

Jerzy Gawel, Michał Bartoszcze, Beata Osiak

CHOROBOTWÓRCZOŚĆ I DIAGNOSTYKA *YERSINIA PESTIS*

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii – Puławy
Szef Ośrodka: Michał Bartoszcze

*Występujący u *Y. pestis* typ III sekrecji pozwala unieszkodliwiać komórki eukariotyczne na zasadzie przekazywania białek bakteryjnych przez błonę komórkową do cytozolu tych komórek. Białka te przejmując kontrolę nad komórkami gospodarza, zaburzają ich procesy wewnątrzkomórkowe. Do metod stosowanych w diagnostyce *Y. pestis* należą m. in.: techniki immunochromatograficzne, odczyn immunofluorescencji, hemaglutynacji, ELISA oraz test fagowy, a z metod genetycznych znajdują zastosowanie PCR, multiplex i nested PCR, real time PCR, VNTR, PFGE, ISBF, Microarray.*

*Słowa kluczowe: *Yersinia pestis*, dżuma, trzeci typ sekrecji, białka Yop, diagnostyka*
*Key words: *Yersinia pestis*, plague, TTS-Type III secretion, Yop proteins, diagnostics*

WSTĘP

Yersinia pestis jest czynnikiem biologicznym, który może być zastosowany w ataku bioterrorystycznym. Według CDC zalicza się do kategorii A. Użycie tego patogenu w formie aerozolu może wywołać u ludzi dżumę płucną o ciężkim przebiegu. *Yersinia pestis* może być również użyta do zakażenia gryzoni w celu spowodowania wtórnego wybuchu epidemii u ludzi. W przeszłości pałeczki *Y. pestis* były niejednokrotnie wykorzystywane jako broń biologiczna. Według raportu WHO z 1970 roku rozpylenie 50 kg komórek *Y. pestis* nad 5 milionowym miastem, może wywołać płucną postać dżumy u 150 tys. ludzi i spowodować śmierć 36 tysięcy mieszkańców. Podczas wirtualnego ćwiczenia TOPOFF (top officials of the United States government) obliczono, że uwolnienie *Y. pestis* drogą aerozolową nad centrum rozrywkowo-handlowym może wywołać ponad 3 mln przypadków dżumy płucnej (1).

CHARAKTERYSTYKA BAKTERII I ICH ZJADLIWOŚCI

Yersinia pestis jest Gram-ujemną, bezrzęskową, nie wytwarzającą przetrwalników pałeczką, będącą względnym beztlenowcem, o wielkości 1-3 x 0,5-0,8 μm . Bakterie rosną

w temperaturze 4-40°C (optymalna 28°C), przy pH od 7,2 do 7,6 (1,2). Pałeczki dżumy w zwłokach zwierząt przeżywają zimą ponad pół roku, latem około miesiąca, w odpadach organicznych miesiąc, a w wodzie do trzech tygodni. Giną natomiast w ciągu kilku godzin po ekspozycji na światło słoneczne. *Yersinia pestis* jest wrażliwa na 1% podchloryn sodu, 70% etanol, 2% glutaraldehyd, formaldehyd i preparaty jodowe (3). Badania nad *Y. pestis* powinno się przeprowadzać w laboratoriach BSL-3. Patogenne szczepy z rodzaju *Yersinia* posiadają trzy plazmidy: pPst (10 kb) – z genem *pla* kodującym aktywator plazminogenu (*plasminogen activator*), pFra (100 kb) – z genem *cafI* zawierającym informację dla antygeny otoczkowego (capsular antigen Fraction 1) i plazmid zjadliwości pYV (*Yersinia virulence* - 70 kb) – z regionem *lcr* regulującym ekspresję białek błony zewnętrznej Yop (*Yersinia outer proteins*), decydujących o możliwości wniknięcia drobnoustroju do komórek organizmu, ich przetrwania i namnażania się. Do polipeptydów kodowanych w plazmidzie zjadliwości należą wcześniej znane jako antygeny białkowe V i W – determinanty zjadliwości. Przeciwciała anti-V pełnią rolę ochronną w zakażeniach pałeczkami *Yersinia*, natomiast przeciwciała anti-W nie wykazują takiego działania (2,4).

PATOGENEZA – WYBRANE ASPEKTY

Dżuma jest chorobą odzwierzęcą. Rezerwuarem zarazka są szczury, popielice, wiewiórki ziemne, dzikie króliki, nornice, myszy, susły, pieski stepowe. Do zakażenia ludzi dochodzi w wyniku ukąszenia przez pchły: *Xenopsylla cheopis* (pchła szczurza), *Pulex irritans* (pchła ludzka), lub w wyniku kontaktu z zakażonymi tkankami i płynami zwierząt. Choroba przenosi się z człowieka na człowieka drogą kropelkową, charakteryzując się wysoką zaraźliwością (1,2,3). Przechorowanie dżumy nie zapewnia nabycia trwałej odporności. Jest ona objęta międzynarodowymi przepisami zdrowotnymi i podlega obowiązkowi zgłaszania i rejestracji do WHO (3).

Po wniknięciu do organizmu część bakterii jest niszczona przez neutrofile obecne we krwi, a nieliczne są fagocytowane przez makrofagi. Pozostałe bakterie szybko namnażają się, czemu towarzyszy ekspresja czynników wirulencji. Po 2-6 dniach od zakażenia drobnoustroje niszczą makrofagi i dostają się do krwiobiegu, co objawia się gorączką, bólami głowy i ogólnym osłabieniem. Bakterie intensywnie namnażają się w węzłach chłonnych, które ulegają powiększeniu, są gorące i bolesne. Stąd ponownie dostają się do krwiobiegu, powodując m. in. ciężkie zapalenie płuc. Przy braku leczenia śmiertelność może dochodzić do 50%. *Y. pestis* posiada mechanizmy pozwalające na wychwytywanie z organizmu gospodarza żelaza, niezbędnego do jej przetrwania, w czym biorą udział siderofory – małe, niebiałkowe cząsteczki, produkowane i wydzielane przez bakterie. Pałeczki *Y. pestis* mogą posiadać również inne systemy pozyskiwania nieorganicznego żelaza oraz wykorzystania hemu i jego związków (2).

Typ III sekrecji (*TTS-Type III secretion*) jest mechanizmem pozwalającym bakteriom przejmować kontrolę nad komórkami gospodarza, zaburzając ich procesy wewnątrzkomórkowe. Temperatura 37°C, przy obniżonym poziomie Ca²⁺ hamuje wzrost *Y. pestis* i przyczynia się do sekrecji białek związanych z wirulencją (2,5,6). Aktywacja III typu sekrecji wymaga bezpośredniego kontaktu bakterii z komórką eukariotyczną. Prawdopodobnie białko YscF, powiązane strukturalnie z „igłą” aparatu sekrecyjnego bierze udział w przemieszczaniu wirulentnych białek przez błonę komórki eukariotycznej oraz w regu-

lacji III typu sekrecji zależnego od wapnia (6). Kodowany przez plazmidy Ysc-Yop TTS system pozwala pałeczkom dżumy dostarczać białka Yop do cytozolu komórek systemu odpornościowego, blokując fagocytozę i osłabiając produkcję prozapalnych cytokin i chemokin, co sprzyja namnażaniu się pałeczek dżumy w tkance limfatycznej. Ysc-Yop TTS składa się z aparatu Ysc (*Yop secretion apparatus*) oraz z białek Yop (*Yersinia outer proteins*). Trzy z nich – YopB, YopD i LcrV przenoszą efekторы Yop przez błonę komórkową. Poznano do tej pory 6 efektorów Yop: YopH, YopE, YopT, YpkA/YopO, YopP i YopM, z których cztery tj.: YopH, YopE, YopT oraz YpkA/YopO osłabiają fagocytozę. YopE, YopT oraz YpkA/YopO działają na monomeryczną GTPazę, a YopH jest – fosfatazą tyrozyny. Oprócz działania antyfagocytarne YopH hamuje także proliferację limfocytów i syntezę białka – MCP1 (*monocyte chemotactic protein 1*). YopP zaburza odpowiedź zapalną makrofagów. Rola szóstego efektora nie została do końca poznana. Ysc-Yop TTS system tworzy strukturę przypominającą igłę wystającą na zewnątrz bakterii. Zawiera ona duży cylinder i pierścień błonowy, a wewnętrzna część ciała podstawowego posiada pompę białkową, której istotną częścią jest YscN będąca ATP-azą. Przenoszenie efektorów Yops przez błony komórek eukariotycznych odbywa się dzięki translokatorom Yops (YopB, YopD i LcrV). Prawdopodobnie YopB, YopD i LcrV destabilizują błonę komórkową, dzięki czemu pierwsze efekторы Yops są przekazywane przez uformowany kanał łączący bakterie z cytozolem komórki docelowej. Cztery efekторы spośród sześciu do tej pory zidentyfikowanych (YopH, YopE, YopT i YpkA/YopO) – wywierają negatywny efekt na dynamikę cytoszkieletu. YopE wywołuje depolimeryzację filamentów aktynowych w komórce gospodarza, hamując fagocytozę i wywołując efekt cytotoksyczny. YpkA i YopH (*Yersinia protein kinase*) zaburzają sygnał transdukcji, wpływając na aktywację i dezaktywację wielu czynników regulacyjnych w komórkach eukariotycznych. YopH zakłóca również ogólną adhezję. Trzy inne efekторы Yop, które hamują fagocytozę tj.: YopE, YopT i YpkA/YopO wpływają na monomeryczne GTPazy, oscylujące pomiędzy ich formami „włączonymi i wyłączonymi”, co wiąże się z przyłączaniem nukleotydów, w czym biorą udział białka – GAPs (*GTPase-activating proteins*) i czynniki – GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*). Yop E działa na GAP poprzez hydrolizę GTP, YopP wykazuje silne działanie depolimeryzujące na aktywne, a YopT inaktywuje GTPazy przez ich odłączanie od „kotwic błonowych”. Dwa efekторы YopP (YopJ u *Y. pseudotuberculosis* i *Y. pestis*) i YopH przeciwdziałają reakcji zapalnej zakażonych komórek. Yop P/J redukuje uwalnianie czynnika – TNF (*tumor necrosis factor*) przez makrofagi i interleukiny (*interleukin-8, IL-8*) przez komórki epithelialne i endothelialne (5).

DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA

Do badań pobiera się: krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, płwocinę, biopaty z węzłów chłonnych, śledziony, wątroby, płuc, zeszkrobiny z uszkodzonej skóry, miazgę zębową (2).
D i a g n o s t y k a b a k t e r i o l o g i c z n a

W preparatach mikroskopowych barwionych metodą Grama widoczne są Gram (-) pałeczki, układające się pojedynczo, w pary lub krótkie łańcuszki. Metodą Wrighta-Giemzy lub Waysona barwią się dwubiegunowo. Próbki posiewa się na podłoża: Mc Conkeya, agar z krwią – SBA, wyciąg mózgowo sercowy – BHI lub agar cozynowo metylenowy – EMB. *Y. pestis* nie wywołuje hemolizy, wzrasta w czasie od 48 do 72 godz. inkubacji, a po

24 godzinach przy obecności 5% CO₂. Po trzech dniach kolonie przybierają charakterystyczny wygląd „szonego jajka”. Biotyp Orientalny nie wykazuje zdolności fermentacji glicerolu; zaś biotyp Średniowieczny nie redukuje azotanów, a szczepy biotypu Antycznego rozkładają glicerol i redukują azotany (2,4,7). W diagnostyce dżumy stosuje się m.in. test immunofluorescencji (2), hemaglutynacji (1,2), ELISA (2,8,9) oraz immunochromatografię (8). W serodiagnostyce zakażeń *Yersinia pestis* metodą cytometrii przepływowej wykorzystano kulki paramagnetyczne opłaszczone antygenem F1 oraz przeciwciała znakowane fluoresceiną. Metodą tą wykryto przeciwciała dla F1 u wszystkich pacjentów z dżumą i u 84,6% osób szczepionych (10). Lityczny test fagowy (bakteriofag A 1122) jest zalecany przez CDC do potwierdzenia obecności *Yersinia pestis* (2,11).

D i a g n o s t y k a g e n e t y c z n a

W identyfikacji genetycznej *Yersinia pestis* stosuje się metodę PCR wykrywając sekwencje docelowe, obecne zarówno w chromosomie, jak i w plazmidach. W chromosomie *Y. pestis* zlokalizowany jest region o wielkości 41,7 kb (amplikon o wielkości 276 bp (12)). Wykrywa się również sekwencje obecne w genach plazmidowych: antygen otoczkowy (F1 capsular antigen) o wielkości 243 bp, aktywator plazminogenu (*plasminogen activator*) – wielkości produktu 478 bp, V antygen – o wielkości produktu amplifikacji 524 bp. Wykonuje się reakcję PCR z primerami amplifikującymi fragment chromosomalnego genu 16S rRNA (13). W technice nested-PCR stosuje się dwie pary primerów: zewnętrzne – YP1 i YP2 (928 bp) oraz wewnętrzne YP1a i YP2a, amplifikujące fragment wielkości 458 bp. Metoda okazała się zarówno swoista jak i czuła, pozwalając na odróżnienie *Y. pestis* od *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* (14). Stosowany jest również multiplex PCR z użyciem wielu par primerów, które amplifikują sekwencje w genach: *cafI* (plazmid pFra) – wielkość produktu 506 bp, *pla* (plazmid pPst) – wielkość produktu 920 bp, *lcrV* (plazmid pYV) – wielkość produktu 800 bp oraz chromosomalny gen *irp2*– 300 bp (15). Można wykorzystać primery amplifikujące inne fragmenty genów jak np.: *caf I*– wielkość produktu amplifikacji 171 bp, *pla*– 480 bp, *yopM* –565 bp oraz *inv* –295 bp. W technice real-time PCR stosuje się primery amplifikujące sekwencję w genie *pla*. Reakcja jest w 100% swoista dla *Yersinia pestis*, a czułość jej wynosi 10² CFU/ml. W metodzie real-time PCR stosuje się odpowiednie primery oraz sondę znakowaną karboksylfluoresceiną (16). *Yersinia pestis* posiada gen pestycyny, ulokowany w plazmidzie pPCP (9,6 kb). Przy użyciu sondy Taq Man możliwe jest wykrycie około trzech kopii fragmentu DNA. Sonda jest wysoce specyficzna przy identyfikacji pestycynogennych szczepów *Y. pestis* (17). Dla poznania różnorodności genetycznej szczepów *Yersinia pestis* stosuje się metody VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) oraz analizę makrorestrykcyjną z PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*). Metodą VNTR można podzielić pałeczki dżumy na różniące się między sobą grupy (18,19). Na podstawie porównania wzorów restrykcyjnych, metodą PFGE można określać różnice pomiędzy poszczególnymi szczepami *Yersinia pestis*, co jest ważne w dochodzeniu epidemiologicznym (20). *Insertion-Sequence-Based-Fingerprinting* (ISBF) – oparta na sekwencjach insercyjnych jest metodą, w której amplifikuje się fragment DNA znajdujący się pomiędzy końcem IS a sąsiadującym genem, dzięki czemu powstawać mogą zamplifikowane fragmenty o różnej wielkości, dając odmienne wzory (21). W identyfikacji *Yersinia pestis* zastosowano również metodę mikromacierzy DNA, która pozwala na uzyskanie dużej liczby informacji na temat ekspresji genów, mutacji, polimorfizmu, stopnia pokrewieństwa itp. (22). Do szyb-

kiej diagnostyki pałeczek dżumy stosuje się immunochromatograficzny test SMART, który może być wykorzystany w warunkach polowych.

WRAŻLIWOŚĆ NA ANTYBIOTYKI

Y. pestis jest wrażliwa na większość antybiotyków aktywnych przeciwko bakteriom Gram-ujemnym. Szczepy lekooporne *Y. pestis* występują bardzo rzadko (2). W 1995 roku na Madagaskarze wyizolowano u 16 letniego chłopca szczep oporny na ampicylinę, chloramfenikol, kanamycynę, streptomycynę, sulfonamidy i tetracyklinę (23). Osoby z bezpośredniego kontaktu z chorymi na dżumę płucną poddaje się leczeniu antybiotykami i 6-dniowemu nadzorowi zdrowotnemu (3).

SZCZEPIENIA OCHRONNE

Do niedawna dostępne były na rynku dwie grupy szczepionek zawierające szczepy zabite lub atenuowane. Pierwsza z nich była skuteczna w dymienicznej postaci dżumy, nie dając jednak odporności przy płucnej postaci choroby (1,2,24). Druga szczepionka dawała odporność jedynie na około pół roku (2,3). Obecnie brak jest na rynku licencjonowanych szczepionek przeciwko dżumie (25). Prawdopodobnie żywa – atenuowana szczepionka ze szczepu EV, linii NIIEG jest nadal wytwarzana na terenach byłego Związku Radzieckiego. Dotyczy to także amerykańskiej szczepionki zabitej ze szczepu 195/P, wytwarzanej w Australii. W opracowaniu jest szczepionka zawierająca antygeny F1 i V. Jak wynika z prowadzonych w Wielkiej Brytanii badań na modelach zwierzęcych, szczepionki zawierające składniki F1 i V dają znacznie lepszy efekt ochronny niż szczepionki złożone z oddzielnych składników. Szczepionka ta jest skuteczna zarówno przeciwko formie węzłowej jak i płucnej (1,2,24). W USA przeprowadzane są również badania nad wykorzystaniem jako szczepionki białka YscF (25).

J Gawel, M Bartoszcze, B Osiak

YERSINIA PESTIS PATHOGENESIS AND DIAGNOSTICS

SUMMARY

Plague is an acute bacterial infection caused by Gram negative organism *Yersinia pestis*. This bacteria is subdivided into three classical biotypes: Orientalis, Medievalis and Antiqua. Plague is transmitted via flea vectors from rodents to humans and by respiratory droplets from animals to humans or humans to humans. This agent is on the top of the CDC list of „Critical Biological Agents” – category A. It appears to be a good candidate agent for a bioterrorist attack. Type III secretion (TTS) is a mechanism by which *Y. pestis* communicates with eukaryotic cells by injecting bacterial proteins across cellular membranes into the cytosol of these cells. These bacterial proteins take control of the host cells by hijacking their intracellular machinery. A laboratory diagnostics of plague is based on: staining techniques, culture on media, immunochromatography, hemagglutination, immunofluorescence, ELISA, phage tests and genetical techniques including: PCR, multiplex and nested PCR, real time PCR, VNTR, PFGE, ISBF and Microarray.

PIŚMIENNCTWO

1. Bossi P, Tegnell A, Baka A, i in. Bichat guidelines for the clinical management of plague and bioterrorism-related plague. *Eurosurveillance* 2004;9,(12):1-6.
2. Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis* – Etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* 1997;10,(1):35-66.
3. Seroka D. Dżuma. Warszawa: PZWL;2001:107-114. W: Magdzik W, Naruszewicz-Lesiuk D, red. Zakażenia i zarażenia człowieka.
4. Rodzaj *Yersinia*. W: Zaremba ML, Borowski J. *Mikrobiologia lekarska*. Warszawa: Wyd. Lek. PZWL 1997:198-207.
5. Cornelis GR. The *Yersinia* YSC-YOP Type III Weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biology* 2002;3:742-751.
6. Torruellas J, Jackson MW, Pennock JW, i in. The *Yersinia pestis* type III secretion needle plays a role in the regulation of Yop secretion. *Mol Microbiol* 2005;57(6):1719-1733.
7. Achtman M, Morelli G, Zhu P. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *PNAS* 2004;101(51):17837-17842.
8. Chanteau S, Rahalison L, Ratsitorahina M. Early diagnosis of bubonic plague using F1 antigen capture ELISA assay and rapid immunogold dipstick. *J Med Microbiol* 2000;290(3):279-283.
9. Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, i in. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet* 2003;361(9353):211-216.
10. Spletstoeser WD, Grunow R, Rahalison L, i in. Serodiagnosis of human plague by a combination of immunomagnetic separation and flow cytometry. *Cytometry Appl* 2003;53(2):88-96.
11. Garcia E, Elliott JM, Ramanculov E, i in. The genome sequence of *Yersinia pestis* bacteriophage A 1122 reveals an intimate history with the coliphage T 3 and T 7 genomes. *J Bact* 2003;185(17):5248-5262.
12. Radnedge L, Gamez-Chin S, Mc Cready PM, i in. Identification of nucleotide sequences for the specific and rapid detection of *Yersinia pestis*. *Appl and Environ Microbiol* 2001;67(8):3759-3762.
13. Neubauer H, Meyer H, Prior J, i in. A combination of different polymerase chain reaction (PCR) assays for the presumptive identification of *Yersinia pestis*. *J Vet B Dis Vet Public Health* 2000;47(8):573-580.
14. Campbell J, Lowe J, Walz S, i in. Rapid and specific identification of *Yersinia pestis* by using a Nested Polymerase Chain Reaction Procedure. *J Clin Microbiol* 1993;31(3):758-759.
15. Leal NC, Almeida AMP. Diagnosis of plague and identification of virulence markers in *Yersinia pestis* by Multiplex-PCR. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1999;41(6):339-342.
16. Loiez C, Herwegh S, Wallet F, i in. Detection of *Yersinia pestis* in sputum by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41(10):4873-4875.
17. Iqbal SS, Chambers JP, Goode MT, i in. Detection of *Yersinia pestis* by pesticin fluorogenic probe-coupled PCR. *Mol Cell Probes* 2000;14(2):109-114.
18. Adair DM, Worsham PL, Hill KK, i in. Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat from *Yersinia pestis*. *J Clin Microbiol* 2000;38(4):1516-1519.
19. Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, i in. Identification and characterization of Variable-Number Tandem Repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J Clin Microbiol* 2001;39(9):3179-3185.
20. Lucier TS, Brubaker RR. Determination of genome size, macrorestriction pattern polymorphism, and nonpigmentation-specific deletion in *Yersinia pestis* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Bact* 1992;174(7):2078-2086.
21. Motin VL, Georgescu AM, Elliott JM, i in. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS 100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*). *J Bact* 2002;184(4):1019-1027.

22. Zhou D, Han Y, Song Y, i in. DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation. *J Bact* 2004;186(15):5138-5146.
23. Galimand M, Guiyoule A, Gerbaud G, i in. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *New Engl J Med* 1997;337(10):677-681
24. Hill J, Leary SEC, Griffin KF, i in. Regions of *Yersinia pestis* V antigen that contribute to protection against plague identified by passive and active immunization. *Infect and Immunity* 1997;65(11):4476-4482.
25. Swietnicki W, Powell BS, Goodin J. *Yersinia pestis* Yop secretion protein F: Purification, characterization, and protective efficacy against bubonic plague. *Protein Expression & Purification* 2005;42:166-172.

Otrzymano: 27.12.2005 r.

Adres autorów:

Jerzy Gawel
Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych
Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii
ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy
tel. (081) 883 98 09, fax (081) 886 28 22
e-mail: gaw3@wp.pl