

Zjadliwość *Yersinia enterocolitica* oraz znaczenie biotypu 1A w patogenezie jersiniozy*)

ALEKSANDRA PLATT-SAMORAJ, AGATA BANCERZ-KISIEL, WOJCIECH SZWEDA

Zespół Epizootologii Katedry Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

Platt-Samoraj A., Bancierz-Kisiel A., Szveda W.

Yersinia enterocolitica pathogenicity and the significance of biotype 1A in the pathogenesis of yersiniosis

Summary

Yersinia enterocolitica is an extremely varied organism due to its biochemical, antigen and pathogenic properties. Six biotypes are distinguished within the species but, from the clinical point of view, only five of them: 1B, 2, 3, 4, and 5 are considered to be the cause of yersiniosis. The main criterion for the above division is pathogenicity, which correlates with presence of the virulent pYV plasmid. Microorganisms which lack this plasmid are considered to be a-virulent. However the pYV plasmid may easily be lost during the process of culturing or storage. Biotype 1A strains of *Y. enterocolitica* are often considered to be non-pathogenic primarily because they do not possess the pYV. These same strains of 1A biotype are able to cause diseases through unknown mechanisms that are independent of the virulent plasmid presence. Evaluating the pathogenicity of this biotype seems to be more complex. The increasing significance of 1A biotype and the possibility of losing pYV in strains belonging to residual biotypes necessitate further studies which would clear up doubts relating to *Y. enterocolitica* pathogenicity.

Keywords: *Yersinia enterocolitica*, virulence plasmid pYV, biotype 1A

Pałeczka *Yersinia enterocolitica* jest drobnoustrojem niezwykle zróżnicowanym pod względem właściwości biochemicznych i patogennych, w obrębie którego wyróżnia się 6 biotypów: 1A, 1B, 2, 3, 4 i 5. Kryterium tego podziału stanowi głównie chorobotwórczość *Y. enterocolitica*. Za patogenne uważane są szczepy należące do biotypów 1B i 2-5, które są odporne na fagocytozę, indukują apoptozę komórek w hodowlach *in vitro* oraz posiadają tzw. markery wirulencji. Natomiast szczepy należące do biotypu 1A, nie posiadające wymienionych właściwości biochemicznych oraz markerów wirulencji, uważane są za szczepy niepatogenne (2, 10, 14, 19, 25).

W trakcie dochodzenia epidemiologicznego pewne trudności sprawia szybkie i pewne określenie patogenności wyizolowanych pałeczek *Y. enterocolitica*. Do niedawna uważano problem ten za stosunkowo prosty. Założono, że w rutynowych badaniach wystarczy stwierdzenie obecności plazmidu pYV (plasmid *Yersinia* Virulence), podstawowego czynnika świadczącego o chorobotwórczości *Y. enterocolitica*, związanego z wytwarzaniem białek Yop (*Yersinia* outer protein), które zaburzają fizjologiczne funkcje makrofagów oraz wykazują cytotoksyczne działanie na komórki gospodarza (2, 10, 18, 21).

Ponadto w plazmidzie pYV zlokalizowany jest gen *yadA* warunkujący ekspresję białka fimbrialnego *YadA* (*Yersinia* adherence), tworzącego fibryle biorące udział w procesie przylegania i wnikania *Y. enterocolitica* do komórek nabłonkowych jelita (9, 10, 21, 28). Wykazano, że szczepy posiadające plazmidy pYV mają pewne wspólne właściwości, m.in. wzrost zależny od stężenia jonów wapnia, zdolność do absorpcji czerwieni Kongo, zdolność do autoaglutynacji oraz oporność na bakterio-bójcze działanie surowicy ludzkiej. Przyjmuje się nawet, że samo stwierdzenie powyższych cech, świadczących pośrednio o obecności plazmidu pYV, pozwala uznać badany szczep za zjadliwy (9, 16, 18, 21). Wiadomo jednak, że stosunkowo łatwo dochodzi do utraty tej cechy u szczepów dłużej przechowywanych, po pasażach czy inkubacji w temperaturze powyżej 37°C. Zatem brak plazmidu pYV nie może świadczyć o braku zjadliwości badanego izolatu w chwili pobierania materiału do badań. Ostatnie badania dowiodły, że niektóre szczepy, które go straciły, ciągle były w stanie lokalizować się wewnątrz komórek, co wskazuje, że nie jest to jedyny mechanizm kodowania czynników warunkujących wnikanie do komórki w procesie zwanym internalizacją, a obecność tego plazmidu nie może stanowić jedyne go wskaźnika patogennych właściwości *Y. enterocolitica* (3, 12, 18, 21, 26).

Poszukując innych możliwości określania patogenności *Y. enterocolitica* wykazano, że istnieje związek

*) Badania finansowane ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2004-2007 jako projekt badawczy (Nr projektu: 2 PO6K 023 27).

między obecnością białek chromosomalnych Ail (Attachment invasion locus) i Yst (*Yersinia* stable toxin) a zjadliwością tego drobnoustroju (10, 11, 14, 15).

Białko Ail ma masę cząsteczkową 17 kDa i powstaje w wyniku ekspresji genu *ail*. Uważa się, że gen ten występuje tylko u chorobotwórczych szczepów *Y. enterocolitica*. Białko Ail bierze udział w procesie wiązania bakterii z powierzchnią komórek ssaków, umożliwia wnikanie drobnoustroju do komórki i wzmacnia oporność *Y. enterocolitica* na bakteriobójcze działanie dopełniacza. Po wnikięciu do organizmu gospodarza oporność na bakteriobójcze działanie surowicy umożliwia przeżycie bakterii w głębi tkanek (1, 10, 14-16, 27).

Termostabilna enterotoksyna Yst, kodowana przez chromosomalny gen *yst*, ułatwia natomiast wnikanie drobnoustroju do wnętrza tkanek poprzez uszkodzenie nabłonka jelitowego (10, 19, 21, 22). Optymalna temperatura hodowli *Y. enterocolitica*, w której zachodzi *in vitro* synteza Yst wynosi 26°C, przy pH obojętnym. Od niedawna wiadomo, że przy lekko zasadowym pH możliwa jest synteza Yst również w temperaturze 37°C, czyli w takich warunkach, jakie panują w końcowym odcinku jelita biodrowego (3, 13, 17, 24). Klasyczne szczepy patogenne są znane z produkcji termostabilnej enterotoksyny zwanej Yst A (*Yersinia* stable toxin-A), natomiast szczepy biotypu 1A produkują warianty enterotoksyny Yst określane jako YstB, YstC lub ostatnio odkryta YstII (7, 13, 19, 24). Badania wykazały, że enterotoksyny Yst wytwarzane przez *Y. enterocolitica* są biologicznie analogiczne do enterotoksyny St wytwarzanej przez *E. coli*. Powodują podobne zmiany w hodowlach komórkowych, wzrost produkcji cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP), nagromadzenie płynów w jelicie, mają taką samą masę cząsteczkową oraz analogiczną oporność na temperaturę i kwasy (13, 17, 19, 22, 23). Zatem, jeśli szczepy należące do biotypów 1B i 2-5 zawierają geny *ail* i *ystA*, można z dużym prawdopodobieństwem stwierdzić, że są to szczepy chorobotwórcze.

Nieco bardziej skomplikowany wydaje się problem oceny chorobotwórczości szczepów *Y. enterocolitica* należących do biotypu 1A. Do niedawna drobnoustroje zakwalifikowane do tej grupy uważane były za niepatogenne. Obecnie coraz częściej z przypadków klinicznych izolowane są pałeczki *Y. enterocolitica* należące właśnie do biotypu 1A, które są w stanie dokonać inwazji do komórek epitelialnych oraz wykazują oporność na działanie makrofagów (1, 11, 12, 26). Zdecydowana większość szczepów biotypu 1A zawiera geny *ystB*, niekiedy *ystC*, indukujące produkcję odpowiednich enterotoksyn, których rola w patogeniezie jersiniozy nie jest znana (12, 19, 24, 25). Brak klasycznych markerów wirulencji u szczepów biotypu 1A (*ail* i *ystA*) wskazuje zatem na inne mechanizmy patogenetyczne niż stwierdzone w przypadku biotypów 1B i 2-5. W badaniach *in vitro* prowadzonych w hodowlach komórkowych wykazano, że *Y. enterocolitica* biotyp 1A dokonuje inwazji komórek bardziej efektywnie niż szczepy produkujące białko Ail (24, 25). Szczepy te, chociaż nigdy nie posiadały plazmidu pYV, lokalizują się w organizmie gospodarza wewnątrzkomórkowo, tak jak klasyczne

szczepy chorobotwórcze, natomiast mechanizmy inwazji do komórek epitelialnych są nieznane. Sugeruje się istnienie innych, odmiennych mechanizmów penetracji komórek przez szczepy biotypu 1A (11).

Wiadomo, że szczepy należące do biotypu 1A, pochodzące ze środowiska, nie kolonizują przewodu pokarmowego eksperymentalnie zakażonych zwierząt (11, 25). Pomimo tych obserwacji stwierdzono, że niektóre szczepy biotypu 1A były przyczyną chorób żołądkowo-jelitowych u ludzi, np. w Kanadzie szczep *Y. enterocolitica* należący do serotypu O:5 wywołał zapalenie żołądka i jelit u 9 pacjentów (20). Przebieg choroby był identyczny, jak ten spowodowany przez klasyczne wirulentne biotypy (2, 11, 23). Serotypy O:5 i O:6,30 *Y. enterocolitica* były natomiast przyczyną ronień u owiec i bydła (4-6). Mechanizmy patogenetyczne w przebiegu chorób wywołanych przez biotyp 1A są niejasne, nie ma też powszechnie ustalonych markerów wirulencji dla tego biotypu. Wprawdzie niektóre szczepy biotypu 1A produkują warianty enterotoksyny YstA (YstB, YstC, YstII), ale ich występowanie i udział w przebiegu choroby nie został dotychczas poznany. Nieznane są też przypuszczalne markery wirulencji biotypu 1A (8, 11, 19). Istnieją natomiast sugestie, że pojawienie się opisanych przypadków wynika z tego, że patogenność szczepów *Y. enterocolitica* należących do biotypu 1A prawdopodobnie ulega zmianie (1, 26).

Dotychczas nie ustalono związku między tradycyjnymi kryteriami chorobotwórczości *Y. enterocolitica* a występowaniem biegunki. Ramamurthy i wsp. (19) wykazali, że gen *ystB* występował u większości szczepów należących do tzw. niechorobotwórczych bioserotypów, chociaż 50% izolatów pochodziło z przypadków klinicznych. W teście na oseskach mysich 88,9% tych szczepów wywoływało akumulację płynów w jelicie, co uwypukla rolę toksyny YstB w chorobotwórczości *Y. enterocolitica* i sugeruje, że biotyp 1A nie zawsze powinien być traktowany jako niechorobotwórczy, jak to wcześniej twierdzono. Ponadto minimalna efektywna dawka oczyszczonej toksyny YstB jest znacznie niższa (0,4 pmol) niż YstA (7,6 pmol) (219). Enterotoksyna YstB jest zatem wielokrotnie silniejsza niż YstA i dokładnie tak samo silna jak St, którą wytwarza *E. coli*, gdzie minimalna dawka efektywna również wynosi 0,4 pmol. Świadczy to o dużym znaczeniu enterotoksyny YstB w patogeniezie infekcji pokarmowych. Nawet jeśli niechorobotwórcze szczepy *Y. enterocolitica*, zwłaszcza należące do biotypu 1A, rzadko powodują biegunki, to można założyć, że szczepy posiadające gen *ystB* mogą w niektórych przypadkach być ich czynnikiem etiologicznym (19).

W badaniach przeprowadzonych przez Ramamurthy i wsp. (19), Granta i wsp. (11) oraz Thoernera i wsp. (27) gen *ystB* występował odpowiednio u 89%, 87,3% i 80% szczepów *Y. enterocolitica* należących do biotypu 1A. Wynika z tego, że gen *ystB* jest bardzo powszechny wśród serotypów *Y. enterocolitica* należących do biotypu 1A. Nie oznacza to jednak, że wszystkie te szczepy produkują enterotoksynę YstB. Według danych z piśmiennictwa, tworzenie enterotoksyn stwierdzane było

tylko u niektórych szczepów ystB-dodatnich. Sugeruje to obecność tzw. cichych genów ystB (3, 19, 24). Fenomen ten, opisany przez kilku badaczy na przykładzie genu ystA wydaje się spowodowany nie przez spontaniczne mutacje, lecz przez wyciszenie genu yst działaniem ymoA, genu kodującego YmoA (*Yersinia* modulator), histonopodobne białko odgrywające negatywną rolę w regulacji ekspresji różnych genów *Yersinia*. Podobnie do działania białek histonowych YmoA wyłącza działanie genu ystA i prawdopodobnie również ystB (3, 7, 8, 11, 19, 24, 25, 28).

Opisywano bardzo rzadkie występowanie genu ystA wśród szczepów *Y. enterocolitica* należących do biotypu 1A (7, 11, 19, 24), lecz nie opisano dotychczas obecności genu ystB u szczepów należących do biotypów 1B i 2-5. Wydaje się, że występowanie genu ystB ograniczone jest wyłącznie do biotypu 1A *Y. enterocolitica* i jest on markerem wirulencji tych szczepów.

Singh i Viridi (25) wykazali istnienie różnic między szczepami biotypu 1A *Y. enterocolitica* izolowanymi od świń a szczepami pochodzącymi z innych źródeł. Badano też interakcje między szczepami pochodzącymi z przypadków klinicznych u ludzi, wyizolowanymi z gardła świń i szczepami pochodzącymi ze środowiska (woda, gleba). Najwyższy potencjał zjadliwości stwierdzono u szczepów pochodzących z przypadków klinicznych u ludzi. Wykazano też, że izolaty pochodzące od trzody chlewnej mogą mieć wyższy potencjał zjadliwości niż szczepy pochodzenia środowiskowego.

W świetle dotychczas przeprowadzonych badań, nie wyjaśniających wszystkich mechanizmów patogenetycznych zakażeń *Y. enterocolitica*, trudno jest interpretować wyniki obecnie stosowanych testów do oceny chorobotwórczości tych drobnoustrojów. Zwraca też uwagę fakt, że w patogeniezie jersiniozy wzrasta znaczenie szczepów *Y. enterocolitica* dotychczas uważanych za niepatogenne. Wiele wskazuje na to, że przypadki kliniczne wywołane przez biotyp 1A będą coraz częste oraz że stosowane obecnie kryteria chorobotwórczości *Y. enterocolitica* mogą okazać się niewystarczające. Wy tłumaczeniem tego faktu zdaje się być znaczna różnorodność bakterii z rodzaju *Yersinia*, przejawiająca się zarówno w ekologii patogenu, jak i w mechanizmach patogenyzy oraz rodzaju żywiciela, a także łatwość tworzenia określonych mutantów. W świetle ostatnich badań nad genomem bakterii *Y. enterocolitica* wydaje się pewne, że ewoluowała ona niezależnie od *Y. pestis* i *Y. pseudotuberculosis* (29). I być może właśnie w tej ewolucji, w ciągłym przystosowywaniu się do zmieniających warunków środowiska zewnętrznego, kryje się istota nie do końca zbadanych mechanizmów chorobotwórczości i wzrastającego znaczenia biotypu 1A.

Wymaga to prowadzenia dalszych intensywnych prac badawczych zmierzających do precyzyjnego określenia uniwersalnych kryteriów chorobotwórczości poznanych dotychczas bioserotypów *Y. enterocolitica*, ostatecznego zbadania mechanizmów ich patogenego oddziaływania na organizm ludzi i zwierząt oraz uzyskania dostatecznych dowodów do zmiany poglądu na istotną rolę szczepów biotypu 1A w patogeniezie jersiniozy.

Piśmiennictwo

1. Bleves S., Cornelis G. R.: How to survive in the host: the *Yersinia* lesson. *Microbes and Infection* 2000, 2, 1451-1460.
2. Bottone E. J.: *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infection* 1999, 1, 323-333.
3. Brzostek K.: Mechanizmy regulacji czynników wirulencji *Yersinia enterocolitica*. *Post. Mikrobiol.* 2004, 43, 7-38.
4. Corbel M. J., Brewer D., Hunter D.: Characterisation of *Yersinia enterocolitica* strains associated with ovine abortion. *Vet. Rec.* 1990, 127, 526-527.
5. Corbel M. J., Ellis B., Richardson C., Bradley R.: Experimental *Yersinia enterocolitica* placentitis in sheep. *Br. Vet. J.* 1992, 148, 339-349.
6. Dasw A. M., Paranjape V. L., Winblad S.: *Yersinia enterocolitica* associated with third trimester abortion in buffaloes. *Trop. Anim. Hlth Prod.* 1986, 18, 109-112.
7. Delor L., Kaeckenbeeck 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.
8. Ellison D. W., Young B., Nelson K., Miller V. L.: YmoA negatively regulates expression of invasion from *Yersinia enterocolitica*. *J. Bacteriol.* 2003, 185, 7153-7159.
9. 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.
10. Gierczyński R.: Ocena przydatności wybranych markerów wirulencji do identyfikowania chorobotwórczych szczepów *Yersinia enterocolitica*. III. Chromosomalne markery wirulencji. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2000, 52, 51-65.
11. Grant T., Bennett-Wood V., Robins-Browne R. M.: Characterization of the interaction between *Yersinia enterocolitica* biotype 1A and phagocytes and epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 1999, 67, 4367-4375.
12. Grant T., Bennett-Wood V., Robins-Browne R. M.: Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers. *Infect. Immun.* 1998, 66, 1113-1120.
13. Mikulskis A. V., Delor L., Thi V. H., Cornelis G. R.: Regulation of the *Yersinia enterocolitica* yst gene. Influence of growth phase, temperature, osmolality, pH and bacterial host factors. *Mol. Microbiol.* 1994, 14, 905-915.
14. Miller V. L., Bliska J. B., Falkov S.: Nucleotide sequence of *Yersinia enterocolitica* ail gene and characterization of the Ail protein product. *J. Bacteriol.* 1990, 172, 1062-1069.
15. Miller V. L., Farmer III J. J., Hill W. E., Falkov S.: The ail locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect. Immun.* 1989, 57, 121-131.
16. Mors V., Pai C. M.: Pathogenic properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 1980, 28, 292-294.
17. Pai C. H., Mors V., Seemayer T. A.: Experimental *Yersinia enterocolitica* enteritis in rabbits. *Infect. Immun.* 1980, 28, 238-244.
18. Portnoy D. A., Moseley S. L., Falkov S.: Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infect. Immun.* 1981, 31, 775-782.
19. Ramamurthy T., Ken-ichi Y., Huang X., Nair G. B., Carniel E., Maruyama T., Fukushima H., Takeda T.: The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (ystB) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the yst gene. *Microbial Pathogenesis* 1997, 23, 189-200.
20. Ratnam S. E., Mercer E., Picco B., Parsons S., Butler R.: Nosocomial outbreak of diarrheal disease due to *Yersinia enterocolitica* serotype O:5, biotype 1. *J. Infect. Dis.* 1982, 145, 242-247.
21. Revell P. A., Miller V. L.: *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001, 205, 159-164.
22. Robins-Browne R. M., Still C. S., Miliotis M. D., Koornhof H. J.: Mechanism of action of *Yersinia enterocolitica* enterotoxin. *Infect. Immun.* 1979, 25, 680-684.
23. Robins-Browne R. M., Takeda T., Fasano A., Bordun A., Dohi S., Kasuga H., Fong G., Prado V., Guerrant R. L., Morris Jr. J. G.: Assessment of enterotoxin production by *Yersinia enterocolitica* and identification of novel heat-stable enterotoxin produced by a noninvasive *Y. enterocolitica* strain isolated from clinical material. *Infect. Immun.* 1993, 61, 764-767.
24. Singh I., Viridi J. S.: Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of yst gene in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. *Med. Microbiol.* 2004, 53, 1065-1068.
25. Singh I., Viridi J. S.: Interaction of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains of diverse origin with cultured cells in vitro. *Jpn J. Infect. Dis.* 2005, 58, 31-33.
26. Tennat S. M., Grant T. H., Robins-Brown R. M.: Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 2003, 38, 127-137.
27. Thoerner P., Bin Kingombe C. I., Bögli-Stuber K., Bissing-Choisat B., Wassenaar T. M., 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, 1810-1816.
28. Wiśniewski J., Bielecki J.: Mechanizmy wirulencji bakterii z rodzaju *Yersinia*. *Post. Mikrobiol.* 1996, 35, 213-241.
29. Wren B. W.: The *Yersinia* – a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Natl Rev. Microbiol.* 2003, 1, 55-64.