

Zastosowanie metody PCR do identyfikacji markerów chorobotwórczości szczepów *Yersinia enterocolitica* izolowanych od ludzi i świń

AGNIESZKA WOŹNIAK-KOSEK, BARBARA KOT*, ANTONI JAKUBCZAK**,
JACEK GRZYBOWSKI

Zakład Mikrobiologii i Epidemiologii Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii, ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa

*Katedra Mikrobiologii Akademii Podlaskiej, ul. Prusa 12, 08-110 Siedlce

**Zakład Higieny Weterynaryjnej, Oddział w Łomży, ul. Nowogrodzka 160, 18-400 Łomża

Woźniak-Kosek A., Kot B., Jakubczak A., Grzybowski J.

Application of PCR for the identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains isolated from humans and pigs

Summary

The aim of the investigations was the identification of pathogenic markers of *Yersinia enterocolitica* isolated from humans and pigs by means of polymerase chain reaction (PCR). Two pairs of the starters Ail-a, Ail-b and Yst-a, Yst-b were used. One hundred twenty-two strains of *Yersinia enterocolitica* were tested. Among them, 0:3, 0:9, 0:2, 0:5 serogroups were identified. A multiplex polymerase chain reaction (PCR) was developed to detect the presence of the chromosomal ail and yst genes of the *Yersinia enterocolitica* strains tested.

The results of the multiplex PCR for *Y. enterocolitica* strains indicated that all human and animal isolates examined, belonging to four serotypes, gave a positive reaction for the ail gene and yst gene, yielding fragments of 356 and 134 base pairs respectively. PCR products were not obtained with any of the two primers while using template DNA from *Y. pseudotuberculosis*, *Y. kristensenii*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexnerii* and *Citrobacter freundii*. The presence of the chromosomal ail and yst genes in the *Yersinia enterocolitica* strains from humans and pigs indicates that pigs are a significant reservoir of pathogenic rod *Y. enterocolitica*.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, PCR

Badania prowadzone w ostatnich latach nad mechanizmami chorobotwórczości pałeczek *Y. enterocolitica* wskazują na związek pomiędzy występowaniem takich białek chromosomalnych jak: białko Ail (Attachment invasion locus) i Yst (Yersinia thermostable enterotoxin), a potencjalną zjadliwością tych bakterii (3, 5, 18).

Białko Ail ma masę cząsteczkową 17 kDa i powstaje w wyniku ekspresji genu ail. W logarytmicznej fazie wzrostu bakterii synteza białka Ail zachodzi w 30°C, natomiast gen ail ulega ekspresji tylko w 37°C. Białko to pośredniczy w procesie wiązania bakterii do powierzchni komórki wielu linii komórkowych ssaków. Główną rolą Ail jest zdolność przylegania i wnikania do wnętrza komórek eukariotycznych, a także wielokrotnie zwiększona oporność *Y. enterocolitica* na bakteriobójcze działanie dopełniacza (3, 17, 18). Gen ail występuje wyłącznie u szczepów *Y. enterocolitica* należących do grup serologicznych uznawanych za chorobotwórcze (15).

Wnikanie drobnoustrojów do wnętrza tkanek jest znacznie ułatwione po zniszczeniu nabłonka jelitowe-

go przez enterotoksynę. Wszystkie patogenne szczepy *Yersinia* posiadają gen yst kodujący termostabilną enterotoksynę Yst (6). Białko Yst pałeczek *Y. enterocolitica*, przypomina pod względem właściwości fizykochemicznych enterotoksynę Sti produkowaną przez enteropatogenne szczepy *E. coli*. Zarówno toksyna Yst jak i Sti aktywują cyklazę guanylową, co prowadzi do wzrostu zawartości cGMP w komórkach nabłonkowych jelit, a to z kolei powoduje gromadzenie się w jelitach płynów, prowadząc do wystąpienia biegunki (12, 16).

Od momentu stwierdzenia identyczności serotypów, biotypów i fagotypów *Yersinia enterocolitica* wśród szczepów izolowanych od trzody chlewnej i ludzi zwrócono uwagę na świnię jako źródło pierwotnego zakażenia dla człowieka (1, 2). Serotypy pałeczek *Yersinia enterocolitica* wywołujące objawową jersiniozę u ludzi wielokrotnie izolowano od chorych i klinicznie zdrowych świń (4, 8). Surowe mięso wieprzowe może być także rezerwuarem szczepów *Yersinia enterocolitica* dlatego też istotne znaczenie praktyczne ma zastosowanie techniki PCR umożliwiającej szybkie

wykrywanie szczepów chorobotwórczych, które nie zawsze wykrywane są konwencjonalnymi metodami hodowlanymi.

Celem badań była identyfikacja markerów chorobotwórczości szczepów *Yersinia enterocolitica* wyobsonionych od ludzi i świń przy użyciu techniki polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR), w której zastosowano dwie pary starterów Ail-a, Ail-b oraz Yst-a, Yst-b.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na szczepach *Yersinia enterocolitica* wyobsonionych z przypadków krwawych biegunek u ludzi (38 szczepów) oraz z wymazów z jamy gębowej, powierzchni półtuszy świń i kału prosiąt (84 szczepy). Metodę izolacji szczepów, sposób identyfikacji biotypu i grup serologicznych opisano wcześniej (13, 14).

Do wykrywania poszukiwanych genów w genomie użytych do badań szczepów *Y. enterocolitica* zastosowano polimerazową reakcję łańcuchową – multiplex PCR. Preparat genomowego DNA przygotowano według metody zaproponowanej przez Harnett i wsp. (9) w modyfikacji własnej. Drobnoustroje hodowano w płynnym podłożu LB przez 24 godziny w 28°C. Do reakcji lizy pobierano 0,2 ml zawiesiny bakteryjnej o stężeniu 1×10^9 CFU/ml i dodawano 0,8 ml buforu 10 × TE (100 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 10 mM EDTA), następnie mieszano i wirowano w temp. 4°C przez 10 min. przy 10 000 × rpm. Supernatany usuwano, a osad zawieszano w 0,2 ml buforu lizującego (0,01 M Tris-HCl pH = 8,0; 0,05 M NaCl; 0,005 M EDTA, 1% SDS; 100 µg/ml Proteinase K) i inkubowano 2 godz. w temp. 65°C. Uzyskany lizat poddawano ekstrakcji równoważną objętością mieszaniny fenol: chloroform: alkohol izoamylowy w stosunku 25:24:1 (fenol wysyczony 0,1 M Tris-HCl, pH = 8,0) oraz dwukrotnie mieszaniną chloroform: alkohol izoamylowy w stosunku 24:1. Fazę wodną i fenolową rozdzielano przez wirowanie 12 000 × rpm 15 min. DNA wytrącano przez dodanie 2,5 objętości absolutnego alkoholu etylowego oraz 1/10 objętości 3 M octanu sodowego. Próbkę inkubowano przez 24 godz. w temp. -20°C. DNA odzyskiwano z osadu przez wirowanie przy 12 000 × rpm przez 30 min. w temp 4°C, następnie płukano 70% alkoholem etylowym i suszono. Preparat DNA rozpuszczano w buforze TE (10 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 1 mM EDTA). Tak przygotowany preparat DNA przechowywano w stanie głębokiego zamrożenia (-78°C). Bufory użyte do przygotowania preparatów genomowego DNA sporządzano w jałowej wodzie destylowanej Millipore.

Mieszaninę reakcyjną PCR przygotowywano jednorazowo w objętości pozwalającej na przeprowadzenie 24

Tab. 1. Startery PCR użyte w reakcji identyfikacji chorobotwórczych szczepów *Y. enterocolitica* (9)

Gen	Oznaczenie startera	Sekwencja nukleotydów	Wielkość amplifikowanego produktu (p.z.)
ail	Ail-a	5' TGGTTATGCGCAAAGCCATGT 3'	356
	Ail-b	5' TGGAAGTGGGTTGAATTGCA 3'	
yst	Yst-a	5' GTCTTCATTTGGAGGATTCGGC 3'	134
	Yst-b	5' AATCACTACTGACTTCGGCTGG 3'	

Tab. 2. Ocena występowania produktów amplifikacji dla genu ail i yst badanych drobnoustrojów

Rodzaj	Gatunek	Grupa serologiczna	Liczba szczepów	Liczba szczepów posiadających	
				Gen ail	Gen yst
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	0:3	104	104	104
	<i>Y. enterocolitica</i>	0:9	15	15	15
	<i>Y. enterocolitica</i>	0:2	2	2	2
	<i>Y. enterocolitica</i>	0:5	1	1	1
	<i>Y. pseudotuberculosis</i>		2	0	0
	<i>Y. kristensenii</i>		2	0	0
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>		2	0	0
<i>Salmonella</i>	<i>S. enteritidis</i>		2	0	0
<i>Shigella</i>	<i>S. sonnei</i>		2	0	0
	<i>S. flexneri</i>				
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>		2	0	0

oddzielnych reakcji amplifikacji, każda w objętości 50 µl. W tym celu do 426 µl sterylnej wody destylowanej dodawano 120 µl 10× stężonego buforu reakcyjnego DyNAzyme™ (10 mM Tris-HCl, pH = 8,8; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl i 0,1% TritonX-100) dla termostabilnej polimerazy DyNAzyme™ II DNA Polymerase (firmy Finnzymes), mieszało, a następnie dodawano 96 µl roztworu o stężeniu 0,2 µM każdego z pary oligonukleotydów starterowych wykonanych przez DNA Gdańsk (tab. 1) oraz 120 µl roztworów deoksynukleotydów (firmy Fermentas) o stężeniu końcowym 200 µl. Ostatnim etapem przygotowania mieszaniny reakcyjnej było dodanie 30 µl roztworu termostabilnej polimerazy DyNAzyme™ II DNA Polymerase (firmy Finnzymes) o aktywności 2 U/µl. Mieszaninę reakcyjną rozdzielono po 45 µl do 24 osobnych probówek Eppendorf o pojemności 0,2 ml, do których następnie wprowadzono po 5 µl preparatu genomowego DNA. Probówki umieszczono w termocyklerze Gene Amp PCR-system 2400 firmy Parkin Elmer, w którym prowadzono reakcję amplifikacji DNA.

Zastosowane warunki amplifikacji obejmowały: wstępną jednodominutową denaturację w temp. 94°C, denaturację 94°C – 30 sek., przyłączenie starterów 55°C – 1 min. oraz syntezę łańcucha 70°C – 2 min. Cykl ten powtarzano 25×.

Całą reakcję multiplex PCR kończyła końcowa synteza łańcucha 70°C – 5 min. Mieszaninę porealizacyjną zawierającą zamplifikowane DNA poddawano elektroforezie. W tym celu pobierano 10 µl mieszaniny porealizacyjnej i 3 µl buforu obciążającego (0,25% błękit bromofenolowy; 40% sacharoza; 40 mM Tris-HCl, pH = 8,0) i przenoszono do studzienki w 2% żelu agarozowym (Ampli Size Agarose Bio-Rad) zawierającym bromek etydyny w ilości 10 µl/ml.

Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze TBE (0,89 mM Tris; 0,89 mM kwas borowy, 0,08 mM EDTA, pH = 8,0) w temperaturze pokojowej przez 1,5 godz. przy napięciu 80 V. Po zakończeniu rozdziału elektroforetycznego produkty amplifikacji DNA oglądano w świetle lampy UV. Wielkość uzyskiwanego produktu PCR oceniano przez porównanie ze standardem mas – marker M_1 (firmy DNA Gdańsk). Wyniki elektroforezy archiwizowano przy użyciu zestawu komputerowego z programem Bio-Rad przeznaczonym do cyfrowego zapisu i analizy obrazu.

W celu określenia swoistości zastosowanych starterów łańcuchowej reakcji polimerazy użyto obok *Y. pseudotuberculosis* i *Y. kristensenii* inne szczepy pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*: *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. sonnei*, *S. flexneri* oraz *C. freundii*. Oznaczenia wykonano wg opisu przedstawionego powyżej.

Wyniki i omówienie

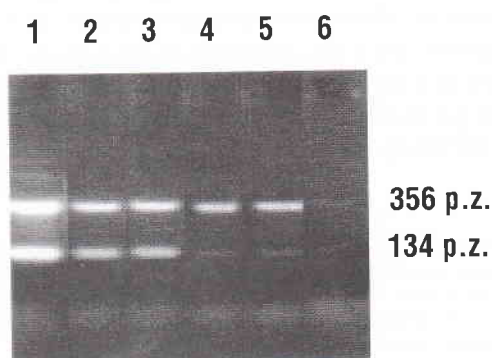
Wyniki poszukiwania techniką PCR obecności genów *ail* i *yst* w genomie 122 badanych szczepów pałeczek *Y. enterocolitica* izolowanych od ludzi i świń oraz szczepów użytych jako kontrolnych przedstawiono w tab. 2.

W łańcuchowej reakcji polimerazowej PCR z preparatami genomowego DNA badanych pałeczek *Y. enterocolitica* przy użyciu starterów *Ail a*, *b* i *Yst a*, *b* poszukiwano produktów tej reakcji – fragmentów genu *ail* o wielkości 356 p.z. oraz fragmentów genu *yst* o wielkości 134 p.z. Obecność cząstek DNA o wielkości odpowiadającej poszukiwanym fragmentom stwierdzono w produktach amplifikacji z preparatami DNA wszystkich 122 szczepów pałeczek *Y. enterocolitica*. Badana populacja obejmowała 104 szczepy należące do grupy serologicznej 0:3 (33 szczepy wyosobnione od ludzi, 71 od trzody chlewnej), 15 szczepów grupy serologicznej 0:9 (5 szczepów wyosobnionych od ludzi, 10 od trzody chlewnej), 2 szczepy pochodzące od świń należały do grupy serologicznej 0:2 oraz 1 szczep do grupy 0:5 (ryc. 1). Poszukiwanego fragmentu genu *ail* i *yst* nie wykryto w produktach PCR z preparatami genomowego DNA uzyskanymi z pozostałych szczepów kontrolnych, tj. *Y. pseudotuberculosis*, *Y. kristensenii*, *S. enteritidis*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *C. freundii*. W reakcji multiplex PCR wykrywano obecność genów *ail* i *yst* w preparatach genomowego DNA badanych szczepów, gdy liczba komórek bakteryjnych osiągała 10^4 - 10^5 jtk/ml (ryc. 2). Zdaniem wielu autorów geny *ail* i *yst* związane są z chorobotwórczością wym. bakterii (3, 12, 15-17). Zastosowanie metody multiplex PCR daje możliwość szybkiego wykrycia szczepów uważanych za chorobotwórcze dla człowieka i zwierząt.



Ryc. 1. Rozdział elektroforetyczny w 2% agarozie produktów reakcji multiplex PCR uzyskanych z DNA szczepów *Y. enterocolitica*

Objaśnienia: od lewej: ścieżka M_1 – marker 501, 404, 331, 242, 190, 141, 111 p.z. (DNA – Gdańsk), ścieżka 1 – *Y. enterocolitica* 0:3, ścieżka 2 – *Y. enterocolitica* 0:9, ścieżka 3 – *Y. enterocolitica* 0:2, ścieżka 4 – *Y. enterocolitica* 0:5.



Ryc. 2. Rozdział elektroforetyczny w 2% agarozie produktów reakcji multiplex PCR uzyskanych z DNA szczepów *Y. enterocolitica* 0:3 w zależności od gęstości zawiesiny komórek bakterii

Objaśnienia: od lewej: ścieżka 1 – 1×10^9 CFU/ml, ścieżka 2 – 1×10^8 CFU/ml, ścieżka 3 – 1×10^7 CFU/ml, ścieżka 4 – 1×10^6 CFU/ml, ścieżka 5 – 1×10^5 CFU/ml, ścieżka 6 – 1×10^4 CFU/ml.

W genomie wszystkich 122 badanych szczepów *Y. enterocolitica* bez względu na grupę serologiczną stwierdzono obecność genu *ail*. Miller i wsp. (15) podają, że obecność genu *ail* nie zależy od obecności plazmidu wirulencji. W badaniach własnych genu *ail* nie wykryto w preparatach genomowego DNA badanych szczepów z gatunku *Y. pseudotuberculosis*, *Y. kristensenii*, *S. enteritidis*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *C. freundii*. Jest to zgodne z obserwacjami Millera i wsp. (15), którzy stwierdzili, że gen ten występuje tylko u chorobotwórczych szczepów pałeczek *Y. enterocolitica*.

Do poszukiwań genu *yst* w genomie badanych szczepów *Y. enterocolitica* użyto starterów *Yst a* i *b* opisanych przez Harnett i wsp. (9). Uzyskane wyniki wskazują, że podobnie jak w przypadku genu *ail*, także gen *yst* wykryto tylko u szczepów *Y. enterocolitica*.

W celu sprawdzenia czy geny *ail* i *yst* występujące tylko u pałeczek *Y. enterocolitica* wykrywane metodą multiplex PCR będą nieswoiście wykrywane u innych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* do badań włączono gatunki: *Y. pseudotuberculosis*, *Y. kristensenii*, *S. enteritidis*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *C. freundii*. U żadnego z tych szczepów nie wykryto poszukiwanych

genów, co potwierdza swoistość zastosowanej metody do wykrywania genów ail i yst u *Y. enterocolitica*. Feng i wsp. (7) oraz Ibrahim i wsp. (10, 11) dowodzą, że dla stwierdzenia zjadliwości szczepów pałeczek *Y. enterocolitica* wystarczy wykrycie w genomie tych bakterii genów ail i yst, które występują niezależnie od obecności plazmidu wirulencji pYV.

W celu potwierdzenia tego należałoby w dalszych badaniach dokonać oceny przedstawionej populacji szczepów *Y. enterocolitica* pod względem obecności plazmidu wirulencji pYV.

Wnioski

1. Metoda multiplex PCR ze swoistymi starterami Ail-a, Ail-b oraz Yst-a, Yst-b jest przydatna do wykrywania chorobotwórczych szczepów *Yersinia enterocolitica*.

2. Obecność chromosomalnych markerów wirulencji, tj. genów ail i yst zarówno u szczepów *Yersinia enterocolitica* wyisobnionych od ludzi, jak i od świń wskazuje na powinowactwo epidemiologiczne ludzi i trzody chlewnej.

Piśmiennictwo

1. Aldova E., Laznickova K., Svandova E., Sobotkova E., Sobotkova J.: Yersiniosis in Czechoslovakia results of a long-term study involving microbiological laboratories of the hygienic service. *J. Hyg. Epidemiol.* 1989, 33, 409-416.
2. Andersen J. K., Sorensen R., Glensbjerg M.: Aspect of epidemiology of *Yersinia enterocolitica*: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 1991, 13, 231-238.
3. Bottoni E. J.: *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997, 10, 257-276.
4. Brewer R. A., Corbel M. J.: Characterization of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from cattle, sheep and pigs in the United Kingdom. *J. Hyg. Camb.* 1983, 90, 425-433.
5. Chiesa C., Pacifico L., Ravangan G.: Identification of pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 2248-2249.
6. Delor I., Kacckenbeek A., Wauters G., Cornelis G. R.: Nucleotide sequence of yst, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic yersiniae. *Infect. Immun.* 1990, 58, 2983-2988.
7. Feng P., Keasler S. P., Hill W. E.: Direct identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by polymerase chain reaction amplification. *Transfusion*, 1992, 32, 850-854.
8. Hariharan H., Breynton J.: Isolation of *Yersinia* spp. from cases of diarrhoea. *Can. Vet. J.* 1990, 31, 779.
9. Hammett N., Lin Y. P., Krishnn C.: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* using the multiplex polymerase chain reaction. *Epidemiol. Infect.* 1996, 117, 59-67.
10. Ibrahim A., Liesack W., Stackbrandt E.: Polymerase chain reaction – gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 1942-1947.
11. Ibrahim A., Liesack W., Griffitha M. W., Robins-Browne R. M.: Development of highly specific assay for rapid identification of pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* based on PCR amplification of the *Yersinia* heat-stable enterotoxin gene (yst). *J. Clin. Microbiol.* 1997, 35, 1636-1638.
12. Inoule T., Okamoto K., Moriyama T.: Effect of *Yersinia enterocolitica* ST on cyclic guanosine 3', 5'-nonophosphate levels in mous intestines and cultured cells. *Microbiol. Immunol.* 1983, 27, 159-166.
13. Jakubczak A.: Chorobotwórczość pałeczek *Yersinia enterocolitica* izolowanych od trzody chlewnej i ich występowanie. Praca hab., Weterynaria Olsztyn 1995.
14. Kot B., Bukowski K., Jakubczak A.: Analiza bakteriocynogennych właściwości szczepów *Yersinia enterocolitica*. *Med. Dośw.* 1999, 51, 91-101.
15. Miller V. L., Farmer J. J., Hill W. E., Falkow S.: The ail locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes comonly associated with disease. *Infect Immun.* 1989, 57, 121-131.
16. Miyama A., Inoue T., Okamoto K., Yukitake J.: Biological function of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Cont. Microbiol. Immunol.* 1987, 9, 266-271.
17. Pierson D. E., Falkow S.: The ail gene of *Yersinia enterocolitica* has role in the ability of this organism to survive serum killing. *Infect. Immun.* 1993, 61, 1846-1852.
18. Wiśniewski J., Bielecki J.: Mechanizmy wirulencji bakterii z rodzaju *Yersinia*. *Post. Mikrobiol.* 1996, 35, 213-241.

Adres autora: mgr Agnieszka Woźniak-Kosek, ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa

Katedra Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

zaprasza na:

Międzynarodową Konferencję Naukową pt.

PREWENCJA WETERYNARYJNA wczoraj–dziś–jutro,

która odbędzie się 26 kwietnia 2001 r. w Olsztynie

Podczas Konferencji przedstawione zostaną zagadnienia dotyczące prewencji weterynaryjnej na przełomie wieków. Referaty wygłoszą czołowi specjaliści z kraju i przedstawiciele Unii Europejskiej. Konferencja odbędzie się równocześnie z obchodami 20-lecia Katedry.

Materiały ukażą się drukiem. Dokładniejsze informacje i program Konferencji przedstawimy po otrzymaniu zgłoszenia chęci uczestnictwa na adres Katedry w terminie do 31 marca 2001 r.

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego
Prof. dr hab. Maciej Gajęcki

Katedra Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 13, 10-950 Olsztyn
tel, (089) 523-37-73, tel/fax (089) 523-36-18, e-mail: higpasz@uwm.edu.pl