

Izabela Czyżewska, Antoni J. Furowicz

**ZJADLIWOŚĆ SZCZEPÓW *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*
WYIZOLOWANYCH ZE ŚRODOWISKA ZEWNĘTRZNEGO,
W KONTEKŚCIE ZAGROŻENIA DLA CZŁOWIEKA**

Katedra Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Biotechnologii
i Hodowli Zwierząt Akademii Rolniczej w Szczecinie
Kierownik Katedry: Antoni J. Furowicz

*Stosując test PCR przeprowadzono badania, mające na celu identyfikację szczepów *Yersinia pseudotuberculosis* w 167 próbkach wody i 32 próbkach gleby, pobranych na terenie województwa zachodniopomorskiego. Stwierdzono obecność DNA swoistego dla szczepów *Y pseudotuberculosis* w sześciu próbkach wody i w jednej próbce gleby. Identyfikacji szczepów dokonano przy pomocy sekwencji nukleotydowych, specyficznych wyłącznie dla wymienionego gatunku, zlokalizowanych w genie *ypm*. Wykazano również występowanie genów, odpowiedzialnych za patogenność szczepów *Yersinia*.*

*Ze względu na dużą swoistość, czułość i krótki czas badania, metoda PCR powinna mieć zastosowanie w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej szczepów *Y. pseudotuberculosis*.*

*Słowa kluczowe: *Yersinia pseudotuberculosis*, PCR, geny *inv*, *ail*, *yadA*, *elt*, woda, gleba*
*Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, PCR, genes *inv*, *ail*, *yadA*, *elt*, water, soil*

WSTĘP

Yersinia pseudotuberculosis wywołuje zachorowania na jersiniozę u wielu gatunków ssaków i ptaków. Drobnoustrój ten, szeroko rozpowszechniony na terenach o klimacie umiarkowanym i podzwrotnikowym, ma duże możliwości przystosowawcze do warunków środowiska zewnętrznego dla organizmu gospodarza (1). Może przeżywać przez dłuższy okres zarówno w wodach stojących, bogatych w związki organiczne, jak również w wodzie morskiej o wysokiej zawartości soli (3,3-3,7%) i niskiej koncentracji składników odżywczych, często bliskiej lub poniżej progu wymaganego przez bakterie. Odnotowano również przypadki występowania *Y pseudotuberculosis* w glebie, a także na roślinach (2, 3). Grupą zwierząt, u których najczęściej dochodzi do zachorowań na jersiniozę lub bezobjawowego nosicielstwa są gryzonie, a wśród nich gatunki dziko żyjące, hodowlane oraz laboratoryjne. Dziko żyjące gryzonie - często bezobjawowi nosiciele zarazka kontaminują środowisko zewnętrzne przez kał. Rezerwuar pozazwie-

rzęcy może być źródłem zakażenia paszy spożywanej przez zwierzęta, które czasem są przyczyną infekcji człowieka.

Do zakażenia ludzi pałeczkami *Yersinia* dochodzi drogą pokarmową - po wypiciu wody oraz spożyciu produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego.

Chorobotwórczość *Y. pseudotuberculosis* uwarunkowana jest posiadaniem kompleksu czynników, determinowanych przez geny chromosomalne i plazmidowe tej bakterii. Proces adherencji i kolonizacji komórek bakteryjnych w przewodzie pokarmowym organizmu zakażonego pałeczkami z rodzaju *Yersinia* stanowi pierwszy etap zakażenia. Za procesy toksyczne (widoczne objawy kliniczne) odpowiedzialne są toksyny (endotoksyna, enterotoksyna LT), za inwazję natomiast - inwazyiny (Inv, YadA) oraz powierzchniowe białko o charakterze inwazyiny (17 kDa). Za syntezę białka YadA o charakterze adhezyny-inwazyiny odpowiedzialny jest gen *yadA* (4, 5). Wytwarzanie enterotoksyny LT determinowane jest przez gen *elt*. Obydwa geny zlokalizowane są w plazmidzie wirulencji pYV o wielkości 45 kDa. Chromosomalny gen *inv* *Y. pseudotuberculosis* koduje białko inwazyinę Inv, zaś gen *ail* - powierzchniowe białko o charakterze inwazyiny (1, 6).

Do testów wykorzystywanych w diagnostyce zakażeń, wywołanych przez wymieniony gatunek należą: reakcja odwróconej biernej aglutynacji lateksowej (określenie enterotoksyczności), zdolność do autoaglutynacji (AA), wapniozależny wzrost (CAD), próba na pyrazynamidazę (PYZ), hydrofobowość (SALTING-OUT TEST) oraz próba na wytwarzanie ureazy (7, 8).

Obecnie szerokie zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej mają nowoczesne metody biologii molekularnej, które opierają się na analizie DNA chromosomalnego i plazmidowego (9, 10). Należy do nich m. in. test PCR (*Polymerase Chain Reaction*), umożliwiający identyfikację genów na poziomie DNA chromosomalnego i plazmidowego bakterii, odpowiedzialnych za ich wirulencję, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), za pomocą którego przeprowadza się analizę specyficznych polimorfizmów długości fragmentów restrykcyjnych, łączenie obu technik (PCR - RFLP) ponadto metoda FP - PCR (*Fingerprinting* - PCR), pozwalająca na ustalenie pokrewieństwa między szczepami bakteryjnymi, ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - PCR), służący do amplifikacji konserwatywnych sekwencji nukleotydowych genomu bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* (11, 12, 13, 14). Testy te charakteryzują się dużą czułością (Gradil i in. wykryli w nasieniu buhaja drobnoustroje w ilości ok. 10 - 20 komórek na 1 ml badanego materiału, co stanowi zaledwie 1 pg materiału genetycznego bakterii), oszczędnością czasu (wystarczy ok. 6-7 godz., aby uzyskać wynik badania) oraz powtarzalnością wyników. Są one szczególnie przydatne, gdy identyfikacja drobnoustrojów chorobotwórczych w materiale badanym przy pomocy metod klasycznych sprawia trudności (10, 15).

Celem badań była identyfikacja szczepów *Y. pseudotuberculosis* w środowisku pozazwierzęcym (woda, gleba) oraz ich analiza genotypowa, pozwalająca na stwierdzenie obecności markerów zjadliwości, występujących w DNA chromosomalnym i plazmidowym, odpowiedzialnych za patogenność wyżej wymienionego gatunku.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 167 próbek wody i 32 próbki gleby. Próbkę wody oraz gleby pobrano z różnych miejsc (rzeki, jeziora, stawy, wody ściekowe) na terenie województwa zachodniopomorskiego, w których istniało podejrzenie występowania szczepów z rodzaju *Yersinia*, związane z obecnością w tych miejscach dużej liczby gryzoni (myszy, szczury), będących głównym nosicielem *Y pseudotuberculosis*.

DNA pałeczek *Y. pseudotuberculosis* w badanym materiale wykrywano posługując się testem PCR, stosując primery umożliwiające wykrycie konserwatywnych sekwencji nukleotydowych, zlokalizowanych w genie *ypm*, specyficznych wyłącznie dla wyżej wymienionego gatunku.

Izolację genomowego i plazmidowego DNA przeprowadzono wykorzystując zestaw firmy A&A Biotechnology. Przed przystąpieniem do izolacji badany materiał rozcieńczano w bulionie TSB (Tryptic Soy Broth) w ilości: 1 ml wody na 9 ml bulionu TSB oraz 1 g gleby na 9 ml TSB, a następnie inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 25°C, w celu namnożenia poszukiwanych w badanym materiale szczepów *Y pseudotuberculosis*.

Do izolacji genomowego DNA użyto 1 ml hodowli bakteryjnej, którą odwirowano, supernatant usuwano, a osad zawieszano w 100 µl roztworu RE. Następnie dodawano 200 µl uniwersalnego buforu lizującego LT oraz 20 µl proteiny K. Całość po wymieszaniu inkubowano 20 minut w temperaturze 37°C, a następnie 5 minut w temperaturze 75°C. Po inkubacji próbki intensywnie worteksowano 20 sekund, następnie wirowano 3 minuty przy 10 - 12 tys. RPM. Uzyskany w ten sposób supernatant przenoszono na minikolumnę do oczyszczania genomowego DNA i wirowano 1 minutę przy 12 tys. RPM. Do kolumny dodawano następnie 500 µl roztworu płuczającego A1. Po odwirowaniu przez 1 minutę przy 12 tys. RPM, minikolumnę przenoszono do nowej probówki wirówkowej. Do kolumny dodano 300 µl roztworu płuczającego A1; probówkę wirowano 2 minuty przy 12 tys. RPM. Minikolumnę umieszczano w nowej probówce i do złoża krzemionkowego znajdującego się na dnie kolumny dodawano 200 µl roztworu elucyjnego, uprzednio ogrzanego do temperatury 75°C. Probkę inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej, po czym wirowano 1 minutę przy 12 tys. RPM. Po odwirowaniu minikolumnę usuwano, a oczyszczone DNA, znajdujące się na dnie probówki, użyto do dalszych analiz.

W izolacji plazmidowego DNA używano - podobnie jak w izolacji DNA genomowego - 1 ml 24-godzinnej hodowli bakteryjnej, którą odwirowano, supernatant usuwano, a osad umieszczano w probówce wirówkowej i zawieszano przez worteksowanie w 200 µl roztworu LI. Do probówki dodawano następnie 200 µl alkalicznego roztworu lizującego L2 i po wymieszaniu przez kilkakrotne odwracanie probówki, całość pozostawiano na 3 minuty w temperaturze pokojowej. Po inkubacji do probówki dodawano 400 µl roztworu zobojętniającego GL3, zawartość mieszano przez kilkakrotne odwracanie probówki i wirowano 5 minut przy 12 tys. RPM. Supernatant przelewano do minikolumny w celu oczyszczania plazmidowego DNA i wirowano 1 minutę przy 12 tys. RPM. Po wylaniu przesączu, do minikolumny dodawano 500 µl pierwszego roztworu płuczającego W i wirowano 1 minutę przy 12 tys. RPM. Przesącz ponownie wylewano z probówki, a do kolumny dodawano 700 µl drugiego roztworu płuczającego A1. Całość wirowano 2 minuty przy 12 tys. RPM. Następnie kolumnę umieszczano w nowej

próbówce i do złoza krzemionkowego, znajdującego się na dnie kolumny dodawano 60 μl roztworu TE. Zawartość inkubowano 3 minuty w temperaturze pokojowej, po czym wirowano 1 minutę przy 12 tys. RPM. Po odwirowaniu kolumnę usuwano, a oczyszczone DNA, znajdujące się na dnie próbówki wykorzystywano do dalszych analiz.

Proces amplifikacji przeprowadzono przy użyciu termocyklera firmy Eppendorf. Sporządzono mieszaninę reakcyjną o obj. 25 μl . W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły odczynniki: woda redestylowana (14,8 μl), nukleotydy (2,5 μl), bufor (2,5 μl), chlorek magnezu (1 μl), starter 1 i 2 (po 1 μl), Taq DNA polimeraza rekombinowana - 5u \cdot μl^{-1} (0,2 μl), matryca DNA (2 μl). Do reakcji użyto primerów, przygotowanych przez firmę „DNA - GDAŃSK”. Dla *yadA* temperatura denaturacji wynosiła: 94°C przez 120 s, wiązania starterów - 62°C przez 60 s, wydłużania - 72°C przez 60 s. Warunki reakcji dla *inv* i *ail* różniły się temperaturą wiązania starterów, która wynosiła 56°C przez 60 s a dla *elt* - 53°C.

Elektroforetyczny rozdział DNA przeprowadzono w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydyny w ilości 0,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$, z wykorzystaniem buforu TBE (Tris, kwas borny, EDTA; pH=8) firmy BIO-RAD. Mieszaninę reakcyjną w ilości 10 μl zmieszano z 3 μl buforu obciążającego (błękit bromofenyłowy, ksylen cyjanolu, glicerol, EDTA) firmy Fermentas.

WYNIKI

Stosując test PCR, w badaniu sześciu próbek wody i jednej próbki gleby zidentyfikowano fragment DNA chromosomalnego (będący genem *ypm* o wielkości 200 pz), specyficzny wyłącznie dla gatunku *Y. pseudotuberculosis*, potwierdzający obecność w tych próbkach szczepów *Yersinia*, należących do wyżej wymienionego gatunku.

Dalsza analiza genotypowa pozwoliła na stwierdzenie obecności u wszystkich szczepów *Y. pseudotuberculosis* fragmentu DNA chromosomalnego o wielkości 390 pz, będącego genem *inv*, odpowiedzialnego za syntezę inwazyjny Inv (tab. I, ryc. 1). U 1 szczepu *Y. pseudotuberculosis* zidentyfikowano fragment DNA chromosomalnego o wielkości 274 pz, będący genem *ail*, determinujący syntezę powierzchniowego białka o charakterze inwazyjny (tab. I, ryc. 1). Trzy szczepy *Y. pseudotuberculosis* posiadały fragment DNA plazmidowego o wielkości 490 pz, warunkujący syntezę adhezyny-inwazyjny *YadA*, będący genem *yadA*. U żadnego szczepu nie wykryto fragmentu DNA plazmidowego o wielkości 444 pz, będącego genem *elt*, odpowiedzialnego za wytwarzanie enterotoksyny LT (tab. I).

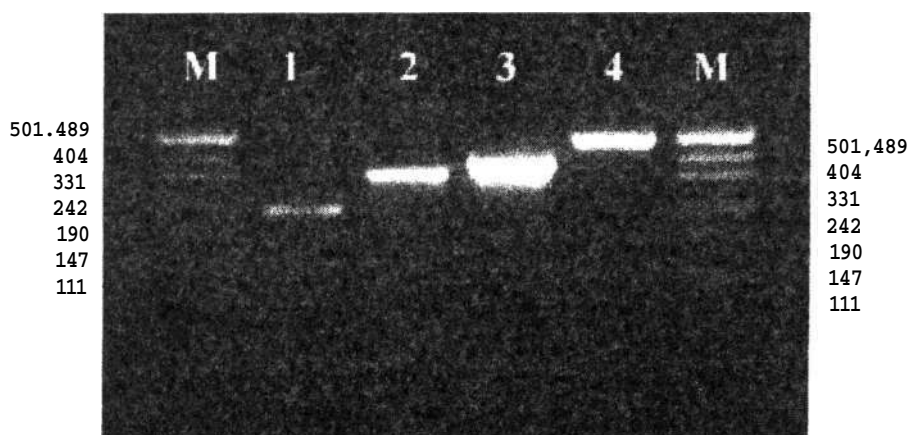
DYSKUSJA

Wykazanie obecności genu *ypm* w 7 badanych próbkach wskazuje na występowanie w nich szczepów należących do gatunku *Y. pseudotuberculosis* (tab. I, ryc. 1). Rezultaty analizy genotypowej wskazują natomiast na chorobotwórczość zidentyfikowanych szczepów *Yersinia*. Obecność genów *inv*, *ail* oraz *yadA* świadczy o ich wirulencji a tym samym właściwościach adhezyjnych, kolonizacyjnych i inwazyjnych w jelicie ssaka oraz możliwościach szybkiego transportu bakterii ze światła jelita do krezkowych węzłów chłonnych. Występowanie genu *yadA* u 3 zidentyfikowanych szczepów *Yersinia* świadczy o obecności u nich plazmidu wirulencji pYV (tab. I).

Tab e l a I. Analiza genotypowa zidentyfikowanych szczepów *Y. pseudotuberculosis*
 Tab l e I. Genotypic analysis of the identified *Y. pseudotuberculosis* strains

Gatunek	Liczba szczepów	Pochodzenie szczepów	<i>ypm</i>	<i>inv</i>	<i>ail</i>	<i>yadA</i>	<i>elt</i>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	gleba	+	+	+	+	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	2	staw	+	+	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	jezioro	+	+	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	rzeka	+	+	-	+	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	ścieki	+	+	-	+	--
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	ścieki	+	+	-	-	-

ypm - obecność genu *ypm* w DNA chromosomalnym, *inv* - obecność genu *inv* w DNA chromosomalnym, *ail* - obecność genu *ail* w DNA chromosomalnym, *yadA* - obecność genu *yadA* w DNA plazmidowym, *elt* - brak genu *elt* w DNA plazmidowym



Ryc. 1. Markery zjadliwości zidentyfikowanych szczepów *Y. pseudotuberculosis*.

Fig. 1. Virulence markers of the identified *Y. pseudotuberculosis* strains

M - wzorec masy molekularnej DNA - marker pUC19/MspI; otrzymane produkty PCR: 1 - gen *ypm*, 2 - otrzymany produkt PCR - gen *ail*, 3 - otrzymany produkt PCR - gen *inv*, 4 - otrzymany produkt PCR - gen *yadA*

Zakłada się, iż na posiadanie określonych elementów zjadliwości przez wyżej wymienione szczepy może mieć wpływ środowisko bytowania bakterii (nisze ekologiczne), o czym świadczy brak genu *ail* u 6 szczepów *Y. pseudotuberculosis*, zidentyfikowanych w próbkach wody a obecność jego u 1 szczepu, zidentyfikowanego w próbce gleby (tab. I).

Identyfikacji szczepów *Y. pseudotuberculosis* w wodach lądowych i morskich na terenie Pomorza Zachodniego dokonali wcześniej Czernomysy-Furowicz i in. (2). Sato i in. opisali przypadek jersiniozy u dzieci, które zakażyły się pałeczkami *Y. pseudotuberculosis* po wypiciu wody pitnej (16). Fukushima i in. wyizolowali szczepy *Y. pseudotuberculosis* z wód rzecznych (17). Nedoluha i in. wykazali obecność szczepów *Y. pseudotuberculosis* w próbkach wody, pochodzącej ze stawów a Cork i in. - w próbkach gleby (18, 19). Zbliżone rezultaty badań, dotyczące markerów zjadliwości na poziomie DNA plazmidowego uzyskali Gierczyński i in., charakteryzując szczepy *Y. pseudotuberculosis*, wyizolowane od ludzi i z żywności (20). Miller i in. dokonali identyfikacji genów *yadA* (plazmid wirulencji pYV) i *ail* (DNA chromosomalne) u szczepów *Y. pseudotuberculosis*, wyizolowanych od ludzi (21). Nagano i in. stwierdzili natomiast obecność genu *inv* w DNA chromosomalnym szczepów *Y. pseudotuberculosis*, pochodzących od gryzoni i ze środowiska pozazwierzęcego (22). Furowicz i in. stwierdzili aktywność enterotoksyczną (obecność ciepłochwiennej enterotoksyny LT) na poziomie fenotypowym szczepów *Y. pseudotuberculosis*, wyizolowanych od szynszyli, przy użyciu testu odwróconej biernej aglutynacji lateksowej (RPLA) (23). Titenko i in. opisali zdolność przekazywania przez szczepy *Escherichia coli* w procesie koniugacji, plazmidów pCG86 i RP4elt, posiadających geny *elt* szczepom należącym do gatunku *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* (24).

WNIOSKI

1. Ze względu na wysoką swoistość, czułość oraz krótki czas wykonania, metoda PCR powinna znaleźć szerokie zastosowanie w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej, dotyczącej DNA swoistego dla szczepów *Y. pseudotuberculosis*, izolowanych ze środowiska zewnętrznego. Zastosowanie tej metody może przyspieszyć nie tylko identyfikację wyżej wymienionego patogenu w materiale badanym, ale również wykrycie jego markerów zjadliwości, a tym samym ułatwić znacznie dochodzenie epidemiologiczne.
2. Identyfikacja DNA szczepów *Y. pseudotuberculosis* w jednej próbce gleby i w sześciu próbkach wody, pochodzących z różnych ujęć na terenie województwa zachodniopomorskiego, świadczy o występowaniu szczepów tego gatunku w tym środowisku i o realnym zagrożeniu dla zwierząt i człowieka.

J Czyżewska, AJ Furowicz

VIRULENCE OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* STRAINS ISOLATED FROM ENVIRONMENT IN ASPECT OF HUMAN EPIDEMIC THREAT

SUMMARY

The purpose of the work has been to identify *Yersinia pseudotuberculosis* strains and to demonstrate their potential pathogenicity using PCR reaction. Investigations included 167 samples of the water and 32 samples of the soil from westpomeranian region. Based on the analysis of PCR reactions the research confirmed the presence of DNA *Y. pseudotuberculosis* strain in 6 of the water samples and in 1 of the soil sample. The strains have been identified by nucleotide sequence of the *ypm* gene, which is specific only for mentioned species. Genotypic analysis demonstrated also the presence of genes, which confirmed their virulence.

The PCR reaction should be used in the microbiological diagnostic of *Y. pseudotuberculosis* strains, isolated from animals and from environment, because it is very specific, fast and sensitive method.

PIŚMIENNICTWO

1. Boroń-Kaczmarek A., Furowicz A. J. 1999. Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową. PZWL, Warszawa, 164-179.
2. Czernomysy-Furowicz D., Furowicz A. J., Perużyńska A., Gackowska I. 2000. Występowanie szczepów *Yersinia pseudotuberculosis* w wodach lądowych i w wodzie morskiej. XXIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Białymstoku, A.M. Białystok 12-15 września 2000.
3. Emirsajłow-Zalewska W. 1996. Oporność pałeczek *Yersinia spp.* na naturalne czynniki środowiska oraz środki odkażające. Życie Weter. 4, 113-115.
4. Blińska J. B. 1994. Yops of the pathogenic *Yersinia spp.* In: Molecular Genetics of bacterial Pathogenesis. Am. Soc. Microbiol. Washington, 366-379.
5. Cornelis G. R., Boland A., Jriate M., Koster M., Mills S., Neyt C, Sarker S., Stainier J. Smissen R., Sory M. P. 1998. The *Yersinia* Yop virulon, an integrated system to neutralize macrophages. Zbl. Bakt. 29, 89-96.
6. Wanger A. 1998. *Yersinia*. In: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Syst. Bacteriol. 2, 1051-1061.
7. Emirsajłow-Zalewska W., Furowicz A. J. 1997. Ocena wyznaczników patogenności w szczepach *Yersinia pseudotuberculosis* wyizolowanych od szynszyli. Med. Weter. 53, 51-53.
8. Gackowska I., Furowicz A.J., Czernomysy-Furowicz D., Jakubczak A. 2002. Fenotypowa i genotypowa analiza właściwości chorobotwórczych szczepów *Yersinia pseudotuberculosis* oraz *Yersinia enterocolitica*. Med. Weter. 58, 303-305.
9. Kur J. 1994. Metody diagnostyczne oparte na analizie DNA (PCR). Materiały kursu organizowanego przez Katedrę Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej oraz DNA-Gdańsk we współpracy z A&A Biotechnology, P.G. Gdańsk.
10. Nawrotek P. 1998. Wykorzystanie diagnostyki molekularnej w badaniach mikrobiologicznych. Fol. Univ. Agric. Stetin. 185, 36, 139-147.
11. Candrian U. 1995, Polymerase chain reaction in food microbiology. J. Microbiol. Methods 23, 89-103.
12. Swaminathan B., Barrett J. 1995. Amplification methods for epidemiologic investigations of infectious diseases. J. Microbiol. Methods 23, 129-139.
13. Pommepuy M., Le Guyader F. 1998. Molecular approaches to measuring microbial marine pollution. Env. Biotechnol. 9, 292-299.
14. Aarts H. J. M., Joosten R. G., Henkens M. H. C., Stegeman H., van Hoek A. H. A. M. 2001. Rapid duplex PCR assay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. J. Microbiol. Methods 47, 209-217.
15. Gradil C, Sampath M., Eaglesome M. D. 1994. Detection verotoxigenic *Escherichia coli* in buli semen using the polymerase chain reaction. Vet. Microbiol. 42, 239-244.
16. Sato K., Komazawa M. 1991. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children due to untreated drinking water. Contrib. Microbiol. Immunol. 12, 5-10.
17. Fukushima H., Gomyoda M., Tsubokura M., Aleksic S. 1995. Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* from river waters in Japan and Germany using direct KOH and HeLa celi treatments. Zbl. Bakt. 282, 40-49.
18. Nedoluha P. C, Westhoff D. 1997. Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. Food Microbiol. 14, 255-264.
19. Cork S. C, Marshall R. B., Madie P., Fenwick S. G. 1995. The role of wild birds and the environment in the epidemiology of *Yersinia* in New Zealand. New Zeal. Vet. J. 43, 169-174.

20. Gierczyński R., Jagielski M., Szych J., Kałużewski S. 1996. Występowanie plazmidów wirulencji w szczepach pałeczek *Yersinia* pochodzących z różnych źródeł. Med. Dośw. Mikrobiol. 48, 141-150.
21. Miller V. L., Pepe J. C., Russell D. G. 1994. The invasion genes of *Yersinia: inv, ail* and *yadA*. Strategies for intracellular survival of microbes. In: Bailliere's Clinical Infectious Diseases. Baill. Tindall. London, 213-226.
22. Nagano T., Kiyohara T., Suzuki K., Tsubokura M., Otsuki K. 1997. Identification of pathogenic strains within serogroups of *Yersinia pseudotuberculosis* and the presence of non pathogenic strains isolated from animals and the environment. J. Vet. Med. Sci. 59,153-158.
23. Furowicz A. J., Czernomysy-Furowicz D., Kowalczevska M. 1996. Enterotoksyczny szczep *Yersinia pseudotuberculosis* przyczyną jersiniozy szynszyli. Med. Weter. 52, 116-118.
24. Titenko B. M., Emdina I. A., Lebedeya S. A., Burlakova O. S., Roshchina N. V. 1988. Production of termolabile enterotoxins of *Escherichia coli* by *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 8, 41-46.

Adres autorów:

Izabela Czyżewska, Antoni J. Furowicz

Katedra Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR

ul. Dr Judyma 24, 71-466 Szczecin