

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

BARBARA KOT, AGNIESZKA WOŹNIAK-KOSEK*, JERZY KAWIAK*, KAZIMIERZ BUKOWSKI

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

*Zakład Cytologii Klinicznej Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

Kot B., Woźniak -Kosek A., Kawiak J., Bukowski K.

Application of the multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification of pathogenic plasmid markers of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from humans and pigs

Summary

One hundred twenty-two strains of *Yersinia enterocolitica*, isolated from the faeces of humans who showed symptoms typical of intestinal yersiniosis and from pigs, were the subject of the study. The O:3, O:9, O:2, O:5 serogroups appeared in the tested population of *Yersinia enterocolitica*. Tested strains were incubated on CRMOX agar and two groups were distinguished: calcium dependent and Congo-red binding strains (CRMOX+ phenotype) and strains which don't show these properties (CRMOX- phenotype). A multiplex polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the presence of pathogenic plasmid markers, such as *yadA* and *virF* genes of tested *Yersinia enterocolitica* strains. The amplified fragment sizes were: 747 base-pairs (bp) for the *yadA* gene and 590 bp for the *virF* gene, which were obtained in PCR products of template DNA from 36 *Yersinia enterocolitica* strains. Among tested *Yersinia enterocolitica* strains: 14 strains belong to O:3 serogroup isolated from humans in 1998; 9 strains belong to O:3 serogroup isolated from humans in 1996; 12 strains belong to O:3 serogroup and 1 strain belongs to O:9 serogroup, which were isolated from pigs in 1994-95. Moreover the presence of 590 bp amplified products, corresponding to *virF* gene fragment, was detected in PCR products of one *Yersinia pseudotuberculosis* strain from pigs.

Yad A and *virF* gene fragments were not detected in PCR products of template DNA from remaining *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia kristensenii* strains.

The presence of PCR products, corresponding to *yadA* and *virF* gene fragments, was detected only in amplified products of template DNA of CRMOX+ phenotype strains. A multiplex polymerase chain reaction with *yadA*-1, -2, *virF*-1, -2 primers is useful to detect pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains, when one directly isolated from research material.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, multiplex polymerase chain reaction (PCR)

Drobnoustroje należące do gatunku *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis* mogą być przyczyną zachorowań ludzi i zwierząt. Badania prowadzone od początku lat 80 wskazują, że wymienione gatunki wyosobnione od chorych ludzi i zwierząt mają pozachromosomalne elementy genetyczne w postaci plazmidu, o wielkości około 70 tysięcy par zasad (7, 8, 21, 23). Plazmid ten określono mianem plazmidu wirulencji (plazmid *Yersinia* Virulence), który jest odpowiedzialny za wyrażenie w 37°C wielu cech fenotypowych bakterii, takich jak: zależność od Ca²⁺ (4), autoaglutynacja (21), wiązanie czerwieni Kongo (19) oraz brak aktywności amidazy pirazynowej (12). Geny zlokalizowane w plazmidzie pYV kodują grupę białek wytwarzanych przez pałeczki z rodzaju *Yersinia* określanych terminem Yops (*Yersinia* outer proteins),

z których część zdolna jest do dezorganizacji fizjologicznych właściwości makrofagów oraz do cytotoksycznego działania na komórki gospodarza (8, 18, 20). W plazmidzie pYV zlokalizowany jest również gen *yadA*, w wyniku ekspresji którego powstaje białko *YadA* (*Yersinia* adhesin A). Adhezyna *Yad A* tworzy fibrylną powłokę wokół komórki bakteryjnej ułatwiając tym samym przyleganie drobnoustroju do komórek nabłonkowych jelita i substancji międzykomórkowej (13, 21). Białko *Yad A* zwiększa także oporność tych drobnoustrojów na bakteriobójcze działanie surowicy oraz zmniejsza podatność pałeczek *Yersinia enterocolitica* na fagocytozę przez wielojądrowe granulocyty (1, 18). W plazmidzie pYV zlokalizowano również gen *virF*, biorący udział w temperaturozależnej aktywacji transkrypcji kodowanych na plazmidzie

determinant patogeny, m.in. genów *yop*, *yadA* (8). Stwierdzono, że szczepy *Yersinia enterocolitica* posiadające plazmid pYV charakteryzują się fenotypem CRMOX⁺ (19). Według niektórych autorów (9, 13, 23) wykrycie genów *yadA* lub *virF* zlokalizowanych w plazmidzie pYV może świadczyć o zjadliwości badanych pałeczek *Yersinia enterocolitica*.

Celem badań była ocena chorobotwórczości szczepów *Yersinia enterocolitica* wyisobnionych od ludzi i świń przy użyciu techniki polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR), w której zastosowano dwie pary starterów: *yadA*-1, *yadA*-2 oraz *virF*-1, *virF*-2.

Material i metody

Przedmiotem badań były szczepy *Yersinia enterocolitica* wyisobnione od ludzi z typowymi objawami zakażenia przewodu pokarmowego (38 szczepów) oraz z wymazów z jamy gębowej, powierzchni półtuszy świń i kału prosiąt (84 szczepy). Szczepy pochodzenia zwierzęcego izolowano w latach 1994-96, 20 szczepów *Y. enterocolitica* pochodzących z materiału klinicznego od ludzi wyisobniono w 1996 r., a pozostałe 18 w 1998 r. Metodę izolacji szczepów, sposób identyfikacji biotypu i grup serologicznych opisano wcześniej (11, 14, 15). Różnicowanie badanych szczepów *Y. enterocolitica* na szczepy o fenotypie CRMOX⁺ lub CRMOX⁻ przeprowadzono zgodnie z metodyką podaną przez Riley i Toma (19). Badane szczepy posiewano na podłoże CRMOX i inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Wzrost w postaci drobnych, czerwono zabarwionych kolonii świadczył o fenotypie CRMOX⁺, natomiast duże, jasne i przezroczyste kolonie reprezentowały fenotyp CRMOX⁻.

W celu uzyskania czystej linii szczepu *Y. enterocolitica* charakteryzującego się fenotypem CRMOX⁺ szczepy posiewano na podłoże CRMOX, inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin, następnie przenoszono kilka drobnych, czerwono zabarwionych kolonii na podłoże TSA. Posiewy inkubowano w 25°C przez 48 godzin, po czym materiał pobrany z pojedynczych kolonii przesiewano równolegle na podłoże CRMOX i TSA. Posiewy na podłożu CRMOX inkubowano w 37°C przez 48 godzin, a na TSA w 25°C przez 24 godziny. Izolowane na TSA kolonie *Y. enterocolitica*, które w równoległych posiewach na podłożu CRMOX wyrastały w postaci drobnych, czerwono zabarwionych kolonii (CRMOX⁺) służyły do dalszych badań w celu stwierdzenia obecności genów *yadA* i *virF*.

Do wykrywania poszukiwanych genów u badanych szczepów zastosowano polimerazową reakcję łańcuchową – multiplex PCR. Preparat plazmidowego DNA przygotowywano zgodnie z procedurą podaną przez producenta, wykorzystując zestaw do izolacji plazmidowego DNA „Plazmid Miniprep Plus” firmy A & A BIOTECHNOLOGY – Gdynia.

Mieszaninę reakcyjną PCR przygotowywano jednorazowo w objętości pozwalającej na przeprowadzenie 24 oddzielnych reakcji amplifikacji, każda w objętości 50 µl. W tym celu do 426 µl sterylnej wody destylowanej dodawano 120 µl 10× stężonego buforu reakcyjnego DyNA zyme™ (10 mM Tris-HCl, pH = 8,8; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl i 0,1% TritonX-100) dla termostabilnej polime-

razy DyNA zyme™ II DNA Polymerase (firmy Finnzymes) mieszano, a następnie dodawano 96 µl roztworu o stężeniu 0,2 µM każdego z pary oligonukleotydów starterych wykonanych przez DNA Gdańsk (tab. 1) oraz 120 µl roztworów deoksynukleotydów (firmy Fermentas) o stężeniu końcowym 200 µM. Ostatnim etapem przygotowania mieszaniny reakcyjnej było dodanie 30 µl roztworu polimerazy DyNA zyme™ II DNA Polymerase (firmy Finnzymes) o aktywności 2U/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 plazmidowego DNA. Probówki umieszczono w termocyklerze typu Gene Amp PCR-system 2400 firmy Parkin Elmer, w którym prowadzono reakcję amplifikacji DNA. Zastosowane warunki amplifikacji: wstępna denaturacja w temp. 94°C przez 3 min. 30 s., denaturacja w 94°C – 1 min., przyłączanie starterów w 58°C – 1 min. 30 s. oraz synteza łańcucha w 72°C – 1 min. 30 s. Cykl ten powtarzano 35×. Całą reakcję multiplex PCR kończono syntezą łańcucha w 72°C – 5 min. Mieszaninę poreakcyjną zawierającą zamplifikowane DNA poddawano elektroforezie. W tym celu pobierano 10 µl produktu amplifikacji 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 przyłożonym napięciu 80V. Po zakończeniu rozdziału elektroforetycznego produkty amplifikacji DNA oglądano w świetle lampy UV. Wielkość uzyskiwanego produktu PCR oceniano przez porównanie ze standardem mas – marker M₂ (firmy DNA Gdańsk). Wyniki elektroforezy archiwizowano przy użyciu zestawu komputerowego z programem Bio-Rad przeznaczonego do cyfrowego zapisu i analizy obrazu.

Wyniki i omówienie

W łańcuchowej reakcji polimerazowej z użyciem plazmidowego DNA badanych pałeczek *Yersinia enterocolitica* zastosowano dwie pary starterów *yadA*-1, -2 i *virF*-1, -2 (tab. 1). Poszukiwano produktów reakcji amplifikacji, tj. fragmentów o wielkości 747 p.z. charakterystycznych dla genu *yadA* oraz fragmentów o wielkości 590 p.z. charakterystycznych dla genu *virF*. Wyniki poszukiwania techniką PCR obecności genów *yadA* i *virF* zamieszczono w tab. 2.

Obecność cząsteczek DNA o wielkości odpowiadającej poszukiwanym fragmentom genów *yadA* i *virF* stwierdzono w produktach amplifikacji z preparatami DNA 14 szczepów *Yersinia enterocolitica* grupy serologicznej O:3, które zostały wyisobnione z materiału klinicznego w 1998 r. oraz 9 szczepów grupy serologicznej O:3 wyizolowanych od ludzi w 1996 r. Natomiast wśród szczepów *Yersinia enterocolitica* wyisobnionych w latach 1994-95 od świń tylko w przypadku 12 szczepów grupy serologicznej O:3 (71 szczepów

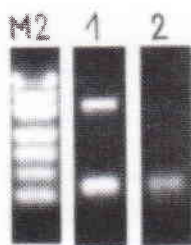
Tab. 1. Startery PCR użyte w reakcji identyfikacji chorobotwórczych szczepów *Yersinia enterocolitica* (3, 13)

Gen	Oznaczenie startera	Sekwencja nukleotydów		Wielkość amplifikowanego produktu (p.z.)
		5'	3'	
yadA	yadA-1	TAAGATCAGTGTCTCTGCGGCA		747
	yadA-2	TAGTTATTTGCGATCCCTAGCAC		
virF	virF-1	CATGGCAGAACAGCAGTCAG		590
	virF-2	ACTCATCTTACCATTAAGAAG		

Tab. 2. Występowanie produktów amplifikacji dla genu yadA i virF badanych drobnoustrojów z rodzaju *Yersinia*

Gatunek	Pochodzenie szczepów	Grupa serologiczna	Liczba szczepów	Liczba szczepów o fenotypie CRMOX+	Liczba szczepów mających gen	
					yadA	virF
<i>Yersinia enterocolitica</i>	materiał kliniczny (1998 r.)	0:3	18	14	14	14
	materiał kliniczny (1996 r.)	0:3	15	9	9	9
		0:9	5	0	0	0
		0:3	71	12	12	12
	trzoda chlewna (1994-95 r.)	0:9	10	1	1	1
		0:2	2	0	0	0
0:5		1	0	0	0	
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	trzoda chlewna		2	1	0	1
<i>Yersinia kristensenii</i>	trzoda chlewna		2	0	0	0

badanych) i 1 szczepu grupy serologicznej O:9 (10 szczepów badanych) uzyskano produkty amplifikacji o wielkości odpowiadającej poszukiwanym fragmentom genów yadA i virF. Ponadto obecność amplikonów o wielkości 590 p.z. stwierdzono w produktach PCR uzyskanych w przypadku 1 szczepu *Yersinia pseudotuberculosis*, który pochodził od trzody chlewnej (ryc. 1). Poszukiwanych fragmentów genu yadA i virF nie wykryto w produktach amplifikacji z preparatami DNA pozostałych szczepów *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* i *Yersinia kristensenii*. Obecność amplikonów o wielkości odpowiadającej poszukiwanym fragmentom genów yadA i virF wykryto tylko w produktach amplifikacji z preparatami DNA szczepów wykazujących fenotyp CRMOX+; nie stwierdzono ich w przypadku szczepów o fenotypie CRMOX-.



Ryc. 1. Rozdział elektroforetyczny w 2% agarozie produktów reakcji multiplex PCR uzyskanych z DNA szczepów *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis*
 Objaśnienia: ścieżka M2 – marker 1008, 883, 615, 517, 466, 396 p.z. (DNA – Gdańsk), ścieżka 1 – *Y. enterocolitica* O:3, ścieżka 2 – *Y. pseudotuberculosis*

W oparciu o metodykę PCR poszukiwano dwóch podstawowych genów związanych z chorobotwórczością *Yersinia enterocolitica*, które zlokalizowane są w plazmidzie wirulencji pYV, a mianowicie genu virF i genu yadA (8, 21). Posłużono się metodą PCR ponieważ pozwala ona na szybkie wykrycie w genomie bakteryjnym odcinków DNA ograniczonych określonymi sekwencjami nukleotydów (16, 17).

W niniejszych badaniach do wykrywania genu virF zastosowano startery F1 i F2 zaproponowane przez Wren i Tabasqchali (23), które były również stosowane przez Feng i wsp. (3). Wyniki uzyskane przez tych autorów świadczyły o swoistości starterów F1 i F2, gdyż produkty amplifikacji o oczekiwanej wielkości wykrywano jedynie w badanych i kontrolnych szczepach *Yersinia enterocolitica* oraz *Yersinia pseudotuberculosis* mających plazmid pYV. Do wykrywania genu yadA zastosowano startery Y1 i Y2 opracowane przez Kapperud i wsp. (13). Amplikony uzyskiwane przez nich były swoiste dla genu yadA występującego wyłącznie w plazmidzie pYV pałeczek *Y. enterocolitica*. Ogółem przebadano 122 szczepy *Yersinia enterocolitica*,

które wyosobniono w latach 1994-98. Uzyskano tylko 36 szczepów *Yersinia enterocolitica* o fenotypie CRMOX+. W produktach amplifikacji z preparatami plazmidowego DNA tych szczepów stwierdzono obecność cząsteczek DNA o wielkości odpowiadającej poszukiwanym fragmentom genu virF i yadA. Obecność sekwencji charakterystycznej dla genu virF stwierdzono również w produktach PCR uzyskanych w przypadku 1 szczepu *Y. pseudotuberculosis*. Gierczyński (5) wykorzystując te same startery F1, F2 oraz Y1, Y2 uzyskał produkty amplifikacji odpowiadające fragmentom genu virF i yadA z preparatami DNA aż 130 szczepów klinicznych *Yersinia enterocolitica*, mających plazmid wirulencji pYV. Tylko 22 szczepy *Yersinia enterocolitica* charakteryzowały się fenotypem CRMOX-, nie wykryto u nich poszukiwanych genów virF i yadA. Szczepy te izolowano w latach 1996-98, wszystkie reprezentowały grupę serologiczną O:3. Gierczyński (6) podaje, że do identyfikowania chorobotwórczych szczepów *Yersinia enterocolitica* najbardziej przydatne wydają się być markery związane z obecnością plazmidu wirulencji pYV, spośród których w rutynowych badaniach diagnostycznych stosowane powinny być: poszukiwanie szczepów o fenotypie CRMOX+ oraz stwierdzenie w genomie badanych

szczepów obecności genu *virF* i/lub genu *yadA*. Natomiast poszukiwanie chromosomalnych genów *ail* i *yst* związanych z chorobotwórczością *Yersinia enterocolitica*, wydaje się być celowe tylko wtedy, gdy u badanego szczepu nie udało się stwierdzić obecności plazmidowych markerów wirulencji.

W prezentowanych badaniach uzyskano jednak niewielką grupę szczepów, u których stwierdzono obecność poszukiwanych genów *virF* i *yadA*. Natomiast w badaniach wykonanych wcześniej (22), gdzie również zastosowano technikę łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR) stwierdzono obecność genu *ail* i *yst* w genomie wszystkich 122 badanych szczepów *Y. enterocolitica* bez względu na podział serologiczny, pochodzenie szczepów oraz rok izolacji. W badaniach prowadzonych przez Feng i wsp. (3) w genomowym DNA wszystkich 7 szczepów klinicznych *Yersinia enterocolitica*, które wyizolowano z krwi stwierdzono obecność produktów amplifikacji o wielkości 430 p.z., co odpowiada fragmentowi genu *ail*, podczas gdy w genomie tylko jednego szczepu *Yersinia enterocolitica* (O:1,2,3) uzyskano amplikony o wielkości 590 p.z. – odpowiada to fragmentowi genu *virF*. Przeprowadzone badania przez Feng i wsp. (3) wskazują, że 6 z 7 klinicznych szczepów *Y. enterocolitica* nie miało plazmidu pYV odpowiedzialnego za wirulencję. Feng (3), Harnett (9), Kapperud (13) podają, że plazmid pYV rodzaju *Yersinia* nie jest trwale zachowywany i może być łatwo utracony na skutek wielokrotnego pasażowania, przechowywania szczepów, czy też inkubacji w 37°C. Potwierdzają to uzyskane wyniki w prezentowanej pracy, gdyż wśród szczepów *Yersinia enterocolitica* najwcześniej wyizolowanych, tj. w 1994-95 r. uzyskano najmniejszą liczbę szczepów mających gen *virF* i *yadA* w stosunku do liczby szczepów użytych do badań. Natomiast w przypadku 18 badanych szczepów *Y. enterocolitica*, które zostały wyizolowane w 1998 r. aż 14 posiadało gen *virF* i *yadA*. Zdaniem wielu autorów określanie chorobotwórczości pałeczek *Yersinia enterocolitica* wyłącznie w oparciu o markery plazmidowe może prowadzić do uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych (2, 10, 12). Prezentowane rezultaty badań sugerują, że zastosowanie tylko plazmidowych markerów wirulencji do identyfikowania chorobotwórczych szczepów pałeczek *Yersinia enterocolitica* nie zawsze jest wystarczające.

Wnioski

1. Metoda multiplex PCR ze swoistymi starterami *yadA*-1, *yadA*-2 oraz *virF*-1, *virF*-2 jest przydatna do wykrywania chorobotwórczych szczepów *Yersinia enterocolitica* bezpośrednio wyosobnionych z badanego materiału.

2. Zastosowanie reakcji multiplex PCR do wykrywania plazmidowych i chromosomalnych markerów wirulencji *Yersinia enterocolitica* może mieć duże znaczenie w dochodzeniach epidemiologicznych.

Piśmiennictwo

1. China B., N'Guyen B., De Bruyere M., Cornelis G.: Role of *YadA* in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 1994, 62, 1275-1281.
2. Delor I., Kaackenbeek A., Wauters G., Cornelis G.: Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and nonpathogenic *Yersinia*. *Infect. Immun.* 1990, 58, 2983-2988.
3. 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.
4. Gemski P., Lazere J., Casey T.: Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 1980, 27, 682-685.
5. Gierczyński R.: Ocena przydatności wybranych markerów wirulencji do identyfikowania chorobotwórczych szczepów pałeczek *Yersinia enterocolitica*. II Genotypowe markery związane z plazmidem pYV. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2000, 52, 35-49.
6. Gierczyński R.: Ocena przydatności wybranych markerów wirulencji do identyfikowania chorobotwórczych szczepów pałeczek *Yersinia enterocolitica*. III Chromosomalne markery wirulencji. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2000, 52, 51-65.
7. Gierczyński R., Jagielski M., Szych J., Kałużewski S.: Występowanie plazmidów wirulencji w szczepach pałeczek *Yersinia* pochodzących z różnych źródeł. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1996, 48, 141-150.
8. Górka A., Brzostek K., Hrebenda J.: Białka *Yop* rodzaju *Yersinia* – mechanizm sekrecji i translokacji. *Post. Mikrobiol.* 1999, 38, 119-141.
9. Harnett N., Lin Y. P., Krishnan C.: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* using the multiplex polymerase chain reaction. *Epidemiol.* 1996, 117, 59-67.
10. Ibrahim A., Liesack W., Griffiths M., Robins-Browne R.: Development of a 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.
11. Jakubczak A.: Chorobotwórczość pałeczek *Yersinia enterocolitica* izolowanych od trzody chlewnej i ich występowanie. Praca hab., Acta Acad. Agriculturae. Tech. Olst. Veterinaria 1995.
12. Kandolo K., Wauters G.: Pyrazinamidase activity in *Yersinia enterocolitica* and related organisms. *J. Clin. Microbiol.* 1985, 21, 980-982.
13. Kapperud G., Vardund T., Skjerve E., Hornes E., Michaelsen T. E.: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reactions, and colorimetric detection of amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59, 2938-2944.
14. Kot B., Bukowski K., Jakubczak A.: Analiza bakteriocynogennych właściwości szczepów *Yersinia enterocolitica*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1999, 51, 91-101.
15. Kot B., Jakubczak A., Kosek A., Bukowski K., Bem I.: Application of *Yersinia enterocolitica* bacteriocins for the rapid identification of *Yersinia enterocolitica* strains isolated from pigs and human. *Adv. Agriculture. Sci.* 2000, 7, 29-34.
16. Kur J.: Podstawy inżynierii genetycznej. Wyd. Politechniki Gdańskiej, Gdańsk 1994.
17. Mullis K., Faloona F., Scharf S.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1986, 51, 263-273.
18. Pilz D., Vocke T., Heesemann J., Bra V.: Mechanism of *YadA*-mediated serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect. Immun.* 1992, 60, 189-195.
19. Riley G., Toma S.: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by using Congo red – magnesium oxalate agar medium. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27, 213-214.
20. Straley S., Plano G., Skrzypek E., Bliska J.: Yops of *Yersinia* spp. pathogenic for humans. *Infect. Immun.* 1993, 61, 3105-3110.
21. Wiśniewski J., Bielecki J.: Mechanizmy wirulencji bakterii z rodzaju *Yersinia*. *Post. Mikrobiol.* 1996, 35, 213-241.
22. Woźniak-Kosek A., Kot B., Jakubczak A., Grzybowski J.: Zastosowanie metody PCR do identyfikacji markerów chorobotwórczości szczepów *Yersinia enterocolitica* izolowanych od ludzi i świń. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 183-186.
23. Wren B., Tabasqchali S.: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction. *Lancet* 1990, 336, 693.