

ИЗУЧЕНИЕ ЭНТЕРОТОКСИГЕННОСТИ *YERSINIA ENTEROCOLITICA* БИОТИПА 1А

Е.А. Богумильчик, Е.А. Воскресенская

ФГУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора,
Санкт-Петербург

Резюме. Представители *Y. enterocolitica* биотипа 1А, считающиеся непатогенными микроорганизмами, были изучены на наличие продукции термостабильного энтеротоксина YST B (Yersinia Stable Toxin), который обладает сильным токсичным эффектом и способен вызывать в организме человека и животных диарею. В данном исследовании хромосомный ген термостабильного энтеротоксина *ystB* был выявлен методом ПЦР у 87,1% из 116 изученных штаммов различного происхождения и территориального распространения. Для определения продукции токсина *in vitro* штаммы культивировали в различных условиях: при 26 и 37°C в обычной питательной среде и при 37°C в среде, состав которой соответствовал параметрам среды кишечника. На модели новорожденных мышей у части штаммов выявлена энтеротоксигенность как при 26°C, так и при 37°C. Изучение энтеротоксигенности представителей *Y. enterocolitica* биотипа 1А показало их возможную роль как этиологических агентов.

Ключевые слова: *Y. enterocolitica* биотип 1А, термостабильный энтеротоксин, ген *ystB*.

THE STUDY OF ENTEROTOXIGENICITY OF THE BIOTYPE 1A *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Bogumilchik E.A., Voskresenskaya E.A.

Abstract. The representatives of *Y. enterocolitica* biotype 1A which are considered as nonpathogenic microorganisms were tested for production of the thermostable enterotoxin YST B (Yersinia Stable Toxin). This toxin is characterized by strong toxic action and it can bring on diarrhea in human and animals. The chromosome gene of thermostable enterotoxin *ystB* was detected by PCR in 87.1% out of 116 studied strains of different origin and territorial isolation. To determine toxin production *in vitro* the studied strains cultivated in various conditions: in 26°C and 37°C in usual culture medium and in 37°C in the medium corresponded to the content of intestine. In part of the studied strains the toxin production was revealed on the model of newborn mice in both temperature regimes of cultivation 26°C and 37°C. The study of toxin production in representatives of *Y. enterocolitica* biotype 1A showed their possible role as etiological agents of diarrhea. (*Infekc. immun.*, 2011, vol. 1, N 3, p. 263–266)

Key words: *Y. enterocolitica* biotype 1A, thermostable enterotoxin, gene *ystB*.

Введение

Род *Yersinia* включает обширную группу грам-отрицательных факультативно анаэробных микроорганизмов, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*. Среди 16 видов, включенных в род *Yersinia*, только три отнесены к патогенным для человека и животных — возбудитель чумы *Y. pestis*, возбудитель псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis* и отдельные представители *Y. enterocolitica*, являющиеся возбудителями кишечного иерсиниоза.

Вид *Y. enterocolitica* широко распространен в природе. Представители вида присутствуют

в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) различных животных, в воде, почве, могут контаминировать сырые овощи, молоко и другие продукты, хранящиеся в условиях холодильника [3]. В соответствии с результатами биохимических реакций известно шесть биотипов *Y. enterocolitica*: 1А, 1В, 2, 3, 4, 5. Представители биотипов 1В, 2–5 являются патогенными, и содержат хромосомные и плазмидные гены, детерминирующие различные вирулентные свойства микроба (аггезивность, инвазивность, токсигенность и др.) [3, 12]. Представители биотипа 1А традиционно считаются непатогенными, не имеющими хромосомных и плазмидных генов вирулентности

поступила в редакцию 12.03.2011
принята к печати 14.04.2011

© Богумильчик Е.А.,
Воскресенская Е.А., 2011

Адрес для переписки:

Богумильчик Елена Александровна,
младший научный сотрудник лаборатории
бактериальных капельных инфекций
ФГУН НИИЭМ имени Пастера
Роспотребнадзора

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФГУН НИИЭМ имени Пастера
Роспотребнадзора.
Тел./факс: (812) 498-09-39 (служебн.).
E-mail: tsenevapasteur@yandex.ru

[3, 6]. Однако в последние годы появились данные о наличии внутри этого биотипа патогенных вариантов, способных вызывать заболевания ЖКТ, сопровождающиеся диареей [11].

Известно, что *Y. enterocolitica* продуцирует термостабильный энтеротоксин, известный как YST, который структурно и функционально гомологичен термостабильному энтеротоксину энтеротоксигенных *Escherichia coli*, и детерминирован хромосомальным геном *yst* [5]. Существует несколько подтипов YST, а именно YST A (ген *ystA*), характерный для патогенных представителей *Y. enterocolitica* (1B, 2–5 биотипы), YST B (ген *ystB*) и YST C (ген *ystC*). Группой ученых [9] был секвенирован ген *ystB*, а также изучен и охарактеризован сам термостабильный энтеротоксин YST B, его биологическая активность и дано сравнение с другими подтипами YST.

Исследования генома представителей *Y. enterocolitica* показали, что более 80% штаммов биотипа 1A имеют в составе хромосомы ген *ystB*, отсутствующий у других биотипов [6, 9, 12]. Этот факт подтверждают наши исследования (неопубликованные данные). Токсичный эффект YST B в несколько раз сильнее, чем у YST A [9], минимальная эффективная доза (Minimum Effective Dose, MED) очищенного YST B составляет 0,4 пМ, в то время как для YST A — 7,8 пМ. Продукция YST B *in vitro* происходит только при температуре ниже 30°C [3, 8, 9] и может быть определена на модели новорожденных мышей [4, 8]. По данным ряда авторов [6, 9, 10] продукция *ystB* обнаруживается у 40–80% штаммов *Y. enterocolitica*. Однако транскрипция генов *yst in vitro*, которая при использовании обычных питательных сред происходит только при температуре ниже 30°C, может быть индуцирована при температуре 37°C (температура тела человека) изменением физико-химических параметров среды — увеличением осмолярности и pH [7], что дает основания рассматривать энтеротоксин YST B как фактор вирулентности. Таким образом, штаммы *Y. enterocolitica* биотипа 1A, обладающие геном термостабильного энтеротоксина, могут являться потенциальными возбудителями кишечного иерсиниоза.

Цель настоящей работы — выявление хромосомного гена *ystB* и продукции термостабильного энтеротоксина YST B у штаммов *Y. enterocolitica* биотипа 1A.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовано 116 штаммов *Y. enterocolitica* биотипа 1A серотипов O:5; O:6,30; O:6,31; O:7,8; выделенных на ряде территорий РФ (Северо-Западный, Дальневосточный, Уральский и Сибирский федеральные округа) из различных источников: смывов с овощей и оборудования овощехрани-

лищ (61,2%), материала от грызунов (34,5%), от больных (2,6%), из окружающей среды (1,7%).

Выявление гена *ystB*. Все культуры *Y. enterocolitica* изучены на наличие гена *ystB* методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР). В качестве контроля использовали обладающий геном *ystB* охранный штамм *Y. enterocolitica* KM 205 Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». Для получения лизатов бактерии выращивали на агаре Хоттингера, готовили взвесь с концентрацией 10⁸ м.к./мл в стерильной дистиллированной воде, 100 мкл взвеси кипятили 5 мин, центрифугировали при 10 тыс. об/мин 1 мин, использовали надосадок. Применяли пары праймеров производства ООО «Синтол» (Москва) к участку гена *ystB* (Forward 5'-GTACATTAGGCCAAGAGACG-3' и Reverse 5'-GCAACATACCTCACAACACC-3') [12]. Реакционную смесь для проведения ПЦР готовили с использованием стандартных реагентов производства «Fermentas» согласно прилагаемой инструкции: 2,5 мкл 10x Taq буфера с (NH₄)₂SO₄, 2 мМ/мкл MgCl₂, 0,2 мМ/мкл каждого дНТФ, 0,4 мкМ/мкл прямого и обратного праймеров, 0,625 U Taq-ДНК-полимеразы, с добавлением 4 мкл исследуемого образца до конечного объема 25 мкл. ПЦР проводили в программируемом термостате ТП4-ПЦР-01-«Терцик» производства ЗАО «НПФ ДНК-Технология», используя программу: 1 цикл 95°C — 2 мин; 30 циклов 94°C — 45 с, 61°C — 45 с, 72°C — 45 с; 1 цикл 72°C — 10 мин. Для учета результатов ПЦР проводили электрофорез в 1,5% агарозном геле при постоянном напряжении 75 В в TBE буфере (0,9 М Tris, 0,9 М борная кислота, 20 мМ EDTA•Na₂) с окрашиванием этидий бромидом и последующим фотографированием в проходящем УФ-свете.

Условия инкубации штаммов для изучения продукции энтеротоксина YST B *in vitro*. Продукцию токсина оценивали при культивировании иерсиний в двух температурных режимах: (37±1)°C — температуре, при которой продукция токсина отсутствует (при использовании обычных питательных сред); (26±2)°C — температуре, оптимальной для продукции токсина [3, 9].

Для продукции токсина YST B *in vitro* при (26±2)°C иерсинии культивировали в триптонно-соевом бульоне TSB, Trypton Soya Broth (Oxoid, Англия), содержащим 0,6% дрожжевого экстракта (Отдел новых технологий НИИЭМ имени Пастера, Санкт-Петербург). Данный состав среды является оптимальным для продукции энтеротоксина бактериальной культурой *in vitro* [2].

Для продукции токсина YST B *in vitro* при (37±1)°C иерсинии культивировали в двух жидких питательных среды: 1) TSB, содержащий 0,6% дрожжевого экстракта; 2) бульон на основе сердечно-мозговой вытяжки ВНИ, Brain Heart Infusion (Oxoid, Англия), содержащий 5мМ CaCl₂, 0,1 М NaCl и 0,1 М морфолинопропансульфоновой

кислоты (MOPS), рН среды 7,5. Состав второй среды (рН, осмолярность) соответствовал параметрам среды кишечника и отвечал условиям, при которых могла наблюдаться экспрессия гена *ystB* при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ [7].

Культуры бактерий выращивали в 10 мл соответствующей жидкой питательной среды в колбе Эрленмейера объемом 250 мл в течение 48 ч при соответствующей температуре в условиях повышенной аэрации (на шейкере 250 об/мин) [4, 8].

После инкубации в указанных условиях культуральную жидкость центрифугировали при 16 000 об/мин 20 мин при 5°C и супернатант стерилизовали фильтрацией на мембране (0,22 μm , Jet Biofil, Канада–Китай). Фильтрат хранили при -30°C .

Определение активности энтеротоксина YST В. Для оценки активности энтеротоксина использовали новорожденных 4-х дневных мышей (ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН) [1, 4, 8]. Все образцы культуральной жидкости одного штамма (TSB, $(26\pm 2)^\circ\text{C}$; TSB, $(37\pm 1)^\circ\text{C}$; ВНИ, $(37\pm 1)^\circ\text{C}$) исследовали параллельно на мышах одной партии, используя для одного образца 14–16 животных. 100 мкл фильтрата исследуемой культуральной жидкости вводили иглой № 30 интрагастрально. Для оценки качества введения в инокулят предварительно вносили 0,01% красителя Evans Blue (Riedel-de-Haen, Германия). После введения препарата мышей помещали на 4 часа в термостат при 28°C , затем усыпляли хлороформом, вскрывали брюшную полость, извлекали кишечник, определяли вес кишечника и остального тела мыши.

При вскрытии визуально оценивали внешний вид органов брюшной полости, расширение кишечника. По отношению веса кишечника к весу тела мыши оценивали энтеротоксигенность штаммов. Значение ниже 0,075 соответствовало отсутствию выработки токсина, выше 0,090 — наличию выработки токсина, то есть исследуемая культура расценивалась как энтеротоксигенная [1, 4, 8].

В качестве отрицательного контроля опыта использовали стерильные TSB и ВНИ. В качестве положительного контроля использовали энтеротоксигенный референс-штамм *Y. enterocolitica* IP134 серотипа O:3, полученный из Национального референс-центра по иерсиниям (Институт Пастера, Париж).

При проведении эксперимента были соблюдены принципы гуманного отношения к животным в соответствии с Международными рекомендациями, а так же биоэтические нормы и требования Международного комитета по науке.

Результаты

При изучении 116 штаммов *Y. enterocolitica* биотипа 1А методом ПЦР со специфическими праймерами у 101 штамма (87,1%) был обнаружен хромосомный ген термостабильного энтеротоксина YST В (*ystB*). Из них для дальнейшего определения активности энтеротоксина YST В было отобрано 7 культур. Полученные данные представлены в табл. 1, 2.

Видно, что продукция термостабильного энтеротоксина YST В *in vitro* при температуре

ТАБЛИЦА 1. ЗНАЧЕНИЯ ОТНОШЕНИЯ ВЕСА КИШЕЧНИКА К ВЕСУ ТЕЛА МЫШИ В ОПЫТЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНТЕРОТОКСИГЕННОСТИ *Y. ENTEROCOLITICA* БИОТИПА 1А НА НОВОРОЖДЕННЫХ МЫШАХ

№ опыта	№ штамма в коллекции	Условия инкубации штаммов		
		TSB, $(26\pm 2)^\circ\text{C}$	ВНИ, $(37\pm 1)^\circ\text{C}$	TSB, $(26\pm 2)^\circ\text{C}$
1	1585	0,112 \pm 0,015	0,094 \pm 0,007	0,086 \pm 0,005
2	1382	0,075 \pm 0,006	0,086 \pm 0,007	0,079 \pm 0,011
3	1384	0,079 \pm 0,005	0,086 \pm 0,006	0,076 \pm 0,006
4	1421	0,108 \pm 0,009	0,082 \pm 0,008	0,078 \pm 0,008
5	1524	0,108 \pm 0,016	0,112 \pm 0,014	0,085 \pm 0,008
6	1405	0,077 \pm 0,005	0,078 \pm 0,005	0,075 \pm 0,007
7	1396	0,093 \pm 0,011	0,078 \pm 0,006	0,073 \pm 0,008

ТАБЛИЦА 2. ПРОДУКЦИЯ *IN VITRO* ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ЭНТЕРОТОКСИНА YST В У ШТАММОВ *Y. ENTEROCOLITICA* БИОТИПА 1А

№ штамма в коллекции	Источник выделения	Место выделения	Продукция YST В при $(26\pm 2)^\circ\text{C}$	Продукция YST В при $(37\pm 1)^\circ\text{C}$
1585	Материал от больного	Санкт-Петербург	+	+
1382	Материал от больного	г. Новосибирск	-	-
1384	Материал от больного	г. Новосибирск	-	-
1421	Смывы с овощей	г. Петрозаводск	+	-
1524	Смывы с овощей	г. Екатеринбург	+	+
1405	Смывы с овощей	г. Якутск	-	-
1396	Материал от серой крысы	г. Ленск	+	-

(26 ± 2)°C в среде TSB с дрожжевым экстрактом наблюдалась у четырех культур, в то время как при температуре (37 ± 1)°C в той же среде токсинопродукция отсутствовала у всех культур. Однако при инкубации в среде ВНИ (среда с повышенным содержанием питательных веществ, повышенной осмолярностью и pH 7,5) выработка энтеротоксина YST В при (37 ± 1)°C отмечена у двух культур. Три штамма из семи не продуцировали термостабильный энтеротоксин YST В *in vitro* при всех условиях инкубации.

Значения отрицательного контроля опыта составили $0,073\pm 0,003$ и $0,075\pm 0,003$ при использовании TSB и ВНИ, соответственно; положительного — $0,091\pm 0,012$ (TSB, (26 ± 2)°C).

Обсуждение

87,1% штаммов *Y. enterocolitica* биотипа 1А, циркулирующих в различных регионах РФ, содержат в составе хромосомы ген *ystB*, кодирующий термостабильный энтеротоксин YST В. Известно, что этот фактор вирулентности характеризуется достаточно сильным токсичным эффектом и способен вызывать в организме человека и животных диарею [11]. Однако считается, что продукция YST В не наблюдается при температуре тела человека и животных, и происходит лишь при температуре ниже 30°C [3, 8, 9].

В ходе настоящего исследования показана способность некоторых штаммов *Y. enterocolitica* биотипа 1А, обладающих геном *ystB*, продуцировать термостабильный энтеротоксин YST В не только в условиях окружающей среды (температура ниже 30°C), но и в условиях среды кишечника человека и животных (температура 37°C; pH 7,5). Были выявлены два штамма *Y. enterocolitica* биотипа 1А (1585, 1421), которые обладали энтеротоксигенными свойствами при инкубации как при температуре (26 ± 2)°C (TSB), так и при (37 ± 1)°C в среде, аналогичной условиям среды кишечника (ВНИ). Один из штаммов был выделен из клинического материала от больного со сниженным иммунитетом, второй — изолирован со смывов с овощей.

Полученные результаты свидетельствуют о гетерогенности штаммов *Y. enterocolitica* биотипа 1А по признаку патогенности и их потенциальной роли как этиологических агентов.

Благодарность

Настоящая работа выполнена в рамках гранта молодых ученых ФГУН НИИЭМ имени Пастера Роспотребнадзора в 2010 г.

Список литературы

1. Способ определения энтеротоксигенности кишечных палочек на мышах-сосунках: Метод. рекомендации. — Л.: НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 1980. — 11 с.
2. Amirmozafari N., Robertson D.C. Nutritional requirements for synthesis of heat-stable enterotoxin by *Yersinia enterocolitica* // *J. Appl. Environ. Microb.* — 1993. — Vol. 59, N 10. — P. 3314–3320.
3. Bottone E.J. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates // *J. Microb. Infect.* — 1999. — N 1. — P. 323–333.
4. Dean A.G., Ching Y.-C., Williams R.G., Harden L.B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in study of diarrhea in children in Honolulu // *J. Infect. Dis.* — 1972. — N 125. — P. 407–411.
5. Delor I., Cornelis G.R. Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits // *J. Infect. Immun.* — 1992. — Vol. 60, N 10. — P. 4269–4277.
6. Grant T., Bennett-Wood V., Robins-Browne R. Identification of virulence-associated characteristics in clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* lacking classical virulence markers // *J. Infect. Immun.* — 1998. — Vol. 66, N 3. — P. 1113–1120.
7. Mikulskis A.V., Delor I., Thi V.H., Cornelis G.R. Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin *yst* gene. Influence of growth phase, temperature, osmolarity, pH and bacterial host factors // *J. Mol. Microbiol.* — 1994. — N 14. — P. 905–915.
8. Pai C.H., Mors V. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica* // *J. Infect. Immun.* — 1978. — Vol. 19, N 3. — P. 908–911.
9. Ramamurthy T., Yoshino K., Huang X., Balakrish Nair G., 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* genes // *J. Microbiol. Pathog.* — 1997. — N 23. — P. 189–200.
10. Singh I., Viridi J.S. Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica* // *J. Med. Microb.* — 2004. — N 53. — P. 1065–1068.
11. Tennant S.M., Grant T.H., Robins-Browne R.M. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A // *FEMS Immun. Med. Microb.* — 2003. — N 38. — P. 127–137.
12. Thoerner P., Bin Kingombe C.I., Bögli-Stuber K., Bissig-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 // *J. Appl. Environ. Microb.* — 2003. — Vol. 69, N 3. — P. 1810–1816.