwórczości (*ail*$^+$, *ystA*$^+$, *myfA*$^+$, *myfB*$^+$, *myfC*$^+$ *irp1*$^+$, *irp2*$^+$, *fuyA*$^+$, *yst1M*$^+$ *chiY*$^+$, *ysrS*$^+$) i posiadały pełen zestaw poszukiwanych markerów wirulencji. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami badań prowadzonych przez Gierczyńskiego (15), w których grupa 33 izolatów *Y. enterocolitica* 1B/O8, wyosobnionych w latach 2004-2008 charakteryzowała się obecnością tych samych genów, z wyjątkiem genów *myfB i myfC*, które we wspomnianej pracy nie były przedmiotem oceny. Identyczność profili determinant wirulencji izolatów *Y. enterocolitica* 1B/O8 w prezentowanych badaniach z profilami izolatów badanych w cytowanej pracy świadczy o stabilności profili determinant wirulencji pałeczek 1B/O8 występujących na terenie kraju.

Zaobserwowane wirulotypy wskazują, iż badane izolaty *Y. enterocolitica* 1B/O8 są potencjalnie zdolne do wytwarzania: białka Ail (*ail*$^+$) umożliwiającego adhezję do komórek eukariotycznych; enterotoksyny YstA (*ystA*$^+$), której wynikiem działania jest m.in. biegunka u osób zakażonych. Ponadto, w teście PCR wykrywano obecność trzech genów *myfA, myfB i myfC*, warunkujących przebieg biosyntezy antygenu powierzchniowego fimbrii Myf. Wymienione powyżej markery wirulencji były również wykrywane w badaniach innych autorów, u uznawanych za potencjalne niepatogenne szczepów *Y. enterocolitica* biotypu 1A (1, 16, 23). Jednakże, występowanie genów *ail* i *ystA* obserwowane było u stosunkowo nielicznej grupy tych bakterii (7, 8, 31). W badaniach własnych nie wykryto obecności tych determinant wirulencji u pałeczek biotypu 1A, pochodzących od świń (n=15) oraz ludzi (n=5). Wyjątek stanowił gen *myfA,* w przypadku którego otrzymano amplifikat PCR dla 30% badanych szczepów tej grupy. Wyniki badań innych autorów również wskazują na obecność sekwencji nukleotydowej, homologicznej do *myfA* u części pałeczek *Y. enterocolitica* biotypu 1A, izolowanych od ludzi jak i od świń (22, 33). Należy zwrócić jednak uwagę, iż w obszarze sekwencji nukleotydowej genu *myfA* pałeczek biotypu 1A stwierdzono znaczne różnice w porównaniu do sekwencji nukleotydowej tego genu u innych chorobotwórczych szczepów *Y. enterocolitica*, co może prowadzić do braku funkcjonalności tego genu (34).

Wśród badanych izolatów pałeczek *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8 wykazano obecność markerów genetycznych wskazujących na ich wysoką zjadliwość, między innymi genów wchodzących w skład wyspy patogenności HPI: *irp1, irp2* oraz *fuyA*. Ich obecność świadczy o potencjalnej zdolności badanych izolatów do wytwarzania systemu pobierania i transportu jonów żelaza, Ybt. Wyspa patogenności pałeczek Yersinia HPI (ang. high pathogenicity island) będąca mobilnym elementem genetycznym, może być przenoszona na drodze horyzontalnego transferu genów do innych gatunków drobnoustrojów. Jej obecność wykazano np. u pałeczek *E. coli* i *K. pneumoniae* (21, 29). Obecność wyspy HPI zwiększa

potencjał chorobotwórczy bakterii przez zapewnienie tym drobnoustrojom zdolności do wzrostu w warunkach ograniczonego dostępu jonów żelaza (21).

Wirulotypy badanych izolatów wskazują także na występowanie determinant genetycznych warunkujących działanie dwóch chromosomalnych mechanizmów sekrecji białek: Yst1 (geny – *yst1M, chiY*) oraz Ysa (gen - *ysrS*). Należy podkreślić, iż występowanie loci Yst1 oraz Ysa jest cechą charakterystyczną wyłącznie dla amerykańskich szczepów *Y. enterocolitica* (9, 15, 20). Na tej podstawie zalecane jest wykorzystanie genów występujących w obrębie wymienionych loci jako markerów przydatnych w identyfikacji wysoce chorobotwórczych pałeczek należących do biotypu 1B (15). Według przyjętej opinii w 2007 roku przez zespół naukowy ds. zagrożeń biologicznych (BIOHAZ) Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa (EFSA), wyznacznikiem potencjalnej chorobotwórczości szczepów z gatunku *Y. enterocolitica* jest jego biotyp. Szczepy należące do biotypu 1B, 2, 3, 4 oraz 5 są uznawane za potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka (3). Jednakże w przypadku trudności lub braku możliwości oznaczenia biotypu, wskazane jest przeprowadzenie diagnostyki molekularnej pod kątem obecności genów kodujących determinanty chorobotwórczości pałeczek *Y. enterocolitica*. Analiza obecności poszczególnych genów warunkujących wytwarzanie danego czynnika wirulencji może pozwolić na uzyskanie informacji na temat potencjału chorobotwórczości badanego izolatu jak również określenie jego podgatunku.

Przedstawione wyniki badań wskazują, iż pałeczki *Y. enterocolitica* bioserotypu 1B/O8, występujące na terenie kraju od 2004 roku należą do grupy wysoce zjadliwych szczepów amerykańskiej linii filogenetycznej i charakteryzują się stabilnym garniturem molekularnych wyznaczników chorobotwórczości.

Podziękowanie. Autor pracy składa podziękowania *Dr.* Elisabeth Carniel za udostępnienie szczepów *Y. enterocolitica* 1B/O8 pochodzących z kolekcji Ośrodka Referencyjnego WHO ds. *Yersinia,* Instytut Pasteura, Francja oraz Dr n. med. Jolancie Szych z Zakładu Bakteriologii NIZP – PZH w Warszawie za udostępnienie izolatów *Y. enterocolitica*1B/O8, wyosobnionych na terenie Polski.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bhagat N, Virdi JS*. Distribution of virulence-associated genes in *Yersinia enterocolitica* biovar 1A correlates with clonal groups and not the source of isolation. FEMS Microbiol Lett 2007; 266: 177-83.
2. *Biedzka-Sarek M, Venho R, Skurnik M.* Role of YadA, Ail, and lipopolysaccharide in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. Infect Immun 2005; 73: 2232-44.
3. *Bottone EJ. Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clinic Microbiol Rev 1997; 10: 257-76.
4. *Brzostek K*. Mechanizmy regulacji czynników wirulencji *Yersinia enterocolitica*. Post Microbiol 2004; 43: 7-38.
5. *Carniel E.* The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. Microbes Infect 2001; 3: 561−9.
6. *EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ).* Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. - Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. EFSA J 2007; 595: 1-30.

7. *Falcão JP, Falcão DP, Pitondo-Silva A, Malaspina AC, Brocchi M*. Molecular typing and virulence markers of *Yersinia enterocolitica* strains from human, animal and food origins isolated between 1968 and 2000 in Brazil. J Med Microbiol 2006; 55:1539-48.
8. *Floccari ME, Neubauer HK, Gómez SM, Lodri C, Parada JL*. Molecular characterization of *Yersinia enterocolitica* 1A strains isolated from Buenos Aires sewage water. Adv Exp Med Biol 2003; 529: 345-8.
9. *Foultier B, Troisfontaines P, Müller S, Opperdoes FR, Cornelis GR*. Characterization of the *ysa* pathogenicity locus in the chromosome of *Yersinia enterocolitica* and phylogeny analysis of type III secretion systems. J Mol Evol 2002; 55: 37-51.
10. *Furman S, Napiórkowska A, Sadkowska-Todys M*. Jersinioza w Polsce w 2009 roku. Przegl Epidemiol 2011; 65: 235-8.
11. *Gierczyński R*. Ocena przydatności wybranych markerów wirulencji do identyfikowania chorobotwórczych szczepów pałeczek *Yersinia enterocolitica*. Cz. III. Chromosomalne markery wirulencji. Med Dośw Mikrobiol 2000; 52: 25-34.
12. *Gierczyński R, Jagielski M, Rastawicki W.* Ocena przydatności wybranych markerów wirulencji do identyfikowania chorobotwórczych szczepów pałeczek *Yersinia enterocolitica*. IV. Geny *myfA* i *ureC*. Med Dośw Mikrobiol 2002; 54: 347-55.
13. *Gierczyński R, Szych J, Cieślik A, Rastawicki W, Jagielski M*. The occurrence of the first two CTX-M-3 and TEM-1 producing isolates of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg in Poland. Int J Antimicrob Agents 2003; 21: 497-9.
14. *Gierczyński R, Szych J, Rastawicki W, Wardak S, Jagielski M.* Molecular characterization of human clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 1B/O8 in Poland: emergence and dissemination of three highly related clones. J Clin Microbiol 2009; 47: 1225-8.
15. *Gierczyński R*. Genetyczna struktura populacji i determinanty chorobotwórczości pałeczek *Yersinia enterocolitica* izolowanych z materiału klinicznego od ludzi w Polsce w latach 1996 – 2008. Rozprawa na stopień doktora habilitowanego nauk medycznych w zakresie biologii medycznej. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny, Warszawa 2010.
16. *Grant T, Bennett-Wood V, Robins-Browne RM*. Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers. Infect Immun 1998; 66: 1113-20.
17. *Hosaka S, Uchiyama M, Ishikawa M, Akahoshi T, Kondo H, Shimauchi C, Sasahara T, Inoue M. Yersinia enterocolitica* serotype O:8 septicemia in an otherwise healthy adult: analysis of chromosome DNA pattern by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1997; 35: 3346-7.
18. *Ibrahim A, Liesack W, Stackebrandt E.* Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. J Clinic Microbiol 1992; 30: 1942-7.
19. *Iriarte M i Cornelis GR.* MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica*. J Bacteriol 1995; 177: 738-744.
20. *Iwobi A, Heesemann J, Garcia E, Igwe E, Noelting C, Rakin A*. Novel virulence associated type II secretion system unique to high-pathogenicity *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun 2003; 71: 1872-9.
21. *Koczura R, Mokracka J, Kaznowski A*. The *Yersinia* high-pathogenicity island in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from polymicrobial infections. Pol J Microbiol 2012; 61: 71-3.
22. *Kot B i Trafny EA*. The application of PCR to the identification of selected virulence markers of *Yersinia* genus. Pol J Vet Sci 2004; 7: 27-31.
23. *Kot B, Trafny EA, Jakubczak* A Application of multiplex PCR for monitoring colonization of pig tonsils by *Yersinia enterocolitica*, including biotype 1A, and *Yersinia pseudotuberculosis*. J Food Prot 2007; 70: 1110-5.

24. *Lambertz TS, Danielsson-Tham ML*. Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 3674-81.
25. *Li H, Bhaduri S, Magee WE*. Maximizing plasmid stability and production of released proteins in *Yersinia enterocolitica.* Appl Environ Microbiol 1998; 64: 1812-5.
26. *Neubauer H, Aleksić S, Hensel A, Finke EJ, Meyer H. Yersinia enterocolitica* 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. Int J Med Microbiol 2000; 290: 61-4.
27. *Rastawicki W, Szych J, Gierczyński R, Rokosz N*. A dramatic increase of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:8 infections in Poland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28: 535-7.
28. *Rastawicki W, Szych J, Rokosz N, Zacharczuk K, Gierczyński R*. Seasonality of *Yersinia enterocolitica* bioserotype 1B/O:8 infections in Poland. Epidemiol Infect 2012. 6: 1-4.
29. *Sakai T, Nakayama A, Hashida M, Yamamoto Y, Takebe H, Imai S*. Outbreak of food poisoning by *Yersinia enterocolitica* serotype O8 in Nara prefecture: the first case report in Japan. Jpn J Infect Dis 2005; 58: 257-8.
30. *Schubert S, Picard B, Gouriou S, Heesemann J, Denamur E. Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. Infect Immun 2002; 70: 5335-7.
31. *Thoerner P, Bin Kingombe CI, Bögli-Stuber K, Bissig-Choisat B, Wassenaar TM, Frey J, Jemmi T.* PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 1810-6.
32. *Young GM.* The Ysa type 3 secretion system of *Yersinia enterocolitica* biovar 1B.Adv Exp Med Biol 2007; 603: 286-97.
33. *Virdi JS i Sachdeva P*. Molecular heterogeneity in *Yersinia enterocolitica* and '*Y. enterocolitica*-like' species - Implications for epidemiology, typing and taxonomy. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 45: 1-10.
34. *Zacharczuk K i Gierczyński R* Konserwatywna struktura C-końcowego fragmentu białka MyfA stanowiącego strukturalny element fimbrii Myf u chorobotwórczych pałeczek *Yersinia enterocolitica.* Med Dośw Mikrobiol 2010; 62: 331-6.

Otrzymano: 15 XI 2013 r.
Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie