

Ocena właściwości hemaglutynacyjnych pałeczek z rodzaju *Yersinia* izolowanych od ludzi i świń

BARBARA KOT, ANTONI JAKUBCZAK, ALICJA BARSZCZEWSKA

Zakład Mikrobiologii Instytutu Biologii AP, ul. Prusa 12, 08-110 Siedlce

Kot B., Jakubczak A., Barszczewska A.

Evaluation of hemagglutination properties of *Yersinia* rods isolated from humans and pigs

Summary

The aim of the study was to evaluate hemagglutination properties of *Yersinia* rods isolated from humans and pigs. Hemagglutination test with 3% fresh and tanned human and sheep group O erythrocytes in the presence and absence of D-mannose was used for detecting the presence and type of fimbriae in these rods. All the tested *Y. pseudotuberculosis* strains agglutinated fresh and tanned human and sheep erythrocytes. Out of 39 tested strains isolated from humans, 82.05% agglutinated fresh human erythrocytes. A smaller percentage of strains, i.e. 61.53%, demonstrated the ability of the agglutination of sheep erythrocytes. Among the tested *Y. enterocolitica* strains from pigs, 53.2% of them agglutinated human erythrocytes and 38.7% showed the ability of the agglutination of sheep erythrocytes. In the tested group of *Y. enterocolitica*, strains were obtained which agglutinated only tanned erythrocytes. All the *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* that demonstrated hemagglutination properties produced mannose-resistant hemagglutinins. A greater number of the estimated *Y. enterocolitica* from both people and pigs agglutinated human erythrocytes. The greatest agglutination activity on fresh and tanned erythrocytes from people and sheep was shown by O3 serogroup strains isolated from people. The percentage of O3 serogroup strains isolated from pigs and the percentage of all the tested O9 serogroup strains were smaller in all the variants of the hemagglutination test. *Y. enterocolitica* strains of O2 and O5 serogroups, and *Y. kristensenii* strains demonstrated no hemagglutination properties.

Keywords: *Yersinia*, humans, pigs

Pałeczki należące do gatunków *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* charakteryzuje szerokie rozprzestrzenienie w przyrodzie. Gatunki te obejmują szczepy chorobotwórcze dla ludzi i zwierząt, a także szczepy uznawane za niepatogenne. Naturalnym rezerwuarem omawianych pałeczek są domowe i dziko żyjące zwierzęta. Najistotniejszym rezerwuarem patogennych dla ludzi szczepów *Y. enterocolitica* są świny, a izolacji dokonuje się zarówno z migdałków, gardła, języka, mięsa, jak również z kału (3, 4). Od chwili stwierdzenia identyczności serotypów, biotypów i fagotypów wśród szczepów *Y. enterocolitica* izolowanych od trzody chlewnej i ludzi zwrócono uwagę na świny jako źródło pierwotnego zakażenia dla człowieka. Pałeczki *Y. enterocolitica* odznaczają się dużą różnorodnością pod względem aktywności biochemicznej, wrażliwości na fagi oraz budowy antygenowej. Większość chorobotwórczych dla człowieka pałeczek *Y. enterocolitica* zaliczanych jest do biotypów 2, 3 i 4 oraz grup serologicznych O3, O8, O9 i O5 (18). W Europie dominują pałeczki *Y. enterocolitica* serogrupy O3, biotyp 4. Ważnym z epidemiologicznego punktu widzenia serotypem jest również serogrupa O9, biotyp 2 (6, 8). *Y. enterocolitica* może powodować ostre zapalenie żołądka i jelit, ale może też wywoływać inne objawy, m.in. ropne zapalenie skóry, zapalenie szpiku i kości, rumień guzowaty czy też zapalenie stawów (5, 19).

Jedną z cech drobnoustrojów ułatwiających kolonizację makroorganizmu, a następnie zakażenie jest obecność na powierzchni komórki bakteryjnej fimbrii, dla których receptorem są węglowodany występujące w cząsteczkach gliko-

protein lub glikolipidów komórek ludzkich (20). Obecność takich receptorów stwierdzono również na powierzchni erytrocytów, dlatego też hemaglutynacja jest stosowana w celu określenia u badanych szczepów adhezyn nazywanych hemaglutyninami (17). Stwierdzenie aglutynacji krwinek przez szczepy z rodziny *Enterobacteriaceae* posiadające fimbrie było pierwszym dowodem wskazującym na związek tego typu struktur ze zdolnością przylegania bakterii do komórek zwierzęcych, a jednocześnie pozwoliło charakteryzować powierzchnię tych drobnoustrojów na podstawie prostego testu (17).

Celem badań była ocena właściwości hemaglutynacyjnych pałeczek z rodzaju *Yersinia* wyosobnionych od ludzi i świń.

Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Badaniami objęto *Yersinia enterocolitica* wyosobnione z przypadków biegunek u ludzi (39 szczepów) oraz 65 szczepów *Y. enterocolitica*, 5 szczepów *Y. pseudotuberculosis* i 1 szczep *Y. kristensenii*, wyosobnione z wymazów z jamy gębowej, powierzchni półtuszy świń i kału prosiąt. Metodę izolacji szczepów oraz sposób identyfikacji grup serologicznych opisano wcześniej (10, 11).

Ocena adhezji szczepów bakteryjnych do krwinek czerwonych człowieka i barana. Badane szczepy z rodzaju *Yersinia* hodowano na podłożu płynnym TSB (Difco) z dodatkiem 1% glukozy. Hodowlę prowadzono w temp. 25°C przez 48 h, następnie wirowano (3500 g, 10 min.). Komórki bakteryjne przepłukiwano trzykrotnie PBS (pH 7,2). Do badań użyto zawiesiny świeżych i taniowanych ludzkich krwinek grupy 0 i baranich. Krwinki

świeże dwukrotnie przepłukiwano roztworem płynu fizjologicznego (0,85% NaCl) i zawieszano w tym roztworze do końcowego stężenia wynoszącego 3%. Tanimowanie krwinek wykonano metodą Podschuna i wsp. (16). Kwas taninowy (Merck) rozpuszczano w buforze fosforanowym (pH 7,2) do końcowego stężenia 0,01% i dodawano do 3% zawiesiny krwinek w stosunku 1 : 1 (v/v), a następnie inkubowano w łaźni wodnej przez 15 min. w 37°C. Tanimowane krwinki dwukrotnie przemywano buforem fosforanowym i zawieszano w tym roztworze do końcowego stężenia wynoszącego 3%. Jako inhibitor hemaglutynacji zastosowano D-mannozę w postaci 2,5% wodnego roztworu.

Wykonanie testu hemaglutynacji. Test wykonano w okrągłodennych płytkach titracyjnych. We wszystkich wariantach testu hemaglutynacji mieszano 50 µl zawiesiny komórek badanego szczepu o gęstości ok. 10⁸ komórek/ml z 50 µl 3% zawiesiny krwinek. W celu określenia swoistości cukrowej hemaglutynacji do analogicznie przygotowanej mieszaniny komórek bakteryjnych i świeżych krwinek dodawano 50 µl 2,5% roztworu D-mannozy. Próby przez 10 min. delikatnie wytrząsano w temperaturze pokojowej, następnie umieszczano w temperaturze 4°C. Wyniki odczytywano po 30 min. inkubacji.

Wyniki i omówienie

Wszystkie badane szczepy *Y. pseudotuberculosis* aglutynowały świeże oraz taminowane erythrocyty ludzkie i baranie. Z testowanych 39 szczepów *Y. enterocolitica*, które pochodziły od ludzi 82,05% aglutynowało świeże krwinki ludzkie. Mniejszy odsetek, tj. 61,53% szczepów wykazywało zdolność aglutynacji erythrocytów baranich. Wśród szczepów *Y. enterocolitica* pochodzących od trzody chlewnej stwierdzono mniejszy odsetek szczepów wykazujących właściwości hemaglutynacyjne, gdyż 53,2% szczepów aglutynowało erythrocyty ludzkie oraz 38,7% szczepów wykazywało zdolność aglutynacji erythrocytów baranich (ryc. 1). Aktywność hemaglutynacyjna badanych szczepów *Y. enterocolitica* była wyższa wobec erythrocytów taminowanych. Szczególnie duży wzrost liczby szczepów aglutynujących uzyskano w przypadku taminowanych krwinek baranich (tab. 1, 2, ryc. 1).

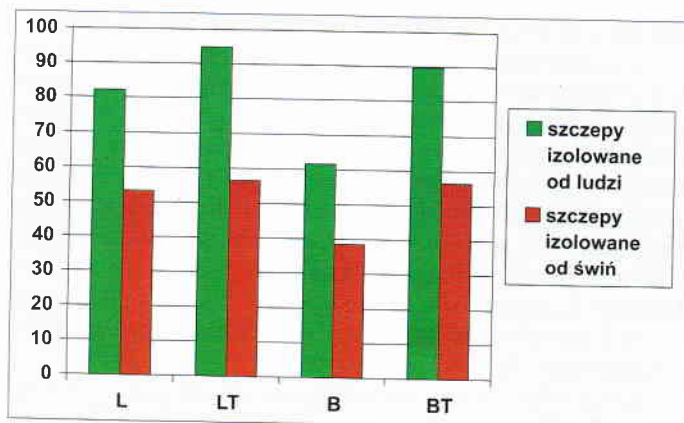
Wszystkie szczepy *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* wykazujące właściwości hemaglutynacyjne wytwarzały adhezyny mannozooporne, gdyż aglutynacja krwinek ludzkich i baranich nie była hamowana po dodaniu D-mannozy do środowiska reakcji. Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez Old i Adekbola (15) oraz MacLagan i Old (13), którzy podają, że *Y. enterocolitica* wytwarza mannozooporne hemaglutyniny, które charakteryzuje zdolność aglutynacji różnych gatunków erythrocytów, a ich wytwarzanie zachodzi w temperaturze 22°C-30°C. Badane szczepy z rodzaju *Yersinia* inkubowano w temperaturze 25°C. Wymienieni autorzy podają również, że mannozooporne hemaglutyniny pałeczek *Y. enterocolitica* związane są z obecnością na powierzchni komórki grubych, kanałowych fimbrii o średnicy 8 nm. Nadają one komórkom właściwości hydrofobowe (9). Właściwości hydrofobowe badanych szczepów *Y. enterocolitica* zostały określone wcześniej (12). Stwierdzono, że bardzo silne właściwości hydrofobowe ujawniały przede wszystkim szczepy *Y. enterocolitica* wyosobnione od chorych ludzi (75%), natomiast w przypadku pałeczek wyosobnionych od klinicznie zdrowych świń odsetek szczepów o bardzo silnych właściwościach hydrofobowych wynosił 30 (12).

Drugi rodzaj mannozoopornych hemaglutynin wytwarzanych przez *Y. enterocolitica*, określane jako typ 3, związa-

Tab. 1. Właściwości hemaglutynacyjne szczepów *Y. enterocolitica* pochodzących od ludzi

Serogrupa	Liczba badanych szczepów	Krwinki	Liczba szczepów hemaglutynujących
03	34	L	30
		LM	30
		LT	34
		B	22
		BM	22
		BT	32
09	5	L	2
		LM	2
		LT	3
		B	2
		BM	2
		BT	3

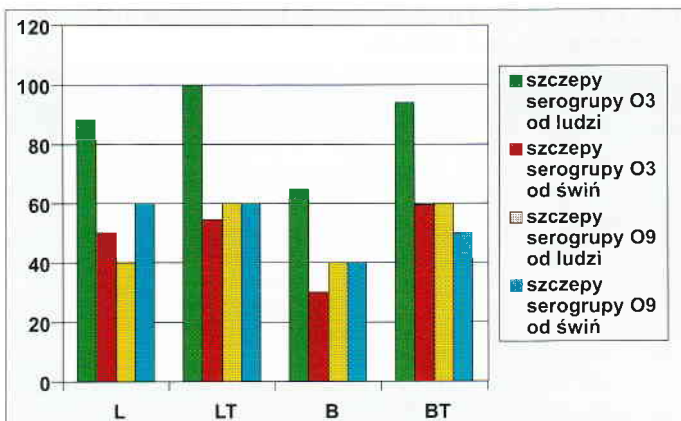
Objaśnienia: L – krwinki ludzkie; B – krwinki baranie; LM, BM – reakcja aglutynacji krwinek ludzkich i baranich w obecności D-mannozy; LT, BT – krwinki taminowane



Ryc. 1. Odsetek hemaglutynujących szczepów *Y. enterocolitica* izolowanych od ludzi i świń

Objaśnienia: L – krwinki ludzkie; LT – krwinki ludzkie taminowane; B – krwinki baranie; BT – krwinki baranie taminowane

ny jest z cienkimi fimbriami o średnicy 4 nm, które nie posiadają kanałów. Właściwości hemaglutynacyjne bakterii wynikające z obecności tych fimbrii charakteryzuje wąski zakres jeśli chodzi o rodzaje aglutynowanych erythrocytów oraz zdolność aglutynacji tylko taminowanych krwinek. W grupie badanych szczepów *Y. enterocolitica* uzyskano szczepy, które aglutynowały tylko erythrocyty taminowane. Wśród szczepów izolowanych od ludzi 5 szczepów (12,82%) aglutynowało tylko taminowane krwinki ludzkie oraz 11 szczepów (28,21%) taminowane erythrocyty baranie. W przypadku szczepów *Y. enterocolitica* izolowanych od świń, które aglutynowały tylko erythrocyty taminowane były 2 szczepy (3,25%) aglutynujące erythrocyty ludzkie oraz 11 szczepów (17,75%) aglutynujących erythrocyty baranie. Hemaglutyniny mannozooporne odpowiedzialne za aglutynację taminowanych erythrocytów i nie aglutynujące erythrocytów świeżych opisano u wielu szczepów *Klebsiella* (14), rzadziej natomiast występują u pałeczek *Salmonella* (1). Pałeczki *Y. enterocolitica*, *Klebsiella* i *Salmonella* produkują morfologicznie podobny rodzaj cienkich fimbrii o średnicy 4 nm oraz o zbliżonej budowie antygenowej (2). Kapperud i Lassen (7) badając 338 szczepów z rodzaju *Yersinia* uzyskali 6 wzorów aktywności mannozoopornych hemaglutynin (MRHA) reagujących co najmniej z jednym z 3 gatunków



Ryc. 2. Odsetek hemaglutynujących szczepów *Y. enterocolitica* serotypy O3 i O9 izolowanych od ludzi i świń
 Objasnienia: L – krwinki ludzkie; LT – krwinki ludzkie tannowane; B – krwinki baranie; BT – krwinki baranie tannowane

erytrocytów (erytrocyty ludzkie grupy 0, drobiu, świń). Oceniane szczepy *Y. enterocolitica* pochodzące zarówno od ludzi, jak i od świń liczniej aglutynowały erytrocyty ludzkie.

Uwzględniając pochodzenie badanych szczepów i ich właściwości serologiczne stwierdzono, że najwyższą aktywność aglutynacyjną w stosunku do świeżych oraz tannowanych erytrocytów ludzkich i baranich wykazywały szczepy serotypu O3 pochodzące od ludzi (ryc. 2). Odsetek szczepów serotypu O3 izolowanych od świń oraz odsetek wszystkich badanych szczepów serotypu O9 był we wszystkich wariantach testu hemaglutynacji mniejszy (ryc. 2). Badane szczepy *Y. enterocolitica* serotypu O2 i O5 oraz szczep *Y. kristensenii* nie wykazywały właściwości hemaglutynacyjnych (tab. 2).

Ocena właściwości hemaglutynacyjnych pałeczek z rodzaju *Yersinia* pozwala na wykrycie i zróżnicowanie szczepów pod względem zdolności wytwarzania fimbrii, które uczestniczą w pierwszym etapie procesu zakażenia, jakim jest adhezja.

Pismienictwo

- Adegbola R. A., Old D. C., Aleksic S.: Rare MR/K-like haemagglutinins (and type 3-like fimbriae) of Salmonella strains. FEMS Microbiol. Lett. 1983, 19, 233-238.
- Aleksic S., Aleksic V.: Purification and physicochemical analysis of the fimbrial antigen in two different genera of Enterobacteriaceae: Salmonella enteritidis and Yersinia enterocolitica. Zbl. Bakt. Hyg. 1979, A 243, 177-196.
- Fredriksson-Ahoma M., Korkeala H.: Low occurrence of pathogenic Yersinia enterocolitica in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. Clin. Microbiol. 2003, 16, 220-229.
- Fredriksson-Ahoma M., Niskanen T., Bucher M., Stolle A., Korkeala H.: Different Yersinia enterocolitica 4:O3 genotypes found in pig tonsils in Southern Germany and Finland. Syst. Appl. Microbiol. 2003, 1, 132-137.
- Hariharan H., Bryenton J.: Isolation of Yersinia spp. from cases of diarrhea. Can. Vet. J. 1990, 11, 799-780.
- Kapperud G.: Yersinia enterocolitica in food hygiene. Int. J. Food Microbiol. 1991, 12, 53-66.
- Kapperud G., Lassen J.: Relationship of virulence-associated autoagglutination to hemagglutinin production in Yersinia enterocolitica and Yersinia enterocolitica-like bacteria. Infect. Immun. 1983, 42, 163-169.
- Kapperud G., Nesbakken T., Aleksic S., Mollaret H.: Comparison of restriction endonuclease analysis and phenotypic methods for differentiation of Yersinia enterocolitica isolates. J. Clin. Microbiol. 1990, 28, 1125-1131.
- Kihlstrom E., Magnusson K. E.: Haemagglutinating, adhesive and physico-chemical surface properties of different Yersinia enterocolitica and Yersinia enterocolitica-like bacteria. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (B) 1983, 91, 113-119.
- Kot B., Bukowski K., Jakubczak A.: Analiza bakteriocynogennych właściwości szczepów Yersinia enterocolitica. Med. Dośw. Mikrobiol. 1999, 51, 91-101.
- Kot B., Jakubczak A., Kosek A., Bukowski K., Bem J.: Application of Yersinia enterocolitica bacteriocins for the rapid identification of Yersinia enterocolitica strains isolated from pigs and human. Adv. Agric. Sci. 2000, 7, 29-34.

Tab. 2. Właściwości hemaglutynacyjne pałeczek z rodzaju *Yersinia* pochodzących od świń

Gatunek	Serogrupa	Liczba badanych szczepów	Krwinki	Liczba szczepów hemaglutynujących
<i>Y. enterocolitica</i>	O3	42	L	21
			LM	21
			LT	23
			B	16
			BM	16
			BT	25
	O9	20	L	12
			LM	12
			LT	12
			B	8
			BM	8
			BT	10
	O2	2	L	0
			LM	0
			LT	0
B			0	
BM			0	
BT			0	
O5	1	L	0	
		LM	0	
		LT	0	
		B	0	
		BM	0	
		BT	0	
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	5	L	5	
		LM	5	
		LT	5	
		B	5	
		BM	5	
<i>Y. kristensenii</i>	1	L	0	
		LM	0	
		LT	0	
		B	0	
		BM	0	
<i>Y. kristensenii</i>	1	BT	0	

Objasnienia: jak w tab. 1.

- Kot B., Oszejca A., Jakubczak A., Bukowski K., Woźniak-Kosek A.: Ocena hydrofobowych właściwości szczepów Yersinia enterocolitica wyizolowanych od ludzi i trzody chlewnej. Med. Dośw. Mikrobiol. 2001, 53, 31-38.
- MacLagan R. M., Old D. C.: Haemagglutinins and fimbriae in different serotypes and biotypes of Yersinia enterocolitica. J. Appl. Bacteriol. 1980, 49, 353-360.
- Old D. C., Adegbola R. A.: A new mannose-resistant haemagglutinin in Klebsiella. J. Appl. Bacteriol. 1983, 55, 165-172.
- Old D. C., Adegbola R. A.: Relationships among broad-spectrum and narrow-spectrum mannose-resistant fimbrial haemagglutinins in different Yersinia species. Microbiol. Immunol. 1984, 28, 1303-1311.
- Podschun R., Heineken P., Sonntag H. G.: Haemagglutinins and adherence properties to HeLa and intestine 407 cells of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca isolates. Zbl. Bakt. Hyg. A. 1987, 263, 585.
- Rodriguez-Ortega M., Ofek I., Sharon N.: Membrane glycoproteins of human polymorphonuclearleukocytes that act as receptors for mannose-specific Escherichia coli. Infect. Immun. 1987, 55, 968-973.
- Schiemann D. A., Devenish A. J.: Relationship of HeLa cell infectivity to biochemical, serological, and virulence characteristics of Yersinia enterocolitica. Infect. Immun. 1982, 35, 497-506.
- Stojek N.: Jersinioza u ludzi i zwierząt. Med. Ogólna 1996, 2, 30-34.
- Tylewska S., Ławrynowicz J., Hryniewicz W.: Mechanizm i biologiczne znaczenie adhezji bakteryjnej. Post. Mikrobiol. 1985, 42, 3-27.

Adres autora: dr Barbara Kot, ul. Prusa 12, 08-110 Siedlce