

Kwartalnik

Tom 58

Zeszyt 2•2019

KWIECIEŃ – CZERWIEC

CODEN:

PMKMAV 58 (2)

2019

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advancements of Microbiology

Index Copernicus ICV = 101,48 (2017)

Impact Factor ISI = 0,354 (2017)

Punktacja MNiSW = 15,00 (2016)

<http://www.pm.microbiology.pl>

RADA REDAKCYJNA

JACEK BARDOWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), DARIUSZ BARTOSIK (Uniwersytet Warszawski),
JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), NADZIEJA DRELA (Uniwersytet Warszawski),
EUGENIA GOSPODAREK-KOMKOWSKA (Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),
JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), JACEK MIĘDZOBRODZKI (Uniwersytet Jagielloński),
ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski), ANTONI RÓŻAŁSKI (Uniwersytet Łódzki),
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOŚLAW STACHOWIAK (Uniwersytet Warszawski),
BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański), ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JACEK BIELECKI (Redaktor Naczelny)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
tel. 22 5541304; e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

RADOŚLAW STACHOWIAK (Zastępca)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
tel. 22 5541312; e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

AGNIESZKA SOBOLEWSKA-RUTA (Sekretarz)
Instytut Biotechnologii i Antybiotyków, ul. Starościńska 5, 02-516 Warszawa
tel. 22 3786229, e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

MARTA THOMSEN (korekta tekstów angielskich)

ADRES REDAKCJI

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: 22 3786229, 22 5541312
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPLAWSKA (Uniwersytet Warszawski)
ALEKSANDER DEPTUŁA (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),
HENRYK KRUKOWSKI (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie), BOŻENA NEJMAN-FALEŃCZYK (Uniwersytet Gdański)
RENATA MATLAKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), ADRIANNA RACZKOWSKA (Uniwersytet Warszawski)
AGATA GORYLUK-SALMONOWICZ (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie)
AGNIESZKA KWIATEK (Uniwersytet Warszawski), AGNIESZKA SZCZEPANKOWSKA (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN)
BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków)

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy
ul. Malinowa 11, 72-003 Wołczkowo
tel. 605031324; fax 91 3113186; e-mail: kalemba@mp.pl

STALI RECENZENCI:

JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),
EUGENIUSZ MAŁAFIEJ (Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki),
ANNA PRZONDO-MORDARSKA (Akademia Medyczna we Wrocławiu)

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Komórki *Neisseria gonorrhoeae*, mutant szczepu FA1090.

Preparatyka: dr Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.

Zdjęcie: dr Paweł Bącal, Pracownia Inżynierii Nano-hybrydowych Biosystemów Regulacji, Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęczka Polskiej Akademii Nauk.

Obraz SEM uzyskano przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu CePT POIG.02.02.00-14-024/08-00.

P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W

Skład i druk: *Zakład Wydawniczy Letter Quality*, tel.: 22 115 38 10, 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: *Jerzy Grzegorkiewicz*



**Ministry of Science
and Higher Education**

Republic of Poland

Zakup numerów DOI dla publikowanych artykułów
oraz profesjonalne tłumaczenie artykułów z języka polskiego na angielski

– zadania finansowane w ramach umowy 659/P-DUN/2018
ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
przeznaczonych na działalność upowszechniającą naukę.

Wersja anglojęzyczna wydrukowanych w bieżącym zeszycie artykułów
jest dostępna w archiwum internetowym czasopisma pod adresem:
https://www.exeley.com/journal/advancements_of_microbiology

WSPOMNIENIE

Profesor Stefan Kryński uczeń Rudolfa Weigla

13 kwietnia 2019 roku mija dziesiąta rocznica śmierci Profesora Stefana Kryńskiego – wybitnego mikrobiologa, humanisty i pedagoga. Ucznia Rudolfa Weigla, wieloletniego kierownika Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Gdańsku. To okazja aby przypomnieć tę wyjątkową postać.

Stefan Kryński pochodził ze szlacheckiej rodziny z Podlasia. Urodził się w Wilnie 1 sierpnia 1914 r., w dniu rozpoczęcia Wielkiej Wojny jako syn Kazimierza, lekarza wojskowego i nauczycielki – Felicji z Barwińskich. W ucieczce przed wojskiem niemieckim, a następnie przed rewolucją bolszewicką ewakuowany wraz z matką w głąb Rosji, do odrodzonej Polski wrócił dopiero po wojnie. Zanim osiadł wraz z rodziną w Poznaniu po drodze było Grodno, Suwałki i Brześć. W Poznaniu ukończył gimnazjum im. K. Marcinkowskiego i w 1932 r. zdał maturę. W latach 1932–1938 studiował medycynę na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Poznańskiego. Jak pisze we wspomnieniach, medycynę wybrał z myślą o przyszłej pracy naukowej. Od trzeciego roku studiów zatrudnił się jako asystent – wolontariusz w Oddziale Higieny Ogólnej i Medycyny Społecznej Zakładu Mikrobiologii tamtejszej uczelni.

W 1938 r., po uzyskaniu dyplomu lekarza odbył służbę wojskową w Szkole Podchorążych Sanitarnych Rezerwy w Warszawie zakończoną w marcu 1939 r. dyplomem podchorążego rezerwy. Lato 1939 r. spędził pracując jako lekarz Legii Akademickiej oraz w 43. Samodzielnej Kompanii Junackich Hufców Pracy. Wybuch II wojny światowej zastał go pod Łomżą, skąd wraz z junakami otrzymał rozkaz wymarszu na wschód. Dotarł do Kowla, gdzie przeżył atak Armii Czerwonej na miasto. Dramatyzm wydarzeń, których był świadkiem tak opisuje: *„Okolo południa wojska rosyjskie znalazły się na rogatkach miasta. Pociągi odeszły. (...) Zaczęło się potworne widowisko: setki wozów rzuciło się naprzód, pędząc i najeżdżając się nawzajem. (...) Rozkazy ginęły wśród krzyków, rżenia koni, tętentu ich kopyt, hałasu motorów, stukotu kół. Wydawało mi się, że wpadłem w wir, w którym kotłują się tysiące ludzi, zwierząt, wozów i maszyn. (...) Nie wiedzieliśmy, co robić. Hałas odbierał nam zdolność myślenia”*.*

* Wspomnienie przygotowano na podstawie książki Stefana Kryńskiego: „Kartki ze wspomnień starego profesora”, wydanej w 2006 r. przez Akademię Medyczną w Gdańsku.



Polskie wojsko zostało rozbrojone, niebawem załadowano wszystkich do wagonów i ruszono na wschód. Na jednym z pierwszych postojów, kiedy wagony nie były jeszcze zaplombowane, udało mu się zbiec. W październiku dotarł do Brześcia. Na przełomie października i listopada próbował dwa razy, z narażeniem życia, przedostać się przez Bug do niemieckiej strefy okupacyjnej, gdzie w Siedlcach chciał spotkać się z matką. Obie próby były nieudane. Aresztowany przez NKWD niemal cudem wyszedł na wolność. To zaważyło na Jego dalszym losie. Nie mogąc zostać w przygranicznym Brześciu, na początku marca 1940 roku udał się do Lwowa, okupowanego wówczas przez Sowieców.

Dzięki pomocy przyjaciół i znajomych, pod koniec czerwca otrzymał paszport, co dawało mu szansę na znalezienie pracy. Okazało się, że we Lwowie w ramach Instytutu Sanitarно-Bakteriologicznego powstał duży oddział produkujący szczepionkę przeciw durowi plamistemu, kierowany przez profesora Rudolfa Weigla. W czerwcu 1940 znalazł tam zatrudnienie, najpierw jako laborant, a po potwierdzeniu posiadania dyplomu lekarskiego – jako pracownik naukowy. Po zajęciu Lwowa przez Niemców w czerwcu 1941 r. placówkę

17 Tyfus plamisty, 1

- 1) Richetts i Wilder 1910 - pierwsze spostrzeżenie nad zaradkiewiczami.
- 2) Nicolle 1911 - doświadczenia we wnaśi hemocytów na chorych ludzich
- 3) Provarek 1913 - opis podobnych zaradkiewiczów
- 4) Sergeant, Foley, Dialatte 1914 " " "
- 5) do Rocha Lima 1916 - udowodnił pierwszy raz zaradkiewiczami a choroby - nazwał R. Provarelli.

Historia badań nad tyfusem plamistym:

W XVIII stuleciu, że wielu ludzi chorowało na tyfus pl. pierwsi zaliczali, Potwierdza to spostrzeżenie lekarza Moerit Howella 1900, „Dla prac laboratoryjnych rozpoczęli badania (Nicolle 1909) i swiatli (Nicolle i współpracownicy, Provarek 1911)

Wez odierowa pierwszy cielec tyfusa (Nicolle, Conte, Cousteil 1909)

We wnaśi stwierdzeni obecnosci zaradkiewiczów Richetts i Wilder 1910 w latach następnym Sergeant, Foley, Dialatte 1914.

Nicolle 1911 a Provarek 1913 spostrzegli podobne twory w kulkach krwi da Rocha Lima 1916 wrobieniem nich. wielkom. od zaradkiewicz.

fundament pod badania

Weil i Felix 1915 z moerit wyhodowali odmierca, wyrobienie nerek Ox_2 i Ox_{19} .

Weigl 1919-1920 hodowla zaradkiewiczów w wny

Zusser - 1939 " " " " w tkankach na specjalnym podłożu.

Cox - 1940

R. Provarelli

Morfologia zaradkiewiczów - 1) Girsa, 2) Castañeda, 3) Marchavello, 4) St. de Wilton. 4 R

Powstawa i wielkość, Weigl z Furendrit, ze R. Pr. nie pnie chodzą przez filtry membranowe o σ umiemy nr. 0.6 μ , Nicolle

Ze przechodzi przez filtry Chamberlanda L 2. W mikroskopie elektronowym wykazują błonę dw. która otacza substancję o charakterze zaradkiewiczów.

Hodowla: syntezy ^{in vitro} zaradkiewiczów z zaradkiewiczów

- 1) Weigl
- 2) Zusser - najlepiej nadaje się do hodowli tkanki, w kt. proces dyfuzji jest nieinterferencyjny, wahać się 6H nie przekracza gramów 7.4-7.6

przekształcono w Instytut Badań nad Durem Plamistym i Wirusami, gdzie Stefan Kryński kontynuował swoją pracę. Znajomość z prof. Weiglem nazywał „szczęśliwym losem”, a czas spędzony w Instytucie, mimo bardzo trudnej sytuacji ekonomicznej uważał za szczególnie cenny. W marcu 1942 r., po potwierdzeniu dyplomu lekarskiego został kierownikiem pracowni doświadczalnej. Badania naukowe nad *Rickettsia prowazekii* prowadził bezpośrednio pod opieką Rudolfa Weigla, który był też promotorem Jego pracy doktorskiej, zatytułowanej: „Badania nad toksycznym działaniem zarazka duru plamistego *Rickettsia prowazekii*”. Stopień doktora uzyskał dopiero po wojnie, w maju 1946 roku na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Kiedy w marcu 1944 r. Niemcy zlikwidowali lwowski Instytut, w życiu Stefana Kryńskiego rozpoczął się nowy rozdział. Pracował krótko jako lekarz w Białej Podlaskiej, a od lipca 1944 r. jako lekarz I Batalionu 34. Pułku Armii Krajowej uczestniczył w akcji „Burza”. W sierpniu szczęśliwie uniknął aresztowania przez NKWD, co nie udało się jego ojcu, aresztowanemu i wywiezionemu wraz z innymi oficerami do obozu.

W końcu listopada 1944 r. dotarł do Lublina, gdzie czekało na niego nowe wyzwanie. Powierzono mu zorganizowanie i kierowanie Zakładem Produkcji Szczepionki przeciw Durowi Plamistemu im. Rudolfa Weigla w Lublinie, podlegającym bezpośrednio najpierw Naczelnemu Nadzwyczajnemu Komisarzowi do Walki z Epidemiami, a od maja 1945 r. Państwowemu Zakładowi Higieny. Już na przełomie lutego i marca 1945 r. w lubelskim Zakładzie otrzymano pierwsze szczepionki ze szczepów wyhodowanych od chorych z okolicznych szpitali. We wspomnieniach Profesor tak przywołuje ten czas: „*Tymczasem ja w swym dotychczasowym życiu niczego nie organizowałem, nie miałem pojęcia o administracji, ekonomii, budżecie, polityce kadrowej i wielu innych problemach, związanych z produkcją. Co gorsza nie znałem całokształtu wytwarzania szczepionki. Nie miałem lokalu, ludzi i wyposażenia, ale miałem zapał. W marcu 1945 roku kierowany przeze mnie zakład produkował już szczepionkę*”.*

W niedługim czasie po zlikwidowaniu lubelskiego Zakładu Profesor wyjechał do Gdańska, z którym związał się do końca życia. Tu wspólnie z profesorem J. Mokrzyckim i profesorem E. Symem tworzył od podstaw Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Akademii Medycznej, a także Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej. Od 1 października 1946 r. został zatrudniony w Zakładzie na stanowisku starszego asystenta, a 1948 r. został adiunktem. W maju 1951 r. habilitował się na podstawie rozprawy: „Badania nad działaniem barwników *Rickettsia prowazekii*”. W październiku 1954 r. uzyskał tytuł naukowy profesora nadzwyczajnego i został kierownikiem Katedry Mikrobiologii i Dyrektorem Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej.

W marcu 1972 roku otrzymał tytuł profesora zwyczajnego nauk medycznych.

Profesor odnosił sukcesy na wielu polach swojej aktywności naukowo-badawczej. Wniósł istotny wkład w rozwój mikrobiologii. Wiele lat poświęcił badaniom patogenezy zakażeń wywołanych przez *Rickettsia prowazekii* i związanej z nią inwazyjnej toksyny produkowanej w ciele wszy odzieżowej. Był również niekwestionowanym autorytetem w zakresie badań nad gronkowcami i wywoływanymi przez nie zakażeniami szpitalnymi, jak również w zakresie typowania bakteriofagowego. Uznaniem Jego międzynarodowej pozycji była w 1964 roku nominacja na członka International Subcommittee for Staphylococcus Phage Typing w Londynie i utworzenie przy Katedrze Mikrobiologii Krajowego Ośrodka Typowania Gronkowców Bakteriofagami. W kolejnych latach we współpracy z Instytutem Pasteura w Paryżu prowadził badania nad *Yersinia pseudotuberculosis* i *Yersinia enterocolitica*, które zaowocowały opisem pierwszych przypadków zakażeń węzłów chłonnych u dzieci oraz wprowadzeniem w Polsce diagnostyki gruźlicy rzekomej.

Profesor opublikował ponad dwieście różnego rodzaju prac naukowych, był promotorem dwudziestu dwóch prac doktorskich, mentorem czterech przewodów habilitacyjnych, a sześciu jego uczniów uzyskało tytuł profesora. Był członkiem wielu towarzystw naukowych: Polskiego Towarzystwa Lekarskiego, członkiem – założycielem Polskiego Towarzystwa Parazytologów, Polskiego Towarzystwa Entomologicznego, Komitetu Mikrobiologicznego PAN, Societe Francaise de Microbiologie, International Subcommittee for Staphylococcus Phage Typing, jak również Światowego Związku Żołnierzy AK. Był wiceprzewodniczącym Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

Profesor był wzorem wykładowcy, który doskonale nawiązywał kontakt z audytorium, mówiąc żywo i interesująco. Wykłady przeplatał anegdotami, które na długo zapadały w pamięć słuchaczy. Obdarzony wyobraźnią i swadą, niezmiennie gromadził na swoich wykładach rzesze studentów. Był pasjonatem historii i literatury, nie obcy był mu też talent literacki, czemu dał wyraz barwnie opisując swoje życie w książce zatytułowanej „*Kartki ze wspomnień starego profesora*”, wydanej w 2006 r.

We wstępie do tej książki ówczesny rektor Akademii Medycznej w Gdańsku prof. Roman Kaliszan napisał: „*Dziś należy Pan do najstarszych Profesorów naszej Uczelni. Jest jednym z nielicznych tak długo aktywnie służącym jej w minionym 60-leciu, bogaty w doświadczenie i mądrość, ale i w pokorę, która znamionuje prawdziwą wielkość. Dziękujemy za to Panu, Profesorze!*”

Profesor Stefan Kryński zmarł 13 kwietnia 2009 r.

Katarzyna Garbacz, Lidia Piechowicz
Katedra Mikrobiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

ODPOWIEDŹ ŚCISŁA I JEJ ZAANGAŻOWANIE W REAKCJE KOMÓREK BAKTERYJNYCH NA STRESY

Julia Berdychowska, Justyna Boniecka*, Grażyna B. Dąbrowska

Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło we wrześniu 2018 r., zaakceptowano w kwietniu 2019 r.

Streszczenie: Odpowiedź ścisła jest reakcją bakterii na niekorzystne warunki środowiska. Jej efektorami są alarmony, czterofosforan i pięciofosforan guanozyny [(p)ppGpp], syntetyzowane przez enzymy RelA, SpoT oraz ich homologi (RSH). Enzym RelA, będący syntazą (p)ppGpp, jest aktywowany w odpowiedzi na niedobór aminokwasów, natomiast enzym SpoT, posiadający zdolność syntezy i hydrolizy (p)ppGpp, w odpowiedzi na niedobór kwasów tłuszczowych, żelaza oraz węgla. Akumulacja (p)ppGpp powoduje zahamowanie translacji, replikacji oraz obniżenie transkrypcji wielu genów, np. rRNA, tRNA, kodujących białka rybosomalne, a podwyższenie tych których białka są istotne w odpowiedzi bakterii na stres. Alarmony odpowiedzi ścisłej zapewniają bakteriom oporność na stres oksydacyjny i antybiotyki. Regulują również produkcję specyficznych cząsteczek, tzw. autoinduktorów quorum sensing, pomagających bakteriom we wzajemnej komunikacji odnośnie gęstości ich własnej populacji, co umożliwia im dostosowanie metabolizmu do panujących warunków, formowanie biofilmu – swego rodzaju społeczności mikroorganizmów zapewniającej sobie odpowiednie warunki do przetrwania w niesprzyjającym środowisku, oraz zasiedlanie nowych nisz. (p)ppGpp wpływają pozytywnie na formowanie biofilmu nie tylko poprzez regulację quorum sensing ale i poprzez stymulację syntezy potencjalnych elementów biofilmu. Wydaje się, że alarmony odpowiedzi ścisłej obniżają zdolność bakterii *Agrobacterium tumefaciens* do transformacji gospodarzy roślinnych, a tym samym ich zdolności chorobotwórcze. (p)ppGpp odpowiadają również za ruch mrowiący bakterii, który zwiększa ich oporność na niekorzystne czynniki środowiska.

1. Wprowadzenie. 2. Białka RelA, SpoT i RSH – enzymy metabolizmu alarmonów odpowiedzi ścisłej. 2.1. Regulacja transkrypcji przez alarmony odpowiedzi ścisłej u bakterii Gram-ujemnych. 2.2. Regulacja transkrypcji przez (p)ppGpp u bakterii Gram-dodatnich. 2.3. Wpływ alarmonów odpowiedzi ścisłej na translację i replikację. 3. Rola odpowiedzi ścisłej w regulacji innych procesów fizjologicznych bakterii. 3.1. Rola odpowiedzi ścisłej w produkcji sideroforów i antybiotyków. 4. Oporność komórek bakteryjnych na stres a odpowiedź ścisła. 4.1. Udział odpowiedzi ścisłej w regulacji quorum sensing. 4.2. Regulacja produkcji egzopolisacharydów i tworzenia biofilmu zależne od odpowiedzi ścisłej. 4.3. Rola odpowiedzi ścisłej w regulacji ruchu mrowiącego bakterii. 5. Podsumowanie

THE STRINGENT RESPONSE AND ITS INVOLVEMENT IN THE REACTIONS OF BACTERIAL CELLS TO STRESS

Abstract: The stringent response is a form of bacterial response to adverse environmental conditions. Its effectors are guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate [(p)ppGpp], which are synthesized by RelA, SpoT and their homologs (RSH). RelA, a (p)ppGpp synthase, is activated when there is a shortage of amino acids, whereas SpoT, which has the ability to synthesize and hydrolyze (p)ppGpp, responds to fatty acids, iron and carbon limits. Accumulation of (p)ppGpp causes an inhibition of translation, replication, a decrease in the transcription of many genes, e.g. rRNA, tRNA, encoding ribosomal proteins, and an increase in the transcription of genes whose proteins are important in bacterial stress response. The stringent response alarmones are crucial for bacterial resistance to oxidative stress and antibiotics. They also regulate the production of specific molecules, the so-called quorum sensing autoinducers, which help bacteria communicate the density of their own population, which enables them to adjust their metabolism to the prevailing conditions, to form a biofilm – a community of microorganisms attached to a certain surface, ensuring them appropriate conditions to survive in an unfavourable environment, and to colonize new niches. (p)ppGpp has a positive impact on biofilm formation not only via the regulation of quorum sensing, but also by stimulating the synthesis of potential elements of the biofilm. It also appears that the stringent response alarmones decrease the ability of *Agrobacterium tumefaciens* bacteria to transform plants and thus their potential to cause disease. (p)ppGpp enables the bacteria to perform swarming motility, a movement that increases their resistance to adverse environmental factors.

1. Introduction. 2. RelA, SpoT and RSH proteins – enzymes that metabolize the alarmones of the stringent response. 2.1. The regulation of transcription via stringent response alarmones in Gram-negative bacteria. 2.2. The regulation of transcription via (p)ppGpp in Gram-positive bacteria. 2.3. The influence of stringent response alarmones on translation and replication. 3. The role of the stringent response in the regulation of other physiological processes. 3.1. The role of the stringent response in the production of siderophores and antibiotics. 4. Bacterial cell resistance to stress and the stringent response. 4.1. The participation of the stringent response in quorum sensing regulation. 4.2 The regulation of exopolysaccharide production and biofilm formation dependent on the stringent response. 4.3. The role of the stringent response in the regulation of bacterial swarming motility. 5. Summary

Słowa kluczowe: biofilm, odpowiedź ścisła, (p)ppGpp, quorum sensing, RelA/SpoT

Key words: biofilm, stringent response, (p)ppGpp, quorum sensing, RelA/SpoT

* Autor korespondencyjny: Justyna Boniecka, Zakład Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; tel. nr: +48 (56) 611 45 76; e-mail: jboniecka@umk.pl

1. Wprowadzenie

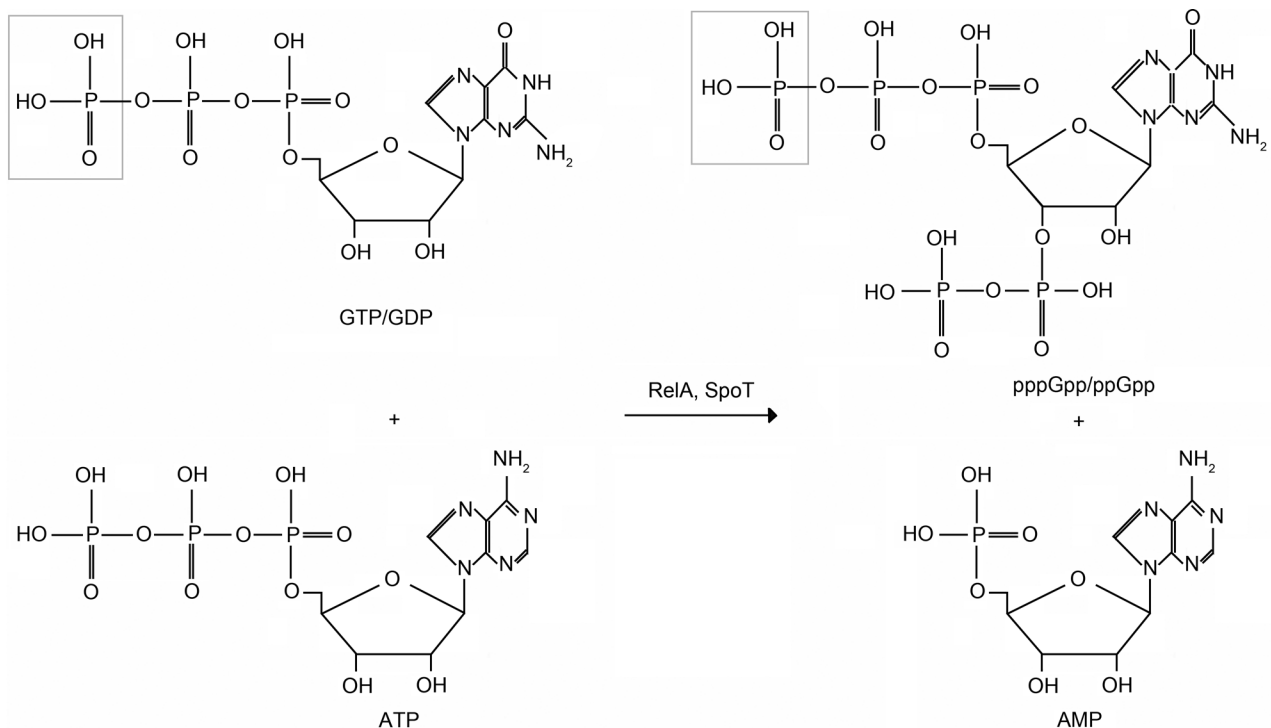
Organizmy żywe w drodze ewolucji wykształciły mechanizmy umożliwiające im przeżycie w niekorzystnych warunkach. Adaptacja komórek bakteryjnych do nietypowych dla wzrostu warunków i przetrwanie w nowym, zmienionym środowisku jest wynikiem reakcji komórek na stres. W warunkach stresu, w celu ochrony komórki dochodzi do zmiany w metabolizmie. Jednym z mechanizmów adaptacyjnych jest odpowiedź ścisła, zaobserwowana po raz pierwszy u *Escherichia coli* [16] i definiowana jako odpowiedź fizjologiczna bakterii na niedobór aminokwasów, kwasów tłuszczowych, innych składników odżywczych bądź innego rodzaju stres, np. zmiany temperatury [7, 27, 29, 36, 41, 85, 97, 109]. Alarmonami odpowiedzi ścisłej, określanymi wspólnie jako (p)ppGpp, są cztero- i pięciofosforan guanozyny, odpowiednio ppGpp i pppGpp, które m.in. poprzez bezpośrednie oddziaływanie z polimerazą RNA wpływają na zmiany w ekspresji genów oraz replikacji DNA. Celem pracy jest podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat bakteryjnej odpowiedzi ścisłej istotnej ze względu na jej zaangażowanie w reakcje mikroorganizmów na działanie czynników stresowych, ze szczególnym uwzględnieniem tego mechanizmu u bakterii wchodzących w interakcje z roślinami. Aktywacja odpowiedzi ścisłej u bakterii daje szansę na zasiedlanie nowych nisz i jest niejako gwarantem przetrwania nawet w warunkach ekstremalnych.

2. Białka RelA, SpoT i RSH – enzymy metabolizmu alarmonów odpowiedzi ścisłej

Głównymi efektorami odpowiedzi ścisłej u bakterii są (p)ppGpp. Cząsteczki te, często określane jako alarmony odpowiedzi ścisłej, są syntetyzowane przez enzymy RelA i SpoT (u Beta- i Gammaproteobakterii; Ryc. 1) oraz ich homologi zwane RSH (RelA/SpoT Homologs; u pozostałych bakterii).

Alarmony wpływają na metabolizm komórki bakteryjnej m.in. poprzez obniżenie transkrypcji genów kodujących rRNA, tRNA, białka rybosomalne i podwyższenie ekspresji tych kodujących białka biorące udział w syntezie aminokwasów oraz genów zaangażowanych w odpowiedź na stres [22, 44, 85, 103]. Poziom (p)ppGpp w komórkach reguluje także proces translacji i naprawy DNA. Działanie odpowiedzi ścisłej zaobserwowane zarówno u bakterii Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich a jej efektem fizjologicznym jest również zahamowanie replikacji DNA [4, 23, 25, 66] co jest przyczyną spowolnienia podziałów i wzrostu komórek [10, 23].

Enzym RelA jest białkiem związanym z rybosomem, które poprzez bezpośrednie monitorowanie wydajności translacyjnej komórki „wyczuwa” niedobór aminokwasów. Podczas prawidłowego wzrostu komórki aminokwasy w formie aminoacylo-tRNA są dostarczane do miejsca A rybosomu i dodawane do powstającego polipeptydu. W warunkach głodu aminokwasowego,



Ryc. 1. Synteza (p)ppGpp u *E. coli*

ppGpp i pppGpp są syntetyzowane odpowiednio z GDP i GTP oraz z ATP przez enzymy RelA i SpoT, w odpowiedzi na niedobór składników odżywczych. W wyniku tych reakcji powstaje również AMP. Grupy fosforanowe zaznaczone szarą ramką są obecne tylko w przypadku GTP i pppGpp.

w komórce bakteryjnej akumulowane są deacylowane formy tRNA, które blokują rybosom w miejscu A, a wówczas do niego przyłącza się białko RelA i syntezuje (p)ppGpp [41, 44], co zmniejsza powinowactwo enzymu do rybosomu. RelA, który może przemieszczać się od jednego rybosomu do drugiego monitoruje aktywność translacyjną komórki [112]. Inny model zakłada, że RelA przeprowadza kilka rund syntezy (p)ppGpp już po odłączeniu się od rybosomu, co wskazywałoby na posiadanie przez to białko „molekularnej pamięci” [27]. Kolejne badania pokazały jednak, że RelA może łączyć się z rybosomem nawet podczas nieobecności tRNA, a obecność deacylowanego tRNA stabilizuje ten kompleks i umożliwia syntezę (p)ppGpp [67]. Co ciekawe, sama cząsteczka ppGpp może wpływać pozytywnie na aktywność RelA, a tym samym na zasadzie pętli zwrotnej stymulować produkcję alarmonów odpowiedzi ścisłej [98]. Pomimo różnych modeli funkcjonowania białka RelA niezmiennym jest fakt, że jest to główny enzym odpowiedzialny za syntezę (p)ppGpp u *E. coli* w warunkach niedoboru aminokwasów. Funkcjonowanie odpowiedzi ścisłej nie zawęża się do regulacji metabolizmu komórek bakteryjnych tylko w tej sytuacji, ale ma miejsce również w przypadku reakcji na inne czynniki stresowe, takie jak niedobór kwasów tłuszczowych, żelaza czy źródła węgla oraz szok cieplny. Wówczas to, SpoT jest enzymem, który pełni funkcję syntetazy (p)ppGpp [27, 29 97, 109]. Białko to, w przeciwieństwie do RelA, wykazuje również aktywność hydrolazy alarmonów odpowiedzi ścisłej, w sytuacji kiedy warunki środowiska ulegają poprawie [47, 53, 114]. Enzym SpoT odpowiada zatem za utrzymanie równowagi w poziomie alarmonów, a jego dysfunkcja przy jednoczesnej obecności funkcjonalnego enzymu RelA skutkuje śmiercią komórek. Wynika to z tego, że u mutantów pozbawionych białka SpoT dochodzi do produkcji alarmonów przy jednoczesnym braku możliwości ich hydrolizy [114]. W warunkach kiedy komórki mają nieograniczony dostęp do substancji odżywczych GTP-aza CgtA/Obg, biorąca udział m.in. w składaniu rybosomów, wchodzi w interakcje z białkiem SpoT, co powoduje najprawdopodobniej zwiększenie jego aktywności hydrolitycznej, a tym samym obniżenie poziomu (p)ppGpp [87]. Kolejnym białkiem, które reguluje aktywność SpoT jest Acyl Carrier Protein (ACP), które także wchodzi w interakcje z tym enzymem. W przypadku, kiedy komórka dysponuje wystarczającą ilością składników odżywczych, ACP promuje aktywność hydrolityczną enzymu, natomiast w warunkach stresu niedoboru kwasów tłuszczowych, aktywność syntetazy [7].

U bakterii, które nie posiadają RelA i SpoT istnieją enzymy, oznaczane jako RSH [wcześniej Rel, określane jako te przynależące do tzw. długich RSH (podobnie jak RelA i SpoT)], które są odpowiedzialne za syntezę

(p)ppGpp zarówno w warunkach głodu aminokwasowego jak i w odpowiedzi na inne stresy. Enzymy te posiadają jednocześnie domenę odpowiedzialną za hydrolizę alarmonów odpowiedzi ścisłej. Oprócz enzymów RelA, SpoT i RSH u wybranych bakterii odkryto też małe syntetazy alarmonów SAS (Small Alarmone Synthetases), oznaczane również jako Rel, które posiadają tylko domenę odpowiedzialną za syntezę (p)ppGpp (czasami określane również jako krótkie RSH) [3, 103].

2.1. Regulacja transkrypcji przez alarmony odpowiedzi ścisłej u bakterii Gram-ujemnych

Inicjacja transkrypcji u bakterii polega na wiązaniu się rdzenia polimerazy RNA (RNAP) połączonego z czynnikiem σ (tworzących razem holoenzym RNAP) do sekwencji -35 i -10 promotora. Rdzeń RNAP zbudowany jest z pięciu podjednostek: α I, α II – wiążących białka regulatorowe, β – przyłączającej substraty reakcji, β' – wiążącej DNA (obie podjednostki β wchodzi w skład centrum aktywnego enzymu) i ω [13, 74]. Transkrypcja z większości promotorów *E. coli* (np. promotorów rRNA) prowadzona jest przez polimerazę RNA zawierającą czynnik σ^A (σ 70, RpoD). Natomiast alternatywne czynniki sigma wykorzystywane są do transkrypcji niektórych genów kodujących białka umożliwiające przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiska [13]. Rozsuniecie nici DNA na odcinku kilkunastu nukleotydów (czyli powstanie kompleksu otwartego) umożliwia rozpoczęcie transkrypcji poprzez syntezę krótkich, tzw. aborcyjnych RNA, a następnie przejście w kompleks elongacyjny, który opuszcza rejon promotora [13].

U *E. coli* transkrypcja genów kodujących rRNA regulowana jest głównie na poziomie inicjacji transkrypcji, na którą wpływ mają m.in. białka wiążące się z rejonami promotorowymi DNA – aktywatory i represory, oraz poziom nukleotydu inicjującego [6, 13, 34]. Wynika to z tego, że stabilność kompleksu polimerazy RNA z sekwencją promotorową danego genu jest niezwykle wrażliwa na ilość tego nukleotydu. Kiedy poziom nukleotydu inicjującego wzrasta, dochodzi do stabilizacji kompleksu polimerazy z promotorem co sprzyja inicjacji transkrypcji [34]. Jednakże w związku z tym, że u *E. coli* nukleotydem inicjującym jest ATP a nie GTP, akumulacja (p)ppGpp, która doprowadza do zużycia GTP, nie wpływa raczej na stężenie nukleotydu inicjującego, jak ma to miejsce w przypadku bakterii Gram-dodatniej *B. subtilis*, dla której GTP jest nukleotydem inicjującym transkrypcję rRNA [13].

Alarmony odpowiedzi ścisłej regulują transkrypcję u *E. coli* wiążąc się bezpośrednio z polimerazą RNA. Eksperymenty wykazały, że polimeraza RNA posiada dwa miejsca wiązania (p)ppGpp. Jedno z nich znajduje się około 30 \AA od miejsca aktywnego enzymu,

w zagłębieniu otoczonym podjednostkami α , β' oraz ω . Alarmony oddziałują tam z domeną DPBB (Double Psi β -Barrel) podjednostki β' i z końcem N podjednostki ω . Fragmenty podjednostek β , β' oraz podjednostki α i fragmenty podjednostek β , β' oraz ω stanowią dwa mobilne moduły RNAP nazywane odpowiednio core i shelf, które razem tworzą tzw. klamrę. W szczelinie jej zacisku znajduje się centrum katalityczne RNAP. Wiązanie się alarmonów we wcześniej wspomnianym miejscu obniża dynamikę klamry RNAP, co zapobiega zamykaniu komory centrum aktywnego, mającym miejsce wówczas kiedy nukleotydy przyłącza się do nici matrycowej DNA, podczas syntezy nowo powstającego RNA. To z kolei może spowalniać dodawanie nukleotydów i destabilizować kompleks inicjujący transkrypcję [44, 71, 91, 117]. Drugie z miejsc wiązania (p)ppGpp, oddalone o 60 Å od pierwszego, jest tworzone przez podjednostkę β' i czynnik transkrypcyjny DksA łączący się z RNAP, niedaleko ujścia kanału drugorzędowego polimerazy RNA [73, 79, 90].

W zależności od właściwości kinetycznych promotora, ekspresja genów jest obniżona bądź podwyższona w wyniku interakcji RNAP z (p)ppGpp. Ponieważ obecność (p)ppGpp powoduje destabilizację kompleksu RNAP-promotor, wpływa to znacząco na obniżenie transkrypcji genów posiadających promotory, które pozwalają na formowanie kompleksu o krótkim czasie funkcjonowania. Sekwencje promotorowe genów kodujących rRNA posiadają w obszarze $-10 +1$ (tzw. dyskryminator) sekwencję bogatą w pary GC wchodzącą w interakcję z podjednostką σ RNAP. Powoduje to formowanie ekstremalnie niestabilnych otwartych kompleksów z polimerazą RNA [5, 43], których destabilizację zwiększa dodatkowo przyłączanie się (p)ppGpp. Natomiast promotory genów kodujących białka odpowiedzialne za syntezę aminokwasów mają w tym miejscu sekwencję bogatą w pary AT, co zwiększa stabilność oddziaływań polimeraza RNA-DNA i obniża wrażliwość na destabilizację powodowaną działaniem alarmonów [5, 102].

Inną formą regulacji transkrypcji przez (p)ppGpp jest pośrednia aktywacja genów odpowiedzi na stres poprzez stymulację dysocjacji podjednostki σ^{70} z holoenzymu RNAP. W komórce znajduje się wówczas więcej wolnych cząstek rdzenia RNAP, do których mogą przyłączyć się alternatywne czynniki sigma, jak np. σ^S (σ^{38} , RpoS), σ^H (σ^{32} , RpoH), σ^N (σ^{54} , RpoN) i σ^E (σ^{24} , RpoE) [85, 102].

Alarmony odpowiedzi ścisłej ułatwiają także naprawę błędów powstających podczas transkrypcji DNA, biorąc udział w tzw. naprawie TCR (Transcription Coupled Repair). Mutanty pozbawione enzymów odpowiedzi ścisłej są mniej odporne na czynniki mutagenne, charakteryzują się wolniejszym usuwaniem dimerów cyklobutano-pirymidynowych indukowanych

światłem UV [54]. Wynika to z tego, że nie produkują (p)ppGpp, które jak wykazano podczas elongacji transkrypcji powodują rozluźnienie klamry polimerazy RNA znajdującej się na DNA, co umożliwia, przy współpracy z białkiem UvrD, „cofanie się” polimerazy na transkrybowanej nici DNA, a tym samym naprawę błędów [54].

2.2. Regulacja transkrypcji przez (p)ppGpp u bakterii Gram-dodatnich

Bakterie Gram-dodatnie należące do typu *Firmicutes* nie posiadają homologów czynnika transkrypcyjnego DksA oraz sekwencji dyskryminatorów bogatych w GC, a (p)ppGpp nie wchodzi w bezpośrednie interakcje z polimerazą RNA. Alarmony mają u tych bakterii istotne znaczenie w procesie transkrypcji, m.in. rRNA, regulując stężenie nukleotydu inicjującego ten proces, którym w głównej mierze jest GTP [35, 59]. Wzrost zawartości (p)ppGpp powoduje spadek poziomu tego nukleotydu, co nie wynika tylko z faktu, że jest on zużywany do produkcji (p)ppGpp, ale również z wpływu (p)ppGpp na szlaki syntezy GTP. Wykazano, że u *Bacillus subtilis* (p)ppGpp hamują aktywność enzymów Gmk oraz HprT, które biorą udział w produkcji GTP [60].

Zakłada się, że cztero- oraz pięcioletfosforan guanozyny regulują metabolizm u bakterii Gram-dodatnich m.in. poprzez czynnik transkrypcyjny CodY, który jest negatywnym regulatorem ekspresji ponad stu genów kodujących białka zaangażowane w sporulację, adaptację do niekorzystnych warunków środowiska czy wirulencję w fazie wzrostu ekspotencjalnego bakterii, charakteryzującej się wysokim poziomem GTP. W fazie stacjonarnej wzrostu, enzym RelA obniżając poziom GTP na cele produkcji alarmonów odpowiedzi ścisłej, a te obniżając aktywność Gmk i HprT, a tym samym jeszcze bardziej poziom GTP w komórce, ogranicza represję transkrypcji powodowanej przez CodY [44, 60, 101].

2.3. Wpływ alarmonów odpowiedzi ścisłej na translację i replikację

Alarmony odpowiedzi ścisłej regulują nie tylko transkrypcję ale powodują też spadek wydajności translacji, m.in. poprzez represję transkrypcji maszynierii związanej z syntezą białek, w tym tRNA, rRNA, a także genów kodujących białka rybosomalne [44, 53]. Co więcej, obniżają wydajność translacji wchodząc w interakcje z trifosforatazami guanozyny zaangażowanymi w składanie rybosomalnych dużych (50S) i małych (30S) podjednostek w kompleks 70S (np. BipA, Obg).

Białko BipA bierze udział w regulacji m.in. ruchu mrowiącego, wirulencji, symbiozy czy formowania biofilmu. W połączeniu z GTP, białko to jest w stanie łączyć się z bakteryjnym rybosomem 70S w miejscu

tożsamym z miejscem interakcji z z Ef-G, Ef-Tu i Ef4. W wyniku tej interakcji BipA może regulować przebieg procesu translacji, w szczególności białek zaangażowanych w odpowiedź bakterii na stres. O zaangażowaniu białka BipA w biogenezę podjednostek rybosomalnych i/lub składanie kompleksu 70S świadczy fakt, że mutant *bipA E. coli*, podczas wzrostu w temperaturze 20°C, charakteryzuje się odmiennym poziomem zawartości podjednostek 30S i 50S w porównaniu do szczepu dzikiego. Co więcej, odnotowano wyższy stosunek zawartości podjednostki 30S do podjednostki 50S oraz obu podjednostek do kompleksu 70S. Sugeruje to, że BipA jest najprawdopodobniej zaangażowany w biogenezę podjednostki 50S. Zaproponowano również, że białko to pełni istotną rolę w składaniu rybosomów, prawdopodobnie na drodze regulacji translacji specyficznych mRNA, których białka są zaangażowane w ten proces [21, 61]. W przypadku gdy w komórce dochodzi do akumulacji alarmonów (np. w warunkach głodu aminokwasowego) nukleotydy te wchodzi w interakcje z białkiem BipA i powodują takie jego zmiany konformacyjne, że nie wiąże się ono do rybosomu 70S ale do podjednostki 30S, co jednocześnie uniemożliwia powstanie kompleksu 70S [24,103].

Białka Obg są enzymami istotnymi dla wzrostu komórek, zaangażowanymi w replikację DNA, biogenezę rybosomów i adaptację do stresu. Białko ObgE jest odpowiedzialne głównie za prawidłowe złożenie podjednostki 50S. Co więcej, ObgE łącząc się z tą podjednostką zapobiega formowaniu się kompleksu 70S, a tym samym inicjacji translacji. Z kolei alarmony odpowiedzi ścisłej, wchodząc w interakcje z ObgE, zwiększają powinowactwo tego enzymu do niedojrzałej podjednostki 50S, co powoduje opóźnienie w jej poprawnym złożeniu oraz utrudnia tworzenie kompleksu 70S [28].

Alarmony odpowiedzi ścisłej mogą także utrudniać formowanie kompleksu inicjującego wchodząc w interakcje z czynnikiem inicjacji translacji If2. W tym samym miejscu czynnika If2 wiąże się GTP lub (p)ppGpp, jednak negatywny ładunek difosforanu w pozycji 3' (p)ppGpp „wystaje” poza białko If2 i potencjalnie zaburza jego funkcję [102]. Ponadto wykazano, że (p)ppGpp w warunkach *in vitro* mogą powodować inhibicję czynników elongacji translacji Ef-G [40] i Ef-Tu [84, 102, 103].

Replikacja DNA jest procesem niezbędnym do podwojenia materiału genetycznego i podziału komórki, do której zapoczątkowania konieczne są tzw. primery (startery). U bakterii to prymaza DnaG jest enzymem, który syntetyzuje te krótkie odcinki RNA. Wykazano, że u *B. subtilis* bezpośrednie przyłączenie się (p)ppGpp do tego enzymu powoduje inhibicję replikacji DNA w fazie elongacji [111], a u *E. coli* raczej tylko w fazie inicjacji [68]. Alarmony łączą się z prymazą DnaG podobnie jak standardowe nukleotydy, jednakże z powodu dodatko-

wych grup fosforanowych powodują zmiany konformacyjne tego białka wywołując wspomniany efekt. Badania wykazały, że (p)ppGpp hamują replikację wchodząc w interakcje z miejscem aktywnym prymazy [94, 103].

3. Rola odpowiedzi ścisłej w regulacji innych procesów fizjologicznych bakterii

Analizy mikromacierzowe ekspresji genów u szczepu dzikiego *Pectobacterium atrosepticum* (wcześniej *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*) – Gram-ujemnej bakterii będącej patogenem roślin powodującej gnicie i choroby ziemniaków [9, 11, 83], oraz u mutantu delecyjnego *relA* podczas eksponencjalnej i wczesnej stacjonarnej fazy wzrostu wykazały, że odpowiedź ścisła funkcjonuje głównie w warunkach dużego zagęszczenia bakterii. U mutantu *relA* podczas eksponencjalnej fazy wzrostu zmiany w ekspresji odnotowano tylko w przypadku pięciu genów. Natomiast w próbkach pobranych w fazie stacjonarnej liczba genów, których poziom transkryptów uległ zmianie, wzrasta do ponad tysiąca (358 – obniżenie i 930 – podwyższenie) w porównaniu do szczepu kontrolnego. Transkrypcja w większości przypadków u mutantu *relA* jest podwyższona, co potwierdza, że wysoka akumulacja (p)ppGpp, charakterystyczna dla fazy stacjonarnej wzrostu bakterii, obniża poziom transkrypcji [11]. Wśród tych transkryptów znajdują się takie, które kodują białka związane z replikacją DNA oraz z podziałem komórki, co dowodzi znaczącej roli odpowiedzi ścisłej w regulacji tych procesów. Dodatkowo, ekspresja genów kodujących funkcje związane z translacją i strukturą rybosomów także jest znacznie podwyższona, co można sklasyfikować jako obserwację typową dla „odpowiedzi rozluźnionej”. Co zaskakujące, geny, których ekspresja wzrasta najsilniej są związane z metabolizmem aminokwasów rozgałęzionych. Zauważono także podwyższoną ekspresję genów *citW-citG* kodujących enzymy związane z katabolizmem cytrynianu oraz genu kodującego białko Fis będące globalnym regulatorem [11]. Regulator ten powoduje aktywację transkrypcyjną genów związanych z translacją i transkrypcją a także stymuluje replikację i rekombinację miejscowo-specyficzną [30]. W przypadku genów kodujących białka związane z ruchem komórki lub wydzielaniem białek oraz wirulencją stwierdzono obniżenie ekspresji, co wskazuje na pozytywny wpływ alarmonów odpowiedzi ścisłej na te procesy. Wykazano także spadek ekspresji prawie wszystkich genów, których produkty związane są z pobieraniem żelaza, m.in. poprzez siderofor achromobacynę, a także związanych z metabolizmem ksylozy/ksylulozy, metabolizmem beztlenowym mrówczanu i asymilacją wodoru. Największe obniżenie ekspresji zauważono w przypadku genów kodujących najpraw-

dopodobniej dehydrogenazy alkoholowe zależne od Zn a także eksportera aminokwasów typu LysE. Wskazuje to, że (p)ppGpp wpływają na procesy fermentacji oraz eksport aminokwasów [11].

3.1. Rola odpowiedzi ścisłej w produkcji sideroforów i antybiotyków

Odpowiedź ścisła reguluje produkcję wydzielanych przez bakterie substancji, w tym sideroforów, czyli nośników jonów żelaza. Jednym z takich związków jest piowerdyna, która wykazuje fluorescencję oraz właściwości bakteriobójcze. W warunkach niskiego poziomu żelaza jej ilość jest w znacznym stopniu obniżona u mutantów delecyjnych *relA* i *relA/spoT* *Pseudomonas syringae* – Gram-ujemnej bakterii będącej patogenem roślin, takich jak fasola, soja czy groszek, a podwyższona u mutantu *spoT*. Wydaje się zatem, że (p)ppGpp pełnią rolę przekaźników kontrolujących produkcję piowerdyny w odpowiedzi na niedobór żelaza [19]. Podobnie u *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 w warunkach niedoboru żelaza alarmony odpowiedzi ścisłej umożliwiają produkcję piowerdyny, a u mutantów delecyjnych *relA*, *relA/spoT* oraz *relA/spoT/fprel* (*rel* – gen kodujący białko SAS) poziom tego sideroforu jest trzy- do dziesięciokrotnie zredukowany [20].

Alarmony wykazują istotny wpływ na metabolizm oraz produkcję antybiotyków u bakterii Gram-dodatniej *Streptomyces coelicolor* należącej do grupy *Actinobacteria*, tak samo jak powodująca choroby roślin bakteria *Streptomyces scabiei*. Bakterie *Streptomyces* żyją w glebach i osadach morskich jako saprofity, są nieruchliwe, rozprzestrzeniają się przez spory i podczas przejścia z fazy wzrostu logarytmicznego do fazy stacjonarnej dochodzi u nich do przeprogramowania metabolizmu, wynikiem czego jest produkcja różnych metabolitów wtórnych, m.in. antybiotyków (syntetyzują 70% znanych). W odpowiedzi na ograniczony dostęp do aminokwasów lub azotu, nukleotydy (p)ppGpp akumulują się pod koniec eksponencjalnej fazy wzrostu oraz podczas tak zwanej fazy przejściowej i są prawdopodobnie odpowiedzialne za produkcję antybiotyków, co potwierdza niezdolność mutantu *relA* do produkcji aktynorodyny i innych metabolitów [17, 46].

4. Oporność komórek bakteryjnych na stres a odpowiedź ścisła

Odpowiedź ścisła nie jest tylko formą odpowiedzi na niedobór substancji odżywczych, ale prawdopodobnie jest indukowana wieloma czynnikami stresowymi jakie oddziałują na bakterie zarówno na powierzchni jak i we wnętrzu roślin, wśród których można wymienić: pro-

mieniowanie UV [48, 54] czy fluktuacje temperatury [49] i zawartości wody [77, 107]. Wiele badań pokazało, że (p)ppGpp odgrywają niezwykle istotną rolę w licznych procesach związanych z przystosowaniem mikroorganizmów do takich warunków. Potwierdza to m.in. fakt, że alarmony odpowiedzi ścisłej kontrolują ekspresję genów i aktywność białek przez nie kodowanych, zaangażowanych w regulację poziomu H_2O_2 – związku odgrywającego znaczną rolę w odpowiedzi organizmów na stres [23, 57, 69].

Wiele badań nad udziałem odpowiedzi ścisłej w metabolizmie bakterii przeprowadzono na Gram-ujemnej bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, patogenie nie tylko człowieka ale i m.in. lucerny, rzodkiewnika, bazylii, powodującej u roślin chlorozy, uszkodzenia tkanek i ich macerację [99], a także nekrozy korzeniowe, prowadzące ostatecznie do osłabienia roślin, a nawet ich śmierci, a w konsekwencji do obniżenia plonowania [38, 110]. U bakterii tej za obronę przed stresem oksydacyjnym spowodowanym obecnością H_2O_2 są odpowiedzialne m.in. katalazy *KatA* i *KatB*, które rozkładają nadtlenek wodoru do wody i tlenu. U bakterii gen *katA* jest ekspresjonowany konstytutywnie i kodowane przez nie białko jest dominującą katalazą podczas fazy wzrostu logarytmicznego i w szczególności w fazie stacjonarnej oraz odgrywa rolę w oporności na H_2O_2 i w wirulencji. Natomiast ekspresja *katB* jest indukowana przez egzogenne H_2O_2 [57], a także indukujący stres oksydacyjny parakwat [89], substancje osmotycznie czynne, takie jak chlorek sodu, sacharoza, glicerol, mannitol, sorbitol, glikol polietylenowy [18] i wpływa na oporność nabytą [57]. U *P. aeruginosa* ekspresja genów związanych z obroną przed stresem oksydacyjnym jest regulowana m.in. przez globalne regulatory *Las* i *Rhl*, a także podjednostkę σ polimerazy *RpoS* [42, 57, 105, 108], co potwierdza fakt, że u mutantu *rpoS* *P. aeruginosa* aktywność katalaz wynosi tylko 35% aktywności w porównaniu do tej odnotowanej dla komórek typu dzikiego [57]. Do ekspresji genu kodującego białko *RpoS* potrzebna jest produkcja alarmonów odpowiedzi ścisłej [23, 37]. Dlatego też, nie jest zaskakującym fakt, że również mutant *relA/spoT* (delecyjny) charakteryzuje się bardzo niską aktywnością wspomnianych katalaz – także osiąga ona poziom 35% aktywności typu dzikiego. Z kolei u mutantu *relA/spoT/rpoS* aktywność tych enzymów spada jeszcze bardziej i wynosi tylko 15% aktywności odnotowanej dla szczepu dzikiego. Sugeruje to, że odpowiedź ścisła reguluje aktywność katalaz zarówno poprzez regulację ekspresji genu kodującego białko *RpoS*, jak i inne mechanizmy [57].

Inne badania wykazały, że mutant *P. aeruginosa* *relA/spoT* (również delecyjny) charakteryzuje się obniżoną aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy oraz jest bardziej wrażliwy na oksydanty niż bakterie szczepu dzikiego, co potwierdza istotność odpowie-

dzi ścisłej w prawidłowym funkcjonowaniu systemu antyoksydacyjnego u bakterii [76]. Potwierdzają to również inne badania, które pozwoliły zaobserwować, że komórki planktoniczne (wolno żyjące) pozbawione enzymów odpowiedzi ścisłej wykazują mniejszą oporność na H_2O_2 niż komórki planktoniczne typu dzikiego. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku bakterii tworzących biofilm, czyli swego rodzaju społeczność mikroorganizmów rosnących w produkowanej przez siebie macierzy zewnątrzkomórkowej, w której to bakterie wykazują podwyższoną oporność w porównaniu do komórek planktonowych, występujących w środowisku pojedynczo (opis biofilmu w rozdziale 4.2). Komórki pozbawione enzymów odpowiedzi ścisłej charakteryzują się znacznie wyższą wrażliwością na H_2O_2 niż bakterie typu dzikiego, które były w stanie dobrze funkcjonować w obecności 150-razy większego stężenia tej substancji niż stężenie, którym potraktowano bakterie planktoniczne. Co więcej, w komórkach mutantu *relA/spoT* odnotowuje się podwyższony poziom endogennego H_2O_2 , zarówno w tych tworzących biofilm, jak i w komórkach planktonowych znajdujących się w fazie stacjonarnej. Zatem mutant *relA/spoT* nie jest w stanie utrzymywać niskiego poziomu nadtlenu wodoru i jest bardziej wrażliwy na stres oksydacyjny zaindukowany tą cząsteczką. Pokazuje to, że odpowiedź ścisła odgrywa kluczową rolę w indukcji oporności na stres oksydacyjny u bakterii *P. aeruginosa* [57].

Chatneparat i wsp. [19] również zauważyli, że odpowiedź ścisła jest wymagana dla tolerancji bakterii *P. syringae* na nadtlenek wodoru. Pod wpływem ekspozycji tych bakterii na H_2O_2 przeżycie mutantów *relA*, *spoT* i *relA/spoT* było drastycznie obniżone, wskaźnik przeżywalności wynosił tylko kilka procent, podczas gdy u szczepu dzikiego 72,3% [19]. Enzym SpoT pełni rolę syntazy oraz hydrolazy alarmonów odpowiedzi ścisłej. Jednakże w dużej mierze jego główną funkcją jest hydroliza (p)ppGpp. Dlatego zarówno niska przeżywalność komórek tego mutantu oraz jego podwyższona wrażliwość na stres oksydacyjny mogą wynikać z generalnej, pierwotnie niskiej przeżywalności tych bakterii, wynikającej z nadmiernej akumulacji alarmonów [114]. Komplementacja mutacji *relA* i *relA/spoT* poprzez ekspresję genów, odpowiednio *relA* i *relA* oraz *spoT*, *in trans* częściowo przywróciła oporność bakterii na działanie H_2O_2 . Jednakże komplementacja mutacji *spoT* skutkowała wciąż wyższą wrażliwością komórek na ten związek [19].

Znaczącą rolę (p)ppGpp w tolerancji komórek bakterijnych na nadtlenek wodoru odnotowano także u *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Po ekspozycji na H_2O_2 przeżyło mniej niż 5% komórek mutantów *relA/spoT/fprel* i *relA/spoT*, podczas gdy bakterii typu dzikiego przetrwało 29,5% [20]. Biorąc pod uwagę fakt, że rośliny podczas ataku patogenów produkują

znaczne ilości reaktywnych form tlenu, w tym nadtlenu wodoru [62], rola odpowiedzi ścisłej w przetrwaniu tych mikroorganizmów na powierzchni czy we wewnątrz tkanek roślinnych jest niezwykle istotna.

Wyniki badań sugerują, że szlaki odpowiedzi bakterii na stres oksydacyjny, które są regulowane m.in. przez alarmony odpowiedzi ścisłej, regulują także oporność bakterii na antybiotyki. Nguyen i wsp. [76] zademonstrowali, że inaktywacja odpowiedzi ścisłej u *P. aeruginosa* powoduje drastyczny spadek antybiooporności zarówno komórek znajdujących się w warunkach głodu, jak i w biofilmie [76]. Mutant *P. aeruginosa* pozbawiony funkcjonalnych białek RelA i SpoT jest bardziej wrażliwy na antybiotyk ofloksacyne niż bakterie szczepu dzikiego, co prawdopodobnie jest wynikiem obniżonej aktywności enzymów układu antyoksydacyjnego u wspomnianego mutantu. W konsekwencji powoduje to akumulację reaktywnych form tlenu i śmierć komórek [57]. Również Chatneparat i wsp. [19] zauważyli, że odpowiedź ścisła jest wymagana dla tolerancji bakterii *P. syringae* na antybiotyki. Zaobserwowali, że mutanty *relA* oraz *relA/spoT* wykazują zwiększoną wrażliwość na ryfampicyne.

W warunkach głodu, czyli indukujących odpowiedź ścisłą, komórki *P. atrosepticum* uzyskują podwyższoną oporność na liczne czynniki stresowe, takie jak nadtlenek wodoru, szok cieplny czy traktowanie antybiotykami. Kiedy komórki będące w fazie wzrostu logarytmicznego poddano stresowi oksydacyjnemu zaindukowanemu H_2O_2 , zaobserwowano znaczny spadek ich liczby w ciągu sześciu godzin. Liczba komórek poddanych stresowi głodu (na początku eksperymentu taka sama jak tych pobranych w fazie logarytmicznej wzrostu) także spadła po potraktowaniu ich H_2O_2 , jednak bakterie te powróciły do stanu relatywnie wysokiej liczebności już po około dwóch godzinach. Komórki poddane stresowi głodu charakteryzowały się także większą opornością na ryfampicyne i wysoką temperaturę. Liczba komórek pobranych w fazie wzrostu logarytmicznego, wystawionych na działanie podwyższonej temperatury (50°C), spadła do zera i nie wzrosła przez dobę. Z kolei w przypadku komórek poddanych stresowi głodu ich liczba także spadła, jednak po pewnym czasie obserwowano wzrost ich liczebności do wartości początkowej [83].

Odpowiedź ścisła funkcjonująca w warunkach głodu umożliwia bakteriom przeżycie w środowisku zawierającym antybiotyki, m.in. poprzez stymulację ekspresji genu integrazy *intI1*. Gen ten zlokalizowany jest w integronach, elementach genomu zawierających kasety oporności na antybiotyki. Koduje on białko integrazę odpowiedzialną za insercję lub wycinanie wspomnianych kaset, co umożliwia ich rozprzestrzenianie się, a tym samym wzrost oporności bakterii na antybiotyki. Pierwotnie uważano, że wpływ na

ekspresję integronów ma odpowiedź SOS, która może zostać zaindukowana przez antybiotyki i horyzontalny transfer genów (np. transformację i koniugację). Podwyższona ekspresja genu *intI1* w biofilmie, gdzie część z komórek znajduje się w warunkach głodu, stymulujących produkcję alarmonów odpowiedzi ścisłej, zależy nie tylko od odpowiedzi SOS, ale, jak wynika z doświadczeń przeprowadzonych na *E. coli*, również od innych czynników. Po wyeliminowaniu wpływu odpowiedzi SOS nadal obserwowano wyższą ekspresję genu kodującego *IntI1* w komórkach *E. coli* w biofilmie. W celu sprawdzenia regulacji ekspresji *intI1* skonstruowano mutanty pozbawione globalnych regulatorów, m.in. *RelA* i *SpoT* czy proteazy *Lon*. Żaden z mutantów nie wykazywał zmian w zdolności do formowania biofilmu, jednak nie zauważono u nich wzrostu ekspresji *intI1* charakterystycznego dla komórek tworzących biofilm, co wskazuje na regulację ekspresji *intI1* przez (p)ppGpp oraz proteazę *Lon*. Zatem w przypadku braku (p)ppGpp nie dochodzi do zwiększenia ekspresji *intI1*, a co za tym idzie rozprzestrzeniania kaset zapewniających oporność na antybiotyki [104]. Jest to kolejny przykład, który dowodzi, że odpowiedź ścisła może zwiększać przystosowanie bakterii do funkcjonowania w środowisku, w którym występują szkodliwe dla nich czynniki i ułatwiać mikroorganizmom przeżycie na powierzchni czy we wnętrzu organizmów, np. roślinnych.

4.1. Udział odpowiedzi ścisłej w regulacji quorum sensing

Kultury bakterii osiągając stan wysokiego zagęszczenia modulują swój fenotyp tak aby umożliwić sobie produkcję metabolitów wtórnych, enzymów oraz czynników wirulencji, a tym samym zasiedlanie nowych nisz [93, 113]. Wraz ze wzrostem liczebności populacji komórki bakteryjne wytwarzają cząsteczki nazywane autoinduktorami [15], które produkowane wewnątrz komórki podlegają sekrecji do środowiska. Po przekroczeniu poziomu progowego, autoinduktory stymulują procesy prowadzące do zmiany ekspresji genów, które umożliwiają zsynchronizowanie metabolizmu bakterii. Proces komunikacji pomiędzy bakteriami, w którym to bakterie wykorzystują produkcję i detekcję autoinduktorów, aby monitorować zagęszczenie populacji, nazywa się quorum sensing. Zjawisko to jest istotne w kontroli takich procesów jak formowanie biofilmu, sekrecja czynników wirulencji, bioluminescencja, produkcja antybiotyków, sporulacja, kompetencja oraz innych [75].

W przypadku Gram-ujemnych Gammaproteobakterii główną klasę autoinduktorów stanowią acylowane laktony homoseryny AHL (acyl-HSLs, acyl-HomoSerine Lactones). Są one unikalne dla gatunku bakterii i służą do porozumiewania się jedynie pomiędzy

przedstawicielami tego samego gatunku [75]. Jednymi z systemów autoindukcji są *las* i *rhl* dobrze poznane u *P. aeruginosa* [75, 78, 80, 81] oraz *tra* u *Agrobacterium tumefaciens*. Ten ostatni reguluje transfer plazmidu Ti pomiędzy komórkami bakterii na drodze koniugacji [33]. Na systemy te składają się syntazy autoinduktorów, oznaczane literą „I” na końcu nazwy białka (np. *LuxI*), oraz receptory cytoplazmatyczne tych autoinduktorów, oznaczane symbolem „R” (np. *LuxR*) [75].

W momencie, gdy ilość autoinduktorów przekracza stężenie progowe, u *P. aeruginosa*, dochodzi do aktywacji regulatorów transkrypcyjnych *LasR* i *RhlR*, które indukują ekspresję wybranych genów, m.in. kodujących białka *LasI* i *RhlI*, odpowiedzialne za produkcję autoinduktorów (stymulacja produkcji autoinduktorów na zasadzie sprzężenia zwrotnego) i inne białka istotne dla chorobotwórczości czy biorące udział w formowaniu biofilmu. System *las* składa się z *LasI* – syntazy autoinduktora N-3-oksododekanolowego laktonu homoseryny 3-oxo-C12-HSL (N-3-oxododecanoylhomoserine lactone), który aktywuje białko *LasR* będące jednocześnie receptorem tego autoinduktora jak i aktywatorem transkrypcji genów odpowiedzialnych za syntezę szeregu białek sekrecyjnych – związanych z wirulencją bakterii, takich jak elastaza kodowana przez gen *lasB*, proteaza kodowana przez gen *lasA*, alkaliczna proteaza (*apr*) i egzotoksyna A (*toxA*) [82]. Z kolei system *rhl* składa się z białka *RhlI* odpowiadającego za syntezę N-butyrylowego laktonu homoseryny C4-HSL (N-butanoylhomoserine lactone) i *RhlR*, które jest receptorem autoinduktorów i aktywatorem transkrypcji [75]. System ten stymuluje syntezę ramnolidów posiadających właściwości biosurfaktantów, które mogą wywierać niekorzystny wpływ na komórki człowieka a także innych bakterii [2, 39, 51, 63, 95, 116], i aktywność białka *LasA* oraz ekspresję genu *lasB*, podobnie jak w przypadku systemu *las* [12]. System *rhl* promuje również syntezę piocyjany, niebieskiego barwnika o właściwościach oksydoredukcyjnych, powodującego zahamowanie wzrostu innych bakterii [12, 50].

Bakterie Gram-dodatnie jako autoinduktory wykorzystują głównie modyfikowane oligopeptydy [52, 100]. W tym przypadku sygnał jest odbierany przez receptory błonowe, a informacja przekazywana na drodze fosforylacji [75].

Zjawisko quorum sensing jest niezbędne dla funkcjonowania zarówno mikroorganizmów symbiotycznych, jak i patogennych, wchodzących w interakcje z roślinami. Istnieje wiele dowodów na to, że odpowiedź ścisła jest istotnym elementem regulującym quorum sensing u tych i innych bakterii. Wykazano, że nadekspresja genu *relA* u *P. aeruginosa* powoduje podwyższenie ekspresji genów *lasR* i *rhlR*, kodujących białka istotne dla funkcjonowania quorum sensing [108]. Bowden i wsp. [11] zaobserwowali, że mutant *relA/spoT P. aeruginosa*

akumuluje na znacznie niższym poziomie autoinduktor N-3-oksoheksanoilowy lakton homoseryny 3-oxo-C6-HSL (N-3-oxohexanoilhomoserine lactone) [11]. Co ciekawe, w komórkach *P. aeruginosa* aż 40% genów regulowanych poprzez quorum sensing jest również regulowana przez czynnik RpoS [96], którego ekspresja jest zależna od odpowiedzi ścisłej [37, 108]. Regulację quorum sensing przez czynnik RpoS zaobserwowano również u bakterii *Ralstonia solanacearum* będącej patogenem roślin [31].

Wykazano, że alarmony odpowiedzi ścisłej odgrywają również istotną rolę w przekazywaniu sygnału o zmianie płynności błony (membrane fluidity), mającej miejsce w odpowiedzi na stres. Acyltransferaza LPA (LptA) bierze udział w biosyntezie fosfolipidów wchodzących w skład błon komórkowych. Zaobserwowano, że mutant *P. aeruginosa* pozbawiony tego enzymu charakteryzuje się zmniejszoną płynnością błony bakteryjnej. Podczas fazy wzrostu logarytmicznego zaobserwowano u niego przedwczesną produkcję autoinduktorów quorum sensing – N-butyrylowych laktonów homoseryny C4-HSL i N-heksonylo laktonów homoseryny C6-HSL. Z kolei na początku fazy stacjonarnej obserwowano zmniejszone wytwarzanie 2-heptyl-3-hydroksy-4-chinolonu, PQS (2-heptyl-3-hydroksy-4-quinolone), cząsteczki sygnałowej, której produkcja jest regulowana przez LasR. Cząsteczka PQS wpływa pozytywnie na ekspresję *lasR*, *lasB*, *rhlR*, *rhlI* i *rpoS* oraz na poziom determinantów wirulencji, takich jak ramnolipidy, LecA i piocyjanina, a także białek związanych z pobieraniem żelaza [8, 26, 70]. W fazie wzrostu logarytmicznego oraz stacjonarnej dochodziło do akumulacji kwasu antranilowego, prekursora PQS. Zauważono zwiększoną ekspresję *rhlI*, *lasI*, *lasB* oraz obniżoną ekspresję *pqsC* oraz *pqsA* (genów związanych z syntezą PQS), a także zwiększoną ekspresję *relA* [8]. Podwyższona ekspresja *relA* u mutantu *lptA* we wczesnych fazach wzrostu bakterii sugeruje, że odpowiedź ścisła promuje syntezę autoinduktorów biorących udział w mechanizmie quorum sensing, produkowanych w tym przypadku już w fazie logarytmicznej. Założenie to jest po części potwierdzone faktem, że u mutantu *relA*, który nie wytwarza (p)ppGpp, nie zaobserwowano przedwczesnej produkcji C4-HSL i C6-HSL, podobnie jak i u podwójnego mutantu *lptA/relA*. Przypuszcza się, że akumulacja (p)ppGpp jako forma odpowiedzi na stres, któremu towarzyszą m.in. zmiany stanu fizycznego dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej, stymuluje produkcję autoinduktorów, co z kolei umożliwia formowanie biofilmu, a tym samym zwiększanie przeżywalności mikroorganizmów symbiotycznych lub patogennych na roślinach oraz promuje ich oporność na substancje antibakteryjne wydzielane przez rośliny [8].

Innym, pośrednim dowodem na to, że odpowiedź ścisła i produkcja autoinduktorów są powiązane jest

fakt, że komórki mutantów systemu *las* i *rhl* rosnące na korzeniach bazylii są dłuższe niż te szczepu dzikiego [110], co przypomina fenotyp komórek mutantów odpowiedzi ścisłej *P. syringae* i *E. amylovora* *relA* i *relA/spoT* [1, 19, 20]. Powyższe informacje sugerują, że akumulacja (p)ppGpp promuje produkcję autoinduktorów, a tym samym stymuluje system *las* i *rhl*, a także nie pozwala komórkom inwestować we wzrost w warunkach wysokiego zagęszczenia bakterii.

Patogenna bakteria *A. tumefaciens* z rodziny *Rhizobiaceae* powoduje guzowatość korzeni poprzez insercję do genomu rośliny fragmentu bakteryjnego DNA (T-DNA) znajdującego się na plazmidzie Ti. Gdy T-DNA, niosące m.in. geny syntezy opin, jest wprowadzone do genomu rośliny, w wyniku transformacji w tkankach produkowane są niewielkie związki organiczne nazywane opinami. Opiny stymulują pośrednio u bakterii ekspresję genu *traR* kodującego białko promujące ekspresję genów zależnych od quorum sensing, zaangażowanych m.in. w produkcję autoinduktorów (w celu amplifikacji odpowiedzi quorum sensing), replikację plazmidów Ti oraz horyzontalny transfer tych ostatnich na drodze koniugacji. Dzięki temu możliwe jest „rozprowadzenie” plazmidów niosących geny kodujące białka wirulencji, w tym te umożliwiające transport T-DNA do komórek gospodarza, pomiędzy komórkami bakteryjnymi. Mechanizm ten podnosi patogeniczność populacji bakterii w stosunku do gospodarza oraz wydajność transformacji. Zatem obniżenie wydajności komunikacji quorum sensing wpływa negatywnie na rozwój guzowatości korzeni [64].

Co zaskakujące, u bakterii *A. tumefaciens* w fazie stacjonarnej poziom autoinduktora N-3-oksooktanoilowego laktonu homoseryny, 3-oxo-C8-HSL (N-3-oxooctanoilhomoserine lactone) obniża się, a tym samym komunikacja międzykomórkowa quorum sensing również spada. Wynika to z faktu, że w fazie stacjonarnej wzrasta poziom białka BlcC (nazywanego także AttM) odpowiedzialnego za degradację 3-oxo-C8-HSL. Koreluje to z wysokim poziomem (p)ppGpp, który pośrednio stymuluje ekspresję genu kodującego to białko. Potwierdza to m.in. fakt, że u mutantu *relA* w fazie stacjonarnej poziom białka BlcC nie wzrasta. Do momentu wejścia bakterii w tę fazę wzrostu poziom białka BlcC jest niski, gdyż jest negatywnie regulowany przez czynnik AttJ, wytwarzany w komórce podczas jej wzrostu. Potwierdzają to wyniki konstytutywnej ekspresji *blcC* u bakterii z mutacją w genie *attJ*. Ta konstytutywna ekspresja nie jest zależna od poziomu białka RelA, co sugeruje, że (p)ppGpp nie mają bezpośredniego wpływu na ekspresję *blcC*, a jedynie biorą udział w przezwycięzeniu represji jego ekspresji przez AttJ [115].

Alarmony odpowiedzi ścisłej wydają się oddziaływać negatywnie na zdolność *A. tumefaciens* do przekazywania plazmidu Ti przez bakterie, prawdopodobnie

poprzez umożliwienie ekspresji białka BlcC, enzymu odpowiedzialnego za rozkład wspomnianego autoinduktora [115]. Jednakże, w związku z tym, że metabolity produkowane przez rośliny w miejscach narośli mogą regulować aktywność białka BlcC w komórkach bakterii kolonizujących, może ona zależeć od stanu metabolicznego gospodarza [64]. Niemniej jednak, wydaje się słusznym aby komórki *A. tumefaciens* używane do transformacji roślin były hodowane w medium bogatym we wszystkie niezbędne im składniki odżywcze. Co więcej, dla maksymalnej skuteczności, transformacja roślin powinna być prowadzona z wykorzystaniem bakterii znajdujących się w logarytmicznej fazie wzrostu.

4.2. Regulacja produkcji egzopolisacharydów i tworzenia biofilmu zależne od odpowiedzi ścisłej

Odpowiedź ścisła regulując quorum sensing wpływa pośrednio na funkcjonowanie biofilmu. Biofilm (błona biologiczna) jest społecznością mikroorganizmów, które rosną przytwierdzone do pewnej powierzchni, jednocześnie pozostając zanurzone i połączone ze sobą w produkowanej przez siebie macierzy zewnątrzkomórkowej, składającej się z substancji polimerowych wydzielanych pozakomórkowo, tzw. EPS (Extracellular Polymeric Substances) – głównie egzopolisacharydów, służących jako rusztowanie dla węglowodanów, białek, kwasów nukleinowych i lipidów, chroniącej je przed działaniem czynników zewnętrznych [32, 58].

Mikroorganizmy w biofilmie mogą funkcjonować w warunkach, w których przetrwanie pojedynczych komórek byłoby trudne, a w wielu przypadkach nawet niemożliwe. Wykazują też odmienne cechy niż komórki żyjące w postaci wolnej, m.in. dzięki ekspresji specyficznych genów w odpowiedzi na autoinduktory quorum sensing, które są produkowane przez bakterie żyjące w biofilmie. Z jednej strony biofilm zapewnia mikroorganizmom przytwierdzenie do powierzchni tkanek lub przedmiotów, utrudniając tym samym ich zmycie wodą lub krwią [86]. Z drugiej strony, wewnątrz biofilmu bakterie są chronione przed desykcją, systemem immunologicznym gospodarza, substancjami antybakteryjnymi, czy strawieniem przez pierwotniaki oraz leukocyty [88]. Wewnątrz tej struktury panują warunki ograniczonej dostępności tlenu oraz substancji odżywczych, więc komórki charakteryzuje powolne tempo metabolizmu i wzrostu. Dzięki temu bakterie są mniej wrażliwe na antybiotyki, których celem są komórki dzielące się [86].

Biofilm wykazuje czasoprzestrzenny rozdział subpopulacji zaangażowanych w takie procesy jak sporulacja i formowanie macierzy. Niektóre komórki bakteriacyjne stanowią tam rezerwuary patogenów, które

mogą ulec reaktywacji w korzystnych warunkach środowiska, tzw. komórki przetrwałe (persister cells) [56]. Biofilm, zmniejszając ruchliwość bakterii i zwiększając ich gęstość na określonej powierzchni, ułatwia wymianę plazmidów poprzez koniugację, a także może przyczyniać się do rozprzestrzeniania antybiotykooporności [45, 86].

Oprócz wspomnianej, pośredniej roli odpowiedzi ścisłej w regulacji metabolizmu bakterii tworzących biofilm poprzez stymulację quorum sensing, akumulacja (p)ppGpp wydaje się również wpływać bezpośrednio na formowanie tej struktury, poprzez regulację syntezy egzopolisacharydów. Ruffing i Chen [92] zauważyli, że u bakterii Gram-ujemnej *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 odpowiedź ścisła jest niezbędna dla biosyntezy kurdlanu, polimeru glukozy. Podejrzewa się, że ten egzopolisacharyd pełni u mikroorganizmów funkcję ochronną, jednak jak do tej pory nie potwierdzono jego udziału w żadnym istotnym procesie. Związek ten znalazł zastosowanie w przemyśle budowlanym i spożywczym. Prawdopodobnie jest to związek istotny dla funkcjonowania tych bakterii, gdyż jego synteza zachodzi w odpowiedzi na niedobór azotu, tak jak innych polimerów cukrów ważnych dla struktury biofilmu. Co więcej, jego najwyższe stężenie obserwuje się w fazie stacjonarnej wzrostu, podobnie jak innych egzopolisacharydów. Analiza transkryptomu *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 w warunkach niedoboru azotu – w fazie stacjonarnej wzrostu, wykazała, że ekspresja genów operonu produkcji kurdlanu, *crdASC*, wzrasta 100-krotnie w porównaniu do fazy wzrostu logarytmicznego tych bakterii. Podczas produkcji kurdlanu wzrasta również ekspresja genu kodującego homologa RelA i SpoT (*rsh*). Mutant *rsh* (knock-out insercyjny) w podobnych warunkach wykazuje 57-krotnie niższą ekspresję genu *crdS* kodującego podjednostkę katalityczną syntazy β -1,3-glukanu biorącej udział w produkcji kurdlanu w porównaniu do szczepu dzikiego oraz całkowity brak akumulacji kurdlanu [92]. Z kolei mutant pozbawiony podjednostki polimerazy RNA RpoN, regulatora transkrypcji w warunkach niedoboru azotu np. u *E. coli* [65], produkuje o 30% więcej kurdlanu niż bakterie typu dzikiego. Może to wskazywać, że produkcja kurdlanu jest niezależna od RpoN, a wręcz, że brak funkcjonalnego polipeptydu RpoN umożliwia szybsze i/lub stabilniejsze przyłączanie do rdzenia polimerazy innych niż RpoN czynników σ , do produkcji i funkcjonowania których bardzo często niezbędne są alarmony odpowiedzi ścisłej [23], umożliwiając intensywniejszą produkcję kurdlanu [92]. Niższa ekspresja genu *crdS* u mutantu *rsh* oraz brak produkcji kurdlanu potwierdzają, że odpowiedź ścisła odgrywa istotną rolę w produkcji tego polimeru, który najprawdopodobniej bierze udział w formowaniu biofilmu.

Odpowiedź ścisła wywiera wpływ nie tylko na ekspresję genu istotnego dla syntezy kurdlanu ale i hamuje aktywność inhibitora pośredniego syntezy tego polimeru, polifosfatazy Ppx rozkładającej polifosforan w komórkach. W związku z tym, że biosynteza kurdlanu jest procesem wymagającym dużych nakładów energii, ich źródłem może być polifosforan. Akumulacja polifosforanu u *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 wzrasta w warunkach stresowych oraz w stacjonarnej fazie wzrostu, co koreluje z wysokim poziomem (p)ppGpp i kurdlanu. Alarmony odpowiedzi ścisłej hamując aktywność polifosfatazy utrzymują wysoki poziom polifosforanu, umożliwiając tym samym syntezę kurdlanu, co wyjaśnia jego wysoki poziom w fazie stacjonarnej wzrostu bakterii. Opisane wyniki badań potwierdzają zaangażowanie alarmonów odpowiedzi ścisłej w syntezę egzopolisacharydów oraz regulację metabolizmu mikroorganizmów w warunkach niedoboru związków odżywczych [92]. Wydaje się zatem, że stosowanie środków bakteriobójczych może być skuteczne wówczas, kiedy komórki są w fazie wzrostu logarytmicznego, charakteryzującej się niską intensywnością produkcji (p)ppGpp, a co za tym idzie niskim poziomem istotnych dla utworzenia stabilnej struktury biofilmu egzopolisacharydów.

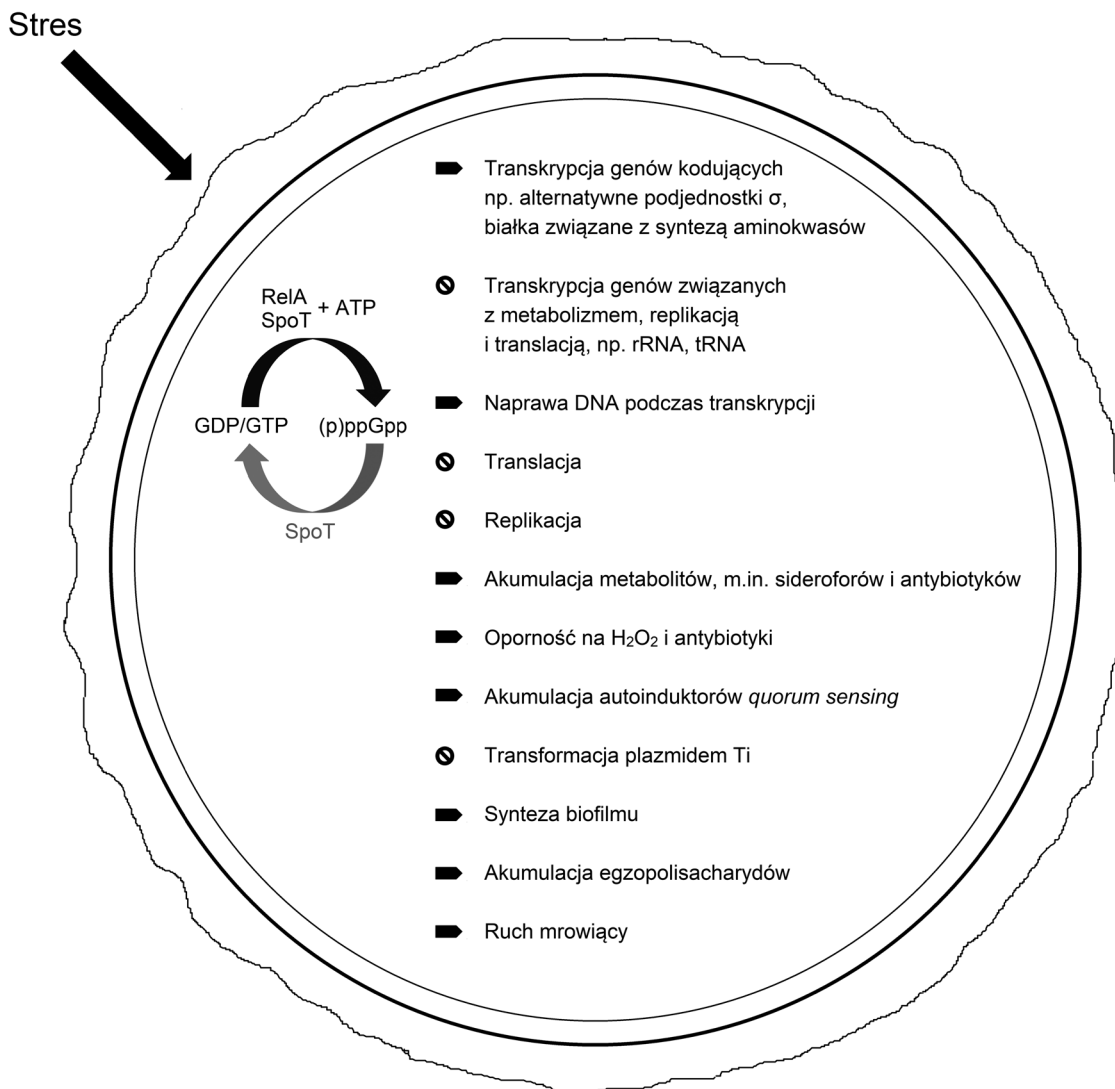
Przykładami badań nad funkcją odpowiedzi ścisłej w tworzeniu biofilmu są eksperymenty przeprowadzone na Gram-dodatniej bakterii patogenicznej *Listeria monocytogenes* powodującej u ludzi występowanie listeriozy, objawiającej się dolegliwościami układu pokarmowego (wymioty, biegunka i wysoka gorączka). Bakteria *L. monocytogenes* jest zdolna do adhezji i tworzenia biofilmu na różnych powierzchniach, na żywności czy roślinach. Wykazano, że przyłączenie się komórek *L. monocytogenes* do powierzchni hydrofobowej – polistyrenu, koreluje z podwyższonym poziomem ekspresji genu *relA*. Mutant *L. monocytogenes* z insercją w tym genie charakteryzuje się mniejszą zdolnością do adhezji do wspomnianej powierzchni oraz ograniczonym wzrostem po przytwierdzeniu do powierzchni. Co więcej, mutant jest awirulentny w stosunku do myszy, pomimo, że aktywność hemolityczna i skład wydzielanych białek bakterii nie są zmienione. Wynik eksperymentu świadczy o istotnej roli cztero- i pięcioletu guanozyny w rozwoju biofilmu *L. monocytogenes* oraz patogeniczności bakterii [106]. Można podejrzewać, że u innych bakterii Gram-dodatnich, np.: z rodzaju *Clavibacter*, które powodują choroby roślin [72], odpowiedź ścisła również odgrywa istotną rolę w przystosowaniu do niekorzystnych warunków panujących na atakowanych organizmach. Jednym z takich przystosowań jest właśnie tworzenie biofilmu. Zatem ukierunkowanie produkcji środków bakteriobójczych na elementy bakteryjnej odpowiedzi ścisłej wydaje się mieć ogromne znaczenie dla produkcji rolnej.

4.3. Rola odpowiedzi ścisłej w regulacji ruchu mrowiącego bakterii

Ruch mrowiący to zsynchronizowany ruch bakterii posiadających rzęski i znajdujących się w populacji o dużej gęstości, który umożliwia powstałej „tratwie bakteryjnej” przemieszczanie się w środowisku. Stanowi alternatywę dla tworzenia biofilmu, w którym bakterie wykazują obniżoną ruchliwość [55]. Ruch ten u większości bakterii wymaga obecności biosurfaktanta obniżającego napięcie powierzchniowe i umożliwiającego gwałtowną ekspansję kolonii. U populacji bakterii wykonujących ruch mrowiący zauważono podwyższoną oporność na liczne antybiotyki, która wynika nie tylko z faktu bycia w środowisku charakteryzującym się wysokim zagęszczeniem bakterii, ale i z zdolności „ucieczki” z miejsca o wysokim stężeniu substancji antybakteryjnych [14]. Obecność cztero- oraz pięcioletu guanozyny wydaje się być niezbędna do tego, aby bakterie mogły wykonywać ruch mrowiący. Mutanty *P. syringae* pozbawione enzymów odpowiedzi ścisłej nie wykazują ruchu mrowiącego, co prawdopodobnie wynika z braku RelA- i SpoT-zależnej ekspresji genu kodującego białko SalA, które pozytywnie reguluje SyfA oraz SyfR, białka biorące udział w produkcji syringofaktyny, biosurfaktanta istotnego do wykonywania ruchu mrowiącego. Nadekspresja genu *salA* u mutantów *relA*, *spoT* i *relA/spoT* powoduje częściowe przywrócenie zdolności do tego ruchu. Natomiast u bakterii szczepu dzikiego z nadekspresją *salA* obserwuje się wręcz obniżoną zdolność do ruchu mrowiącego, który charakteryzuje się odmienną morfologią. Według badaczy wynika to najprawdopodobniej z tego, że odpowiedź ścisła reguluje ruch mrowiący nie tylko poprzez regulację białka SalA [19]. Mutant *P. syringae* pv. *tomato* DC 3000 *relA/spoT/fprel* również nie ma zdolności do wykonywania ruchu mrowiącego, natomiast mutanty *relA* oraz *relA/spoT* wykazują zredukowaną zdolność do tego ruchu. Komplementacja mutacji genami *relA* lub *fprel* u mutantu *relA/spoT/fprel* częściowo przywraca ruch mrowiący, natomiast, co zaskakujące, komplementacja mutacji *relA/spoT* przez ekspresję genu *relA* lub *spoT* *in trans* skutkuje wystąpieniem bardziej zredukowanego ruchu mrowiącego [20].

5. Podsumowanie

Odpowiedź ścisła jest reakcją bakterii na stres, a jej efektorami są cztero- i pięcioletu guanozyny syntetyzowane przez enzymy RelA, SpoT i RSH. Enzym RelA jest aktywowany w odpowiedzi na niedobór aminokwasów, który objawia się obecnością w komórce deacylowanego tRNA. Enzym SpoT jest białkiem bifunkcyjnym – syntazą i hydrolazą alarmonów odpowiedzi



Ryc. 2. Odpowiedź ścisła i jej zaangażowanie w odpowiedź bakterii na stres

Opis zawarty w podsumowaniu. Pentagon – wpływ pozytywny (p)ppGpp na dany proces, znak zakazu – wpływ negatywny (p)ppGpp na dany proces.

ścisłej (Ryc. 2). Alarmony regulują transkrypcję i towarzyszącą jej naprawę DNA, translację oraz replikację DNA. Nukleotydy te pełnią niezwykle istotną rolę w regulacji procesów fizjologicznych i przystosowaniu bakterii do niekorzystnych warunków środowiska. Może o tym świadczyć wpływ nie tylko na ekspresję bardzo wielu genów ale i na produkcję metabolitów wtórnych. Alarmy odpowiedzi ścisłej biorą udział w regulacji wzrostu komórek, produkcji antybiotyków i sideroforów, indukcji oporności bakterii na H_2O_2 i antybiotyki, syntezie autoinduktorów *quorum sensing*, czyli formie komunikacji i wyczuwania zagęszczenia populacji przez bakterie, a także biosyntezie związków, które wydają się być istotnymi dla tworzenia biofilmu, czyli społeczności bakterii zanurzonej w macierzy zewnątrzkomórkowej, wykazującej podwyższoną oporność na warunki stresowe, czy w regulacji ruchu mrowiącego bakterii (Ryc. 2).

Podziękowania

Pragniemy serdecznie podziękować Recenzentom za okazany wkład merytoryczny oraz wszelkie inne sugestie, które pozwoliły na udoskonalenie niniejszej pracy.

Prace badawcze autorów, których wyniki zainspirowały do napisania niniejszej pracy, są finansowane z funduszy Narodowego Centrum Nauki w Polsce (grant Miniatura 1, 2017/01/X/NZ1/01981; Justyna Boniecka) oraz Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w Polsce [fundusz statutowy Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (Justyna Boniecka, Grażyna B. Dąbrowska) oraz grant badawczy 1189-B (Justyna Boniecka)].

Piśmiennictwo

1. Ancona V., Lee J.H., Chatnaparat T., Oh J., Hong J.-I., Zhao Y.: The bacterial alarmone (p)ppGpp activates the type III secretion system in *Erwinia amylovora*. *J. Bacteriol.* **197**, 1433–1443 (2015)

2. Aranda F.J., Espuny M.J., Marques A., Teruel J.A., Manresa Á., Ortiz A.: Thermodynamics of the interaction of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with phospholipid membranes. *Langmuir*, **23**, 2700–2705 (2007)
3. Atkinson G.C., Tenson T., Haurlyuk V.: The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS One*, **6**, e23479 (2011)
4. Autret S., Levine A., Vannier F., Fujita Y., Séror S.J.: The replication checkpoint control in *Bacillus subtilis*: identification of a novel RTP-binding sequence essential for the replication fork arrest after induction of the stringent response. *Mol. Microbiol.* **31**, 1665–1679 (1999)
5. Barker M.M., Gaal T., Josaitis C.A., Gourse R.L.: Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **305**, 673–688 (2001)
6. Bartlett M.S., Gourse R.L.: Growth rate-dependent control of the *rrnB* P1 core promoter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 5560–5564 (1994)
7. Battesti A., Bouveret E.: Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.* **62**, 1048–1063 (2006)
8. Baysse C., Cullinane M., Déneraud V., Burrowes E., Dow J.M., Morrissey J.P., Tam L., Trevors J.T., O’Gara F.: Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties. *Microbiology*, **151**, 2529–2542 (2005)
9. Bell K.S., Toth I.K. i wsp.: Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11105–11110 (2004)
10. Bergman J.M., Hammarlöf D.L., Hughes D.: Reducing ppGpp level rescues an extreme growth defect caused by mutant EF-Tu. *PLoS One*, **9**, e90486 (2014)
11. Bowden S.D., Eyres A., Chung J.C.S., Monson R.E., Thompson A., Salmond G.P.C., Spring D.R., Welch M.: Virulence in *Pectobacterium atrosepticum* is regulated by a coincidence circuit involving quorum sensing and the stress alarmone, (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* **90**, 457–471 (2013)
12. Brint J.M., Ohman D.E.: Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.* **177**, 7155–7163 (1995)
13. Browning D.F., Busby S.J.W.: Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 638–650 (2016)
14. Butler M.T., Wang Q., Harshey R.M.: Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3776–3781 (2010)
15. Cámara M., Williams P., Hardman A.: Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 667–676 (2002)
16. Cashel M., Gallant J.: Two compounds implicated in function of RC gene of *Escherichia coli*. *Nature*, **221**, 838–841 (1969)
17. Chakraborty R., Bibb M.: The ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J. Bacteriol.* **179**, 5854–5861 (1997)
18. Chakravarty D., Banerjee M., Waghmare N., Ballal A.: Cyanobacterial Mn-catalase ‘KatB’: molecular link between salinity and oxidative stress resistance. *Commun. Integr. Biol.* **9**, e1216738 (2016)
19. Chatnaparat T., Li Z., Korban S.S., Zhao Y.: The bacterial alarmone (p)ppGpp is required for virulence and controls cell size and survival of *Pseudomonas syringae* on plants. *Environ. Microbiol.* **17**, 4253–4270 (2015)
20. Chatnaparat T., Li Z., Korban S.S., Zhao Y.: The stringent response mediated by (p)ppGpp is required for virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and its survival on tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.* **28**, 776–789 (2015)
21. Choudhury P., Flower A.M.: Efficient assembly of ribosomes is inhibited by deletion of *bipA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **197**, 1819–1827 (2015)
22. Dalebroux Z.D., Svensson S.L., Gaynor E.C., Swanson M.S.: ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 171–199 (2010)
23. Dąbrowska G., Prusińska J., Goc A.: Odpowiedź ścisła – mechanizm adaptacyjnej odpowiedzi bakterii na warunki stresowe. *Post. Bioch.* **52**, 87–93 (2006)
24. DeLivron M.A., Robinson V.L.: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium BipA exhibits two distinct ribosome binding modes. *J. Bacteriol.* **190**, 5944–5952 (2008)
25. DeNapoli J., Techranchi A.K., Wang J.D.: Dose-dependent reduction of replication elongation rate by (p)ppGpp in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **88**, 93–104 (2013)
26. Diggle S.P., Winzer K., Chhabra S.R., Worrall K.E., Cámara M., Williams P.: The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol.* **50**, 29–43 (2003)
27. English B.P., Haurlyuk V., Sanamrad A., Tankov S., Dekker N.H., Elf J.: Single-molecule investigations of the stringent response machinery in living bacterial cells. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 365–373 (2011)
28. Feng B., Gao N. i wsp.: Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase. *PLoS Biol.* **12**, e1001866 (2014)
29. Flårdh K., Axberg T., Albertson N.H., Kjelleberg S.: Stringent control during carbon starvation of marine *Vibrio* sp. strain S14: molecular cloning, nucleotide sequence, and deletion of the *relA* gene. *J. Bacteriol.* **176**, 5949–5957 (1994)
30. Flåtten I., Skarstad K.: The Fis protein has a stimulating role in initiation of replication in *Escherichia coli in vivo*. *PLoS One*, **8**, e83562 (2013)
31. Flaviv A.B., Schell M.A., Denny T.P.: An RpoS (σ^s) homologue regulates acylhomoserine lactone-dependent autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* **28**, 475–486 (1998)
32. Flemming H.-C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S.: Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 563–575 (2016)
33. Fuqua W.C., Winans S.C.: A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* **176**, 2796–2806 (1994)
34. Gaal T., Bartlett M.S., Ross W., Turnbrough C.L.Jr., Gourse R.L.: Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science*, **278**, 2092–2097 (1997)
35. Gaca A.O., Colomer-Winter C., Lemos J.A.: Many means to a common end: the intricacies of (p)ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis. *J. Bacteriol.* **197**, 1146–1156 (2015)
36. Gallant J., Palmer L., Pao C.C.: Anomalous synthesis of ppGpp in growing cells. *Cell*, **11**, 181–185 (1977)
37. Gentry D.R., Hernandez V.J., Nguyen L.H., Jensen D.B., Cashel M.: Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^s is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* **175**, 7982–7989 (1993)
38. Goldberg J.B.: *Pseudomonas*: global bacteria. *Trends Microbiol.* **8**, 55–57 (2000)

39. Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infante M.R., Manresa A.: Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBI 40044. *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 316–322 (2003)
40. Hamel E., Cashel M.: Role of guanine nucleotides in protein synthesis. Elongation factor G and guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3250–3254 (1973)
41. Haseltine W.A., Block R.: Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1564–1568 (1973)
42. Hassett D.J., Iglewski B.H. i wsp.: Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* **34**, 1082–1093 (1999)
43. Haugen S.P., Berkmen M.B., Ross W., Gaal T., Ward C., Gourse R.L.: rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of σ region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell*, **125**, 1069–1082 (2006)
44. Haurlyuk V., Atkinson G.C., Murakami K.S., Tenson T., Gerdes K.: Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 298–309 (2015)
45. Hausner M., Wuertz S.: High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3710–3713 (1999)
46. Hesketh A., Sun J., Bibb M.: Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits *actII-ORF4* transcription and actinorhodin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **39**, 136–144 (2001)
47. Hogg T., Mechold U., Malke H., Cashel M., Hilgenfeld R.: Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response. *Cell*, **117**, 57–68 (2004)
48. Huang L., McCluskey M.P., Ni H., LaRossa R.A.: Global gene expression profiles of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 in response to irradiation with UV-B and white light. *J. Bacteriol.* **184**, 6845–6858 (2002)
49. Itikawa H., Fujita H., Wada M.: High temperature induction of a stringent response in the *dnaK* (Ts) and *dnaJ* (Ts) mutants of *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **99**, 1719–1724 (1986)
50. Jayaseelan S., Ramaswamy D., Dharmaraj S.: Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J. Microb. Biot.* **30**, 1159–1168 (2014)
51. Jensen P.Ø., Høiby N. i wsp.: Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing – controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **153**, 1329–1338 (2007)
52. Ji G., Beavis R.C., Novick R.P.: Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12055–12059 (1995)
53. Kalia D., Meray G., Nakayama S., Zheng Y., Zhou J., Luo Y., Guo M., Roembke B.T., Sintim H.O.: Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 305–341 (2013)
54. Kamarthapu V., Epshtein V., Benjamin B., Poroshkin S., Mironov A., Cashel M., Nudler E.: ppGpp couples transcription to DNA repair in *E. coli*. *Science*, **352**, 993–996 (2016)
55. Kearns D.B.: A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 634–644 (2010)
56. Keren I., Shah D., Spoering A., Kaldalu N., Lewis K.: Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 8172–8180 (2004)
57. Khakimova M., Ahlgren H.G., Harrison J.J., English A.M., Nguyen D.: The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance. *J. Bacteriol.* **195**, 2011–2020 (2013)
58. Kołwzan B.: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstania i funkcjonowania. *Ochr. Śr.* **33**, 3–14 (2011)
59. Krasny L., Gourse R.L.: An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription. *EMBO J.* **23**, 4473–4483 (2004)
60. Kriel A., Bittner A.N., Kim S.H., Liu K., Tehranchi A.K., Zou W.Y., Rendon S., Chen R., Tu B.P., Wang J.D.: Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance. *Mol. Cell*, **48**, 231–241 (2012)
61. Kumar V., Chen Y., Ero R., Ahmed T., Tan J., Li Z., See Weng Wong A., Bhushan S., Gao Y.-G.: Structure of BipA in GTP form bound to the ratcheted ribosome. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10944–10949 (2015)
62. Kuźniak E., Urbanek H.: The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses. *Acta Physiol. Plant.* **22**, 195–203 (2000)
63. Laabei M., Jamieson W.D., Lewis S.E., Diggle S.P., Jenkins A.T.A.: A new assay for rhamnolipid detection – important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 7199–7209 (2014)
64. Lang J., Faure D.: Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front. Plant Sci.* DOI:10.3389/fpls.2014.00014 (2014)
65. Leigh J.A., Dodsworth J.A.: Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 349–377 (2007)
66. Levine A., Vannier F., Dehbi M., Henckes G., Séror S.J.: The stringent response blocks DNA replication outside the ori region in *Bacillus subtilis* and at the origin in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **219**, 605–613 (1991)
67. Loveland A.B., Bah E., Madireddy R., Zhang Y., Brilot A.F., Grigorieff N., Korostelev A.A.: Ribosome•RelA structures reveal the mechanism of stringent response activation. *Elife*, **5**, e17029 (2016)
68. Maciąg-Dorszyńska M., Szalewska-Pałasz A., Węgrzyn G.: Different effects of ppGpp on *Escherichia coli* DNA replication *in vivo* and *in vitro*. *FEBS Open Bio.* **3**, 161–164 (2013)
69. Martins D., McKay G., Sampathkumar G., Khakimova M., English A.M., Nguyen D.: Superoxide dismutase activity confers (p)ppGpp mediated antibiotic tolerance to stationary-phase *Pseudomonas aeruginosa*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 9797–9802 (2018)
70. McKnight S.L., Iglewski B.H., Pesci E.C.: The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**, 2702–2708 (2000)
71. Mechold U., Potrykus K., Murphy H., Murakami K.S., Cashel M.: Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **41**, 6175–6189 (2013)
72. Metzler M.C., Laine M.J., De Boer S.H.: The status of molecular biological research on the plant pathogenic genus *Clavibacter*. *FEMS Microbiol. Lett.* **150**, 1–8 (1997)
73. Molodtsov V., Sineva E., Zhang L., Huang X., Cashel M., Ades S.E., Murakami K.S.: Allosteric effector ppGpp potentiates the inhibition of transcript initiation by DksA. *Mol. Cell*, **69**, 1–12 (2018)
74. Murakami K.S.: X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} . *J. Biol. Chem.* **288**, 9126–9134 (2013)
75. Ng W.-L., Bassler B.L.: Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 197–222 (2009)
76. Nguyen D., Singh P.K. i wsp.: Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, **334**, 982–986 (2011)

77. Okada Y., Makino S., Tobe T., Okada N., Yamazaki S.: Cloning of *rel* from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1541–1547 (2002)
78. Passador L., Cook J.M., Gambello M.J., Rust L., Iglewski B.H.: Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*, **260**, 1127–1130 (1993)
79. Paul B.J., Berkmen M.B., Gourse R.L.: DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 7823–7828 (2005)
80. Pearson J.P., Gray K.M., Passador L., Tucker K.D., Eberhard A., Iglewski B.H., Greenberg E.P.: Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 197–201 (1994)
81. Pearson J.P., Passador L., Iglewski B.H., Greenberg E.P.: A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1490–1494 (1995)
82. Pearson J.P., Pesci E.C., Iglewski B.H.: Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **179**, 5756–5767 (1997)
83. Petrova O., Gorshkov V., Daminova A., Ageeva M., Moleleki L.N., Gogolev Y.: Stress response in *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 under starvation conditions: adaptive reactions at a low population density. *Res. Microbiol.* **165**, 119–127 (2014)
84. Pingoud A., Block W.: The elongation factor Tu•guanosine tetraphosphate complex. *Eur. J. Biochem.* **116**, 631–634 (1981)
85. Potrykus K., Cashel M.: (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Microbiol.* **62**, 35–51 (2008)
86. Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.O.: Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* **7**, 493–512 (2015)
87. Raskin D.M., Judson N., Mekalanos J.J.: Regulation of the stringent response is the essential function of the conserved bacterial G protein CgtA in *Vibrio cholerae*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4636–4641 (2007)
88. Rasmussen T.B., Givskov M.: Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 149–161 (2006)
89. Rocha E.R., Smith C.J.: Regulation of *Bacteroides fragilis katB* mRNA by oxidative stress and carbon limitation. *J. Bacteriol.* **179**, 7033–7039 (1997)
90. Ross W., Sanchez-Vazquez P., Chen A.Y., Lee J.-H., Burgos H.L., Gourse R.L.: ppGpp binding to a site at the RNAP-DksA interface accounts for its dramatic effects on transcription initiation during the stringent response. *Mol. Cell*, **62**, 811–823 (2016)
91. Ross W., Vrentas C.E., Sanchez-Vazquez P., Gaal T., Gourse R.L.: The magic spot: a ppGpp binding site on *E. coli* RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Mol. Cell*, **50**, 420–429 (2013)
92. Ruffing A.M., Chen R.R.: Transcriptome profiling of a curdland-producing *Agrobacterium* reveals conserved regulatory mechanisms of exopolysaccharide biosynthesis. *Microb. Cell Fact.* DOI:10.1186/1475-2859-11-17 (2012)
93. Rumbaugh K.P., Griswold J.A., Hamood A.N.: The role of quorum sensing in the *in vivo* virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.* **2**, 1721–1731 (2000)
94. Rymer R.U., Solorio F.A., Techranchi A., Chu C., Corn J.E., Keck J.L., Wang J.D., Berger J.M.: Nucleotide-bound structures of the DnaG catalytic core reveal how metal•NTP substrates are bound during primer synthesis and blocked by stringent response alarmones. *Structure*, **20**, 1478–1489 (2012)
95. Sánchez M., Aranda F.J., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa Á., Ortiz A.: Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Colloid Interf. Sci.* **341**, 240–247 (2010)
96. Schuster M., Hawkins A.C., Harwood C.S., Greenberg E.P.: The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol. Microbiol.* **51**, 973–985 (2004)
97. Seyfzadeh M., Keener J., Nomura M.: *spoT*-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11004–11008 (1993)
98. Shyp V., Tankov S., Ermakov A., Kudrin P., English B.P., Ehrenberg M., Tenson T., Elf J., Haurlyuk V.: Positive allosteric feedback regulation of the stringent response enzyme RelA by its product. *EMBO Rep.* **13**, 835–839 (2012)
99. Silo-Suh L., Suh S.-J., Sokol P.A., Ohman D.E.: A simple alfalfa seedling infection model for *Pseudomonas aeruginosa* strains associated with cystic fibrosis shows AlgT (σ -22) and RhlR contribute to pathogenesis. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15699–15704 (2002)
100. Solomon J.M., Lazazzera B.A., Grossman A.D.: Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **10**, 2014–2024 (1996)
101. Sonenshein A.L.: CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 203–207 (2005)
102. Srivatsan A., Wang J.D.: Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 100–105 (2008)
103. Steinchen W., Bange G.: The magic dance of the alarmones (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* **101**, 531–544 (2016)
104. Strugeon E., Tilloy V., Ploy M.-C., Da Re S.: The stringent response promotes antibiotic resistance dissemination by regulating integron integrase expression in biofilms. *MBio.* **7**, e00868-16 (2016)
105. Suh S.-J., Silo-Suh L., Woods D.E., Hassett D.J., West S.E.H., Ohman D.E.: Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**, 3890–3897 (1999)
106. Taylor C.M., Beresford M., Epton H.A.S., Sigeo D.C., Shama G., Andrew P.W., Roberts I.S.: *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. *J. Bacteriol.* **184**, 621–628 (2002)
107. Trigui H., Dudyk P., Oh J., Hong J.-I., Faucher S.P.: A regulatory feedback loop between RpoS and SpoT supports the survival of *Legionella pneumophila* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 918–928 (2015)
108. Van Delden C., Comte R., Bally M.: Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **183**, 5376–5384 (2001)
109. Vinella D., Albrecht C., Cashel M., D’Ari R.: Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **56**, 958–970 (2005)
110. Walker T.S., Bais H.P., Déziel E., Schweizer H.P., Rahme L.G., Fall R., Vivanco J.M.: *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol.* **134**, 320–331 (2004)
111. Wang J.D., Sanders G.M., Grossman A.D.: Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell*, **128**, 865–875 (2007)
112. Wendrich T.M., Blaha G., Wilson D.N., Marahiel M.A., Nierhaus K.H.: Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol. Cell*, **10**, 779–788 (2002)

113. Winzer K., Williams P.: Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 131–143 (2001)
114. Xiao H., Kalman M., Ikehara K., Zemel S., Glaser G., Cashel M.: Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem.* **266**, 5980–5990 (1991)
115. Zhang H.-B., Wang C., Zhang L.-H.: The quorumone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* **52**, 1389–1401 (2004)
116. Zulianello L., Canard C., Köhler T., Caille D., Lacroix J.-S., Meda P.: Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **74**, 3134–3147 (2006)
117. Zuo Y., Wang Y., Steitz T.A.: The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Mol. Cell*, **50**, 430–436 (2013)

ESCHERICHIA COLI O ROZSIANYM TYPIE ADHEZJI

Michał Turniak, Beata Sobieszkańska*

Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu

Wpłynęło w styczniu, zaakceptowano w marcu 2019 r.

Streszczenie: Dyfuzyjno-adherentne szczepy *Escherichia coli* (DAEC) są jednym z siedmiu chorobotwórczych patowarów odpowiedzialnych za zakażenia przewodu pokarmowego u ludzi. DAEC są zróżnicowaną grupą szczepów, wytwarzających liczne adhezyny fimbrialne i afimbrialne, które warunkują chorobotwórczość tych szczepów *E. coli* oraz ich specyficzny, rozsiały typ adhezji do komórek nabłonka. Izolaty DAEC są wykrywane nie tylko u ludzi, ale także u różnych grup zwierząt (psów, cieląt, bydła, drobiu, świń). Duże zróżnicowanie genów kodujących adhezyny utrudnia wykrywanie zakażeń wywołanych przez DAEC, co przyczynia się do pomijania tych patogenów w rutynowej diagnostyce zakażeń przewodu pokarmowego i moczowego.

1. Wprowadzenie. 2. Rodzina adhezyn Afa/Dr. 3. Podział szczepów DAEC. 4. Inne czynniki wirulencji DAEC. 5. Chorobotwórczość DAEC. 5.1. Zakażenia układu moczowego. 5.2. Zakażenia przewodu pokarmowego. 6. Odpowiedź immunologiczna z zakażeniami DAEC. 7. Patomechanizm zakażeń DAEC. 7.1. Internalizacja DAEC. 8. Epidemiologia zakażeń szczepami DAEC. 9. Diagnostyka. 10. Podsumowanie

DIFFUSELY ADHERING ESCHERICHIA COLI

Abstract: Diffusely adhering *E. coli* strains (DAEC) is one of the seven pathovars of pathogenic *E. coli* causing intestinal infections in humans. DAEC is a diverse group of strains producing fimbrial or afimbrial adhesins that are responsible for their pathogenicity specific diffuse adherence pattern to epithelial cells. DAEC isolates are detected not only in humans, but also in various groups of animals (dogs, calves, cattle, poultry, pigs). Large variation of genes encoding adhesins contributes to the omission of DAEC in the routine diagnosis of gastrointestinal and urinary tract infections.

1. Introduction. 2. Afa/Dr family of adhesins. 3. Division of DAEC strains. 4. Other virulence factors of DAEC. 5. Pathogenicity of DAEC. 5.1. Urinary tract infections. 5.2. Gastrointestinal tract infections. 6. Immunological response in DAEC infections. 7. Pathomechanism of infections caused by DAEC. 7.1. Internalization of DAEC. 8. Epidemiology of DAEC. 9. Diagnosis. 10. Summary

Słowa kluczowe: dyfuzyjno-adherentne *E. coli*, DAEC, operony *afa/dr/daa*, biegunka, zakażenia układu moczowego

Key words: diffusely adhering *E. coli*, DAEC, *afa/dr/daa* operons, diarrhea, urinary tract infection

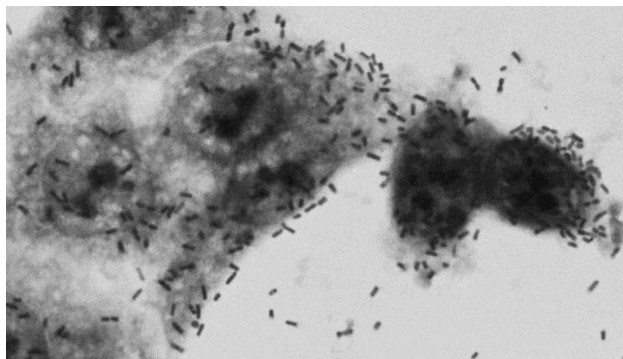
1. Wprowadzenie

Pałeczka okrężnicy – *Escherichia coli* jest fakultatywnym beztlenowcem wchodzącym w skład mikrobiota okrężnicy człowieka. Organizm ten kolonizuje jelita noworodków już w pierwszych godzinach życia. Większość pałeczek *E. coli* jest nieszkodliwa a jej występowanie ogranicza się do przewodu pokarmowego. Tym nie mniej, u osób osłabionych, u chorych z immunosupresją, a także w wyniku naruszenia bariery nabłonka jelita nawet te niepatogenne szczepy *E. coli* mogą powodować pozajelitowe zakażenia u ludzi np. zakażenia dróg moczowych, krwi, ran i inne. Obok niepatogennych szczepów *E. coli* kolonizujących jelito człowieka, duża grupa szczepów jest patogenna dla ludzi i zwierząt [18, 61]. Patogenne pałeczki *E. coli* obejmują szczepy związane z zakażeniami przewodu pokarmowego oraz szczepy wywołujące zakażenia poza przewodem pokarmowym. Szczepy *E. coli* odpowiedzialne za zakażenia jelit w zależności od wytwarzanych przez nie czynników

wirulencji podzielone zostały na następujące patowary: enteropatogenne *E. coli* (EPEC), *E. coli* wytwarzające toksynę Shiga (STEC) wraz podgrupą enterokrwtoczących *E. coli* (EHEC), enteroinwazyjne *E. coli* (EIEC), enteroagregacyjne *E. coli* (EAEC), enterotoksynogenne *E. coli* (ETEC), adherentno-inwazyjne *E. coli* (AIEC) oraz dyfuzyjno-adherentne *E. coli* (DAEC). Szczepy *E. coli* wywołujące zakażenia pozajelitowe (ExPEC; Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*), obejmują uropatogenne szczepy *E. coli* (UPEC; Uropathogenic *Escherichia coli*) odpowiedzialne za zakażenia układu moczowego oraz szczepy *E. coli* (NMEC; Neonatal Meningitis *Escherichia coli*), posiadające otoczkę K1, które wywołują zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych u noworodków [20, 38].

Szczepy DEAC są niezwykle heterogenną grupą potencjalnie patogennych *E. coli*, które cechuje rozsiały typ adhezji DA (Diffuse Adherence) do komórek nabłonka, niezależnie od typu wytwarzanych adhezyn należących do rodziny adhezyn Afa/Dr (Ryc. 1).

* Autor korespondencyjny: prof. dr hab. Beata Sobieszkańska; Katedra i Zakład Mikrobiologii; Wydział Lekarski; Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu; ul. Chałubińskiego 4; 50-367 Wrocław; tel. 71 784 13 08; e-mail: beata.sobieszkańska@umed.wroc.pl



Ryc. 1. Dyfuzyjny typ adhezji do komórek nabłonka raka krtani HEP-2. Preparat barwiony metodą Giemsa. Powiększenie 100x.

2. Rodzina adhezyn Afa/Dr

Rodzina adhezyn Afa/Dr obejmuje adhezyny fimbrialne, swoiste dla patotypu DAEC tj. fimbrie Dr i F1845, a także adhezyny spokrewnione z adhezynami swoistymi dla patotypu EAEC tj. fimbrie AAF-I, AAF-II, AAF-III i HdaA oraz adhezyny niefimbrialne (AfaE-I, AfaE-22, AfaE-III, AfaE-V, AfaE-VII, AfaE-VIII, Dr-II i NFA-1) (Tab. I) [63, 76, 77]. Adhezyna AfaE-VII występuje u szczepów DAEC izolowanych od bydła, natomiast AfaE-VIII u szczepów izolowanych od ludzi i zwierząt. Z kolei fimbrie agregacyjne AAF-I, AAF-II i AAF-III typowe dla patowaru EAEC stanowią daleko spokrewnione adhezyny rodziny Afa/Dr. Receptorem dla wielu adhezyn Afa/Dr jest czynnik przyspieszający rozpad hDAF (CD55) (human Decay-Accelerating Factor). Ponadto, adhezyny AfaE-III, Dr i F1845 łączą się z ludzkimi cząstkami antygenów rakowo- płodowych hCEACAM-1 i hCEACAM-6 (human Carcinoembryo-

genic Antigen related Cell Adherence Molecules) oraz CEA (Carcinoembryogenic Antigen), który również jest receptorem dla adhezyny NFA-1. Dodatkowo, adhezyna Dr łączy się z kolagenem typu IV. Nieznany jest natomiast receptor dla adhezyny AfaE-VIII [51] (Ryc. 2).

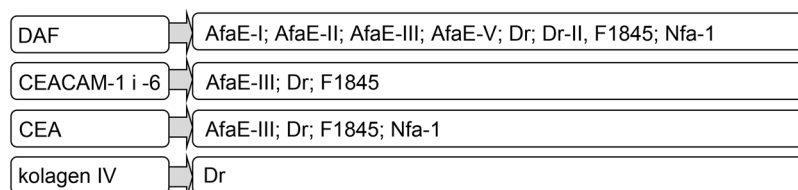
Operony kodujące adhezyny Afa, Dr i F1845 tj. operony *afa*, *dra* i *daa* mają podobną organizację genetyczną i składają się z co najmniej pięciu, konserwatywnych w rodzinie adhezyn Afa/Dr genów (*a-d*), które kodują białka pomocnicze oraz zróżnicowanego genu *afaE*, który koduje właściwe białko adhezyjne AfaE [76]. Dotychczas zostały szczegółowo przebadane pod kątem organizacji genetycznej, rozpoznawanych receptorów i roli w patogenezie zakażeń wywoływanych u ludzi tylko adhezyny AfaE-I, AfaE-III, Dr, Dr-II oraz F1845.

AfaE-I jest afimbrialną adhezyną typowych szczepów DAEC, którą po raz pierwszy opisano u szczepu *E. coli* KS52 izolowanego z przypadku zakażenia układu moczowego. AfaE-I występuje również u szczepów DAEC odpowiedzialnych za biegunki. Adhezyna ta wykazuje mannozo-oporną hemaglutynację i jest w 32% identyczna pod względem sekwencji aminokwasów z adhezyną Dr. Adhezynę identyczną w 98% pod względem sekwencji amonikowasów z adhezyną AfaE-I opisano ponadto u prototypowego szczepu reprezentującego EPEC, określonego na podstawie typu elektroforetycznego jako typ ET5, który zaliczono do atypowych DAEC. Typ ET5 obejmuje serotypy *E. coli* O55:H- i O55:H7. Poza zdolnością dyfuzyjnej adhezji, szczepy należące do typu ET5 mają geny wirulencji typowe dla EPEC. Są to geny związane ze zdolnością do indukowania zmian histopatologicznych w komórkach nabłonka tzw. AE (Attaching Effacing), polegających na zatarciu struktury mikrokosmków, które są podobne

Tabela I
Rodzina adhezyn Afa/Dr

Adhezyna	Typ	Gospodarz szczepów	Kolagen typu IV ¹	hDAF ²	hCEACAM ³ , CEA ⁴
AfaE-I	afimbrialna	człowiek	-	+	-
AfaE-II	afimbrialna	człowiek	nie określono	+	nie określono
AfaE-III	afimbrialna	człowiek	-	+	+
AfaE-V	afimbrialna	człowiek	nie określono	+	nie określono
AfaE-VII	afimbrialna	bydło	nie określono	-	nie określono
AfaE-VIII	afimbrialna	ludzie, zwierzęta	nie określono	-	nie określono
Dr	fimbrie	człowiek	+	+	+
Dr-II	afimbrialna	człowiek	-	+	-
F1845	fimbrie	człowiek	-	+	+
NFA-1	afimbrialna	człowiek	nie określono	+	nie określono
AAF-I – AAF-III	fimbrie	człowiek	nie określono	nie określono	nie określono
HdaA	fimbrie	człowiek	nie określono	nie określono	nie określono

¹ kolagen typu IV jest podstawowym składnikiem strukturalnym macierzy pozakomórkowej blaszki podstawnej, na której rezydują komórki nabłonka, wytwarzanych przez komórki nabłonka; ² hDAF (ang. decay accelerating factor) czynnik przyspieszający rozpad; ³ hCEACAM-1 i hCEACAM-6 antygeny rakowo- płodowe (ang. human carcinoembryogenic antigen related cell adherence molecules) oraz ⁴ CEA (ang. carcinoembryogenic antigen). Na podstawie [68].



Ryc. 2. Receptory dla adhezyn szczepów DAEC patogennych dla ludzi

do tych indukowanych adhezją EPEC. U EPEC zmiany typu AE warunkują zlokalizowany typ adhezji LA (Localized Adherence), stąd typ ET5 prezentuje mieszany typ adhezji LA-DA [40, 76].

Afimbrialna adhezyna AfaE-III DAEC po raz pierwszy opisana została u szczepu *E. coli* A30 odpowiedzialnego za zakażenie układu moczowego [51]. Adhezyna ta wykazuje 98% homologii pod względem sekwencji aminokwasów z adhezyną Dr, ale w przeciwieństwie do niej warunkuje adhezję do komórek nabłonka, hamowaną przez chloramfenikol. Ponadto, zespół genów kodujących AfaE-III jest blisko spokrewniony z operonem *daa*, kodującym fimbrie F1845. Produkty genów *afaA* oraz *afaF* operonu *afa-3* są homologiczne z białkami PapI-PapB UPEC [23].

Dr adhezyna kodowana jest przez zespół genów operonu *dra*, który warunkuje mannozo-oporną adhezję tych szczepów do komórek nabłonka. Prototypowym szczepem *E. coli*, u którego opisano adhezynę Dr jest szczep IH11128 (O75:K5:H-). Z kolei adhezynę Dr-II opisano po raz pierwszy u szczepu *E. coli* EC7372 izolowanego z przypadku kłębuszkowego zapalenia nerek. Adhezyna Dr-II wykazuje tylko 20% podobieństwo z adhezynami rodziny Afa/Dr, ale aż 96% homologię sekwencji aminokwasów z adhezyną NFA-1, występującą wśród szczepów *E. coli* odpowiedzialnych za zakażenie układu moczowego. Tym niemniej, pomimo niskiego stopnia podobieństwa adhezyny Dr-II i adhezyn Afa/Dr, oba typy adhezyn cechuje podobna organizacja genetyczna operonów kodujących te antygeny. Dodatkowo, szczep EC7372 posiada wyspę patogenności PAI (Pathogenicity Island) podobną do PAI_{CF1073} swoistej dla UPEC wraz z genami kodującymi hemolizynę HlyA oraz operony kodujące fimbrie Pap. W przeciwieństwie do innych *E. coli* Afa/Dr-dodatnich, szczep EC7372 indukuje apoptozę i nekrozę komórek nabłonka [30, 70, 76].

Adhezyna fimbrialna F1845 szczepów DAEC odpowiada za rozsiały typ adhezji szczepu *E. coli* C1845, który izolowano z przypadku dziecięcej, przewlekłej biegunki. Badania szczepu C1845 na modelu zwierzęcym wykazały, że indukuje on zanik komórek nabłonka okrężnicy u prosiąt [7]. Operon kodujący fimbrie F185 obejmuje 5 genów *daaA*, *daaB*, *daaC*, *daaD* i *daaE* zlokalizowanych na plazmidzie lub na chromosomie u szczepów DAEC podobnych do *E. coli* C1845 a odpowiedzialnych za biegunki. Adhezyna F1845 jest w 57% identyczna pod

względem sekwencji aminokwasów z fimbriami Dr [6, 48]. W 1989 r. Bilge i wsp. [7] opracowali diagnostyczną sondę DNA dla patotypu DAEC, która zawiera fragment genu *daaC*, należącego do operonu kodującego fimbrie F1845. Sonda ta jednakże identyfikuje tylko część szczepów DAEC, a min. szczepy wytwarzające adhezyny należące do rodziny Afa/Dr, m.in. fimbrie F1845. Ponadto, sonda *daaC* hybryduje krzyżowo z genem *aafC*, kodującym fimbrie agregacyjne AAF-II. Dodatkowo, wykazano dodatnią hybrydyzację sondy *daaC* z niewielkim odsetkiem szczepów niewykazujących adhezji do komórek nabłonka [7]. Tym niemniej, badania epidemiologiczne z sondą DNA *daaC* wykazały związek szczepów Afa/Dr DAEC z biegunkami u dzieci powyżej 2 roku życia [76]. Pomimo, że swoistość tej sondy jest oceniana na ponad 95%, jej czułość wynosi tylko ok. 60%. Według badań Scaletsky i wsp. [73] czułość sondy *daaC* w teście hybrydyzacji 185 szczepów *E. coli* o rozsiałym typie adhezji wynosiła 64,3%. Z kolei Lozer i wsp. [55] porównali częstość wykrywania szczepów patotypu DAEC metodą hybrydyzacji z sondą *daaC* oraz w reakcji PCR z genami kodującymi adhezyny *afa*. Patotyp DAEC badacze ci potwierdzili u 19,1% spośród 560 badanych szczepów *E. coli* za pomocą sondy *daaC* oraz u 25,5% szczepów w reakcji PCR.

Adhezyna AIDA-I jest autotransportowym białkiem błony zewnętrznej o m.c. 100 kDa, które po raz pierwszy zostało opisane u szczepu *E. coli* O126:H27, izolowanego z przypadku biegunki niemowlęcej przez Benz i wsp. [5]. Białko AIDA-I jest antygenem trójskładnikowym, złożonym z funkcjonalnej α -domeny, która pośredniczy w swoistym wiązaniu *E. coli* z komórką gospodarza oraz translokatora β (AIDA^c) [42, 43, 44, 62]. Ekspresja AIDA-I zależy od aktywności dwóch plazmidowych genów tj. *aida*, który koduje białko prekursorowe o m.c. 132 kDa potranslacyjnie modyfikowane przez produkt genu *aah* (autotransporter adhesin heptosyltransferase) do dojrzałej glikoproteiny AIDA-I [44]. Po sekrecji AIDA-I pozostaje niekovalentnie związana z powierzchnią bakterii. Zdolność AIDA-I do samoskupiania się w agregaty spowodowała, że białko to zaliczono do nowej grupy białek autotransportowych oznaczonych jako SAATs (self-associating autotransporters), która poza AIDA-I obejmuje antygen ag43 odpowiedzialny za autoagregację licznych, patogennych i niepatogennych szczepów *E. coli* oraz

TibA, adhezyne-inwazyjne ETEC [16]. Poza adhezją do komórek nabłonka AIDA-I zaangażowana jest w formowanie biofilmu przez pałeczki *E. coli* [78].

Poza patowarem DAEC adhezyne AIDA-I wykryto u innych, patogennych szczepów *E. coli* m.in. ETEC, wytwarzających enterotoksynę ciepłostalą STb oraz u szczepów patotypu STEC, wytwarzających toksynę shiga Stx2 i fimbrie F18. Obecność AIDA-I stwierdzono także wśród atypowych szczepów EPEC [22, 76, 80]. Receptorem dla adhezyny AIDA-I jest N-glikozylowana glikoproteina pg119, obecna na wielu typach komórek ludzkich i zwierzęcych [44]. Szczepy DAEC AIDA-I-dodatnie odpowiedzialne są za biegunki u niemowląt. Adhezja do komórek nabłonka jelita za pośrednictwem AIDA-I stymuluje u bakterii syntezę i sekrecję do cytozolu komórki gospodarza białek efektorowych EspA, EspB i EspD, które indukują reorganizację białek cytoszkieletu komórki połączoną z akumulacją aktywny pod przylegającymi *E. coli*. Powstałe zmiany histopatologiczne w komórkach nabłonka przypominają zmiany A/E indukowane adhezją EPEC, stąd szczepy posiadające tę adhezyne zaliczane są do patowaru EPEC [76, 77].

3. Podział szczepów DAEC

Na podstawie prezentowanych adhezyn oraz ich receptorów szczepy DAEC podzielone zostały na dwie podstawowe grupy tj. typowe DAEC, które wiążą się z receptorem hDAF oraz atypowe DAEC, które nie wiążą czynnika hDAF. Każda z tych grup jest podzielona na dwie podklasy. Typowe DAEC podklasy 1, obejmują szczepy posiadające adhezyny Afa/Dr, które wiążą się z antygenem CEA (Afa/Dr_{CEA}) tj. szczepy Afa-III, Dr oraz F1845. Druga podklasa typowych DAEC obejmuje szczepy nie wiążące się z antygenem CEA tj. szczepy AfaE-I oraz Dr-II. Atypowe DAEC podklasy 1 obejmują szczepy prezentujące adhezyny AfaE-VII, AfaE-VIII, AAF-I, AAF-II oraz AAF-III. Druga podklasa atypowych DAEC posiada adhezyny Afa/Dr oraz

inne, które prezentują rozsiany typ adhezji DA. Do tej grupy zaliczane są szczepy DA-EPEC, prezentujące adhezyne AIDA-I oraz posiadające wyspę patogenności homologiczną do wyspy patogenności LEE (locus of enterocyte effacement) EPEC oraz typ ET5, który również posiada wyspę patogenności LEE i adhezyne AfaE-I [76]. (Ryc. 3.)

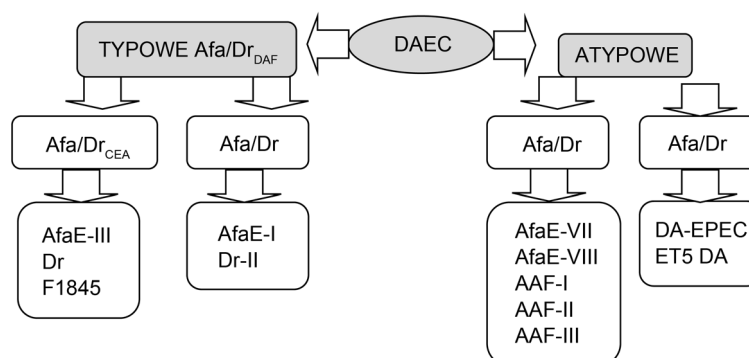
4. Inne czynniki wirulencji szczepów DAEC

Wiele szczepów patowaru DEAC posiada liczne geny kodujące systemy wychwyty jonów żelaza. Prawie połowa tych szczepów wykazuje obecność genu *irp2* należącego do operonu kodującego jersiniobaktyne tj. siderofor swoisty dla pałeczek z rodzaju *Yersinia*. Ponadto, wśród izolatów DAEC wykazano gen *icuB*, który jest częścią operonu kodującego aerobaktyne tj. siderofor syntetyzowany przez niektóre szczepy *E. coli* oraz pałeczki *Shigella*, następnie gen *shuA* operonu umożliwiającego wykorzystywanie hemu, który swoiście występuje u pałeczek *Shigella* oraz gen *iroN*, kodujący siderofor katecholowy salmochelinę, powszechny wśród pałeczek *E. coli* odpowiedzialnych za zakażenia krwi oraz zakażenia układu moczowego. Dodatkowo, niektóre szczepy DAEC posiadają gen *modD* należący do operonu kodującego system transportu molibdenu [9, 22, 76]. Wiele szczepów DAEC wykazuje ponadto zdolność syntezy toksyny Sat, należącej do podrodziny autotransportowych proteaz serynowych rodziny *Enterobacteriaceae* SPATE (Secreted Autorporter Toxin of *Enterobacteriaceae*) [31].

5. Chorobotwórczość szczepów DAEC

5.1. Zakażenia układu moczowego

Afa/Dr DAEC odpowiadają za 25–50% przypadków zapalenia pęcherza moczowego u dzieci i 30% przypadków odmiedniczkowego zapalenia nerek u dorosłych,



Ryc. 3. Schemat podziału szczepów *E. coli* o rozsiannym typie adhezji

szczególnie kobiet w ciąży [76, 77]. Ponadto, szczepy *E. coli* prezentujące adhezyny Dr związane są z dwukrotnie wyższym ryzykiem nawrotu zakażenia układu moczowego, co sugeruje ich udział w nawracających lub chronicznych zakażeniach tego układu [51].

5.2. Zakażenia przewodu pokarmowego

Afa/Dr-dodatnie *E. coli* wywołują biegunki u dzieci między 2 a 5 rokiem życia. Ograniczenie występowania biegunek do tej grupy wiekowej może być spowodowane strukturalną i funkcjonalną niedojrzałością jelitowej bariery nabłonka i brakiem mechanizmów obronnych [77]. Szczepy te nie powodują biegunek u osób dorosłych, nawet u ochotników, którym podano doustnie dziki, patogenny szczep C1845. Tym niemniej, *E. coli* posiadające geny *daaC* i *afaBC* izolowane są częściej niż od osób zdrowych od osób z chorobą Crohna oraz rakiem okrężnicy [72]. Szczepy *afa-1*-dodatnie izolowane od tych chorych wykazują adhezję i inwazję do zróżnicowanych komórek nabłonka, a także indukują zwiększoną ekspresję mRNA czynnika wzrostu komórek śródbłonka VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), promującego neoangiogenezę w guzach nowotworowych. Ponadto, część szczepów *afaC*-dodatnich posiada genotoksyczną wyspę patogenności *pks*, niosącą geny kodujące zdolność syntezy kolibaktyny tj. genotoksyny uszkadzającej DNA komórek gospodarza. Dodatkowo szczepy te nierzadko prezentują fimbrie LpfA (Long polar fimbria), umożliwiające translokację bakterii w stanie nietkniętym przez komórki M błony śluzowej jelit oraz geny kodujące białka stresu HtrA i DsbA, które umożliwiają *E. coli* przeżywanie w makrofagach. Oba te geny są swoiście związane z patotypem AIEC występującym u osób z chorobą Crohna [13, 14, 58, 64].

6. Odpowiedź immunologiczna w zakażeniach DAEC

Zakażenie szczepami DAEC indukuje silną odpowiedź immunologiczną. Betis i wsp. [64] w badaniach *in vitro* wykazali, że adhezja szczepów Afa/Dr DEAC do spolaryzowanych komórek nabłonka jelita za pośrednictwem receptora hDAF stymuluje uwalnianie IL-8 do przestrzeni podstawno-bocznych, co indukuje migrację leukocytów wielojądrzastych PMNL (Polymorphonuclear Leukocytes) przez nabłonek jelita [75]. Migracja PMNL przez warstwę nabłonka związana jest z sekrecją cytokin TNF α oraz IL-1 β przez enterocyty. Wydzielane cytokiny prozapalne zwiększają z kolei ekspresję czynnika hDAF na powierzchni enterocytów, wzmagając w ten sposób adhezję DAEC. Hardin i wsp. [34] wykazali, że IL-1 β przyczynia się do zmian fizjologicznych nabłonka jelita pod wpływem zapale-

nia indukowanego zakażeniem. Cytokina ta bowiem stymuluje sekrecję anionów, hamuje absorpcję jonów Na⁺ i Cl⁻ oraz zależy od transportera jonów sodu i glukozy SGLT-1 (Sodium-Glucose Transport protein-1) transport glukozy, co ostatecznie przyczynia się do rozwoju biegunki. Brest i wsp. [12] wykazali natomiast, że choć szczepy DAEC indukują napływ neutrofilów w błonie śluzowej jelit, są znacznie słabiej fagocytowane przez leukocyty w porównaniu z niepatogennym, kontrolnym szczepem *E. coli* DH5 α . Zakażenie PMNL szczepami Afa/Dr indukuje spontaniczną apoptozę większości leukocytów, charakteryzującą się zmianami morfologicznymi jądra komórkowego, fragmentacją DNA, aktywacją kaspaz oraz wysoką ekspresją aneksyny V. Rekombinowane szczepy *E. coli*, którym wprowadzono geny kodujące adhezyny Afa/Dr (Afa-I, Afa-III, Dr i F1845), choć przylegają do neutrofilów nie są przez nie pochłaniane. Badania te sugerują, że interakcja *E. coli* Afa/Dr z PMNL zwiększa wirulencję tych szczepów poprzez indukcję apoptozy leukocytów i obniżanie ich zdolności fagocytarnych [12]. Tieng i wsp. [82] przedstawili dowody na wpływ adhezji DAEC i ich interakcji z receptorem hDAF na pobudzenie nieswoistej odpowiedzi immunologicznej za pośrednictwem cząstek MICA (MHC class I polypeptide-related sequence). MICA są homologami antygenów zgodności tkankowej klasy I (MHC-I), występującymi na komórkach nabłonka jelita i stanowią ligandy dla receptorów komórek zaangażowanych w nieswoistą, wrodzoną odpowiedź immunologiczną tj. limfocytów T γ δ , komórek CD8+, limfocytów T α β oraz komórek NK. Interakcja DAEC z receptorem hDAF zwiększa ekspresję cząstek MICA, co z kolei pobudza sekrecję interferonu γ (IFN γ) przez komórki NK (natural kiler), zwiększając stan zapalny nabłonka jelita. Łącząc się z hDAF szczepy Afa/Dr DAEC aktywują szlaki sygnałowe angażujące kinazy białkowe Erk/MAP, co pobudza komórki nabłonka do syntezy i sekrecji IL-8 [15]. Dodatkowo, interakcja szczepów DEAC z receptorem hDAF indukuje wzrost ekspresji i syntezy bioaktywnego czynnika wzrostu komórek śródbłonka VEGF przez komórki nabłonka. Badania epidemiologiczne wskazują, iż szczepy Afa/Dr często kolonizują błonę śluzową jelita chorych na nieswoiste zapalenie jelit oraz chorych z gruczolakorakiem okrężnicy, choć ich rola w rozwoju tych chronicznych chorób jelit pozostaje niewyjaśniona [57].

7. Patomechanizm zakażeń szczepami DAEC

Yamamoto i wsp. [85] po raz pierwszy zaobserwowali zmiany w cytoszkieletcie komórek nabłonka Hela, zachodzące pod wpływem adhezji DAEC. Następnie Peiffer i wsp. [69] wykazali, że interakcja szczepu C1845

z receptorem hDAF na powierzchni komórek nabłonka promuje wydłużanie mikrokosmków a procesowi temu towarzyszy wzrost przepuszczalności nabłonka i zmiany dystrybucji białek ciasnych połączeń. Część DAF zawiera cztery domeny SCR, region seryna/treonina oraz część glikozylofosfatydyloinozytolową zakotwiczącą hDAF w błonie komórkowej. Domena SCR-3, która odpowiada za ochronne działanie hDAF przed toksycznym działaniem kaskady dopełniacza wobec komórek, jest również receptorem wiążącym adhezyny Dr. Interakcja z DAEC z hDAF indukuje akumulację cząstek hDAF pod przylegającymi bakteriami, co aktywuje kaskadę sygnałów angażujących kinazy tyrozynowe, fosfolipazę C γ , 3-kinazę 3 fosfotydyloinozytolu (PI3K), kinazę C oraz prowadzi do wewnątrzkomórkowego wzrostu stężenia jonów wapnia. Wzrost stężenia jonów wapnia moduluje konformację białek cytoszkieletu rąbka szczoteczki poprzez zależne od wapnia białka wiążące włókna aktyny tj. wilinę i fimbrynę. Wilina jest zaangażowana w organizację aktyny i przy niskim stężeniu jonów wapnia wiąże filamenty aktyny. Jednak, wzrost stężenia jonów wapnia indukuje fragmentację wiliny, co z kolei prowadzi do depolimeryzacji F-aktyny w szczytowej części mikrokosmków. Redystrybucji białek cytoszkieletu komórkowego towarzyszy obniżenie ekspresji aktywności enzymów trawiennych rąbka szczoteczki tj. sacharozy-izomaltazy (SI), dipeptydylopeptydazy IV (DPPIV) oraz transporterów glukozy (SGLT-1) i fruktozy (GLUT-5), mogące prowadzić do rozwoju biegunki [4, 28, 51, 68, 69]. Zdaniem badaczy konsekwencją patofizjologiczną obserwowanych zjawisk może być zmiana gradientu elektrochemicznego nabłonka jelita skutkująca rozwojem biegunki lub indukcją odpowiedzi immunologicznej. Badania Taddei i wsp. [81] wykazały, że za reorganizację białek ciasnych połączeń tj. ZO-1, ZO-3 oraz okludyny, pełniące kluczową rolę w uszczelnianiu połączenia między komórkami nabłonka odpowiada ugrupowanie serynowe toksyny Sat. Guignot i wsp. [31] wykazali, że większość, bo 88% szczepów DAEC związanych z zakażeniami układu moczowego, a także około 46% szczepów DAEC odpowiedzialnych za biegunki u dzieci posiada gen *sat*, kodujący tą toksynę [31]. Genu kodującego toksynę Sat badacze ci nie wykazali jednak u szczepów DAEC izolowanych od dzieci zdrowych.

Z kolei badania Selvarangan i wsp. [74] na modelu mysim wykazały, że wiązanie DAEC z kolagenem ma zasadnicze znaczenie w patomechanizmie chronicznego zapalenia kłębuszków nerkowych. Mutanty izogeniczne pozbawione antygeny DraE, a tym samym zdolności wiązania z kolagenem, choć nadal zdolne do wiązania czynnika hDAF, są szybko usuwane z nerek zwierząt, w przeciwieństwie do dzikiego szczepu rodzicielskiego DraE-dodatniego. Szczepy Dr-dodatnie wykazują tropizm do błon podstawnych kłębuszków nerkowych

i zdolność wywoływania przewlekłego zapalenia nerek. Nowicki i wsp. [63] wykazali, że zakażenie dróg moczowych szczepem Afa/Dr IH11128 prowadziło do znacznych zmian histopatologicznych, odpowiadających atrofii kanalików nerkowych, śródmiąższowemu zapaleniu nerek oraz włóknieniu mięszu nerek. Zakażenia układu moczowego wywoływane przez szczepy DAEC mogą być szczególnie niebezpieczne dla kobiet w ciąży. Na eksperymentalnym modelu mysim chronicznego zapalenia kłębuszków nerkowych wywołanym przez szczepy Dr-dodatnie, Kaul i wsp. [39] wykazali, że prawie 90% ciężarnych samic myszy zakażonych szczepem Dr-dodatnim rodziła potomstwo przedterminowo w porównaniu do 10% myszy zakażonych szczepami *E. coli* nie posiadającymi adhezyny Dr.

7.1. Internalizacja DAEC

Operon Afa/Dr koduje m.in. adhezyny AfaD i DraD, pełniące równocześnie rolę inwazyjnych w procesie internalizacji DAEC przez komórki nabłonka na drodze niezależnej od receptorów komórkowych hDAF oraz CEACAM5, ale angażującej kalweoliny, dynamiczne mikrotubule oraz interakcję z integryną $\alpha 5\beta 1$ [9]. Czynniki wirulencji biorące udział w internalizacji DAEC zostały poznane jedynie częściowo. Wyniki badań wskazują, że poza inwazyjną AfaD, ważną rolę w procesie internalizacji DAEC przez komórki nabłonka odgrywa adhezyna DraE fimbrii Dr [63]. Oczyszczone fimbrie Dr opłaszczony na polistyrenowych kulkach pobudzają klasteryzację receptorów i akumulację aktyny w miejscach adhezji nośnika antygeny Dr do komórki nabłonka, poprzedzając ich internalizację. Internalizację nośników opłaszczonych antygenem Dr hamują przeciwciała IgG skierowane przeciwko antygenowi Dr. Dodatkowo zaobserwowano, że wewnątrzkomórkowe *E. coli* posiadające antygen Dr nie wpływają na funkcjonalne różnicowanie się enterocytów. Według badań Guignot i wsp. [32] wewnątrzkomórkowe szczepy Dr-dodatnie tworzą skupiska wewnątrz wakuoli, w których bakterie przeżywają w stanie „uśpienia”. Takie wewnątrzkomórkowe skupiska prawdopodobnie stanowią rezerwuuar *E. coli* w nawracających i chronicznych zakażeniach układu moczowego [32].

Inną inwazyjną opisaną u szczepów Afa/Dr jest konserwatywne wśród ludzkich szczepów *E. coli* Afa-dodatnich białko AfaD. Podobnie jak AfaE, białko AfaD jest ekspozowane na powierzchni komórki bakteryjnej, ale w przeciwieństwie do AfaE, może złuszczać się z powierzchni bakterii i podlegać internalizacji przez komórki gospodarza. Rolę AfaD w procesie inwazyjności szczepów Afa/Dr potwierdziły badania z zastosowaniem poliwęglowego nośnika opłaszczony antygenem AfaD, który był internalizowany przez komórki

nabłonka. AfaD uznana została za prototyp rodziny inwazyj, która obejmuje także białko AggB syntetyzowane przez szczepy EAEC [24].

8. Epidemiologia zakażeń szczepami DAEC

Epidemiologia szczepów DAEC odpowiedzialnych za biegunki pozostaje słabo poznana z uwagi na brak powszechnie dostępnych laboratoryjnych metod identyfikacji tych szczepów. Tym niemniej, szczepy DAEC zidentyfikowano jako czynnik etiologiczny biegunki u dzieci w Chile [45], Meksyku [25], Brazylii [54], Peru [65], Iranie [1], Kolumbii [29], Stanach Zjednoczonych [17]. Ponadto, szczepy DAEC wykryto u dzieci z biegunką w Tajlandii [21], Bangladeszu [3], Japonii [59, 84], Chinach [52], Nowej Kaledonii [26], Australii [33] oraz w krajach afrykańskich [66, 67, 83] i europejskich np. w Wielkiej Brytanii [41] i Francji [37, 71]. Szczepy DAEC równie często jak od dzieci z biegunką izolowane są od zdrowych dzieci i dorosłych, co utrudnia jednoznaczne ustalenie ich roli jako czynnika etiologicznego zakażeń przewodu pokarmowego. Dotychczas nieznanym jest także rezerwuuar szczepów DAEC i drogi ich transmisji. W nielicznych badaniach obecność szczepów DAEC potwierdzono w próbkach wody pitnej [36] oraz próbkach wody z systemów irygacyjnych [2]. Brak także danych na temat częstości występowania szczepów DAEC prezentujących adhezyny AfaE-I – AfaE-III, Dr oraz F1845 u zwierząt. Szczepy DEAC posiadające adhezyny afimbrialne AfaE-VII i AfaE-VIII wykryto natomiast u cieląt z biegunką lub posocznicą [47, 48]. Szczepy *afa-8*-dodatnie oraz szczepy posiadające geny powiązane z operonem *afa/dr* zidentyfikowano wśród izolatów *E. coli* od świń, drobiu i bydła [26, 35, 49, 50, 56], ale brak dowodów wskazujących na ich transmisję od zwierząt na człowieka.

9. Diagnostyka

Pomimo, że związek szczepów DAEC z zakażeniami, szczególnie dróg moczowych, znany jest od dawna, DAEC są pomijane w rutynowej diagnostyce zakażeń przewodu pokarmowego i moczowego. Jest to związane z ogromną różnorodnością genotypową tych szczepów. Fenotypowo znakomita większość szczepów DAEC prezentuje mannozo-oporny, rozsiany typ adhezji do komórek nabłonka [10, 60, 61]. Jednakże test adhezji *in vitro* jest czasochłonny oraz dość kosztowny, stąd nie jest stosowany w rutynowej diagnostyce. Poza tym, rozsiany typ adhezji mogą prezentować także inne patotypy *E. coli* [11, 46], co wyklucza jego zastosowanie w rutynowej diagnostyce. Testy molekularne z uwagi na niezwykłą różnorodność adhe-

zyn prezentowanych wśród szczepów DEAC również wydają się mało przydatne w rutynowej diagnostyce. Tym niemniej, badania epidemiologiczne oraz badania potencjału chorobotwórczego szczepów DAEC są podejmowane w ramach badań naukowych na całym świecie. Do badań genetycznych DAEC opracowano liczne sondy i startery pozwalające na wykrywanie powszechnych wśród tych szczepów adhezyn rodziny Afa/Dr np. *daaC*, *daaE*, *afaB* i *afaC* [7, 50]. Niestety, ostatnie badania dowodzą, że niektóre z opracowanych sond np. sonda *daaC*, powszechnie wykorzystywana do wykrywania szczepów Afa/Dr, reaguje krzyżowo ze szczepami EAEC, które również wywołują biegunkę, co ogranicza jej zastosowanie [54, 79]. Dodatkowym utrudnieniem diagnostyki zakażeń szczepami DAEC jest ich rozpowszechnienie wśród osób zdrowych.

10. Podsumowanie

Szczepy DAEC związane są z biegunkami u małych dzieci oraz zakażeniami układu moczowego. Chorobotwórczość oraz rozsiany typ adhezji tej grupy *E. coli* dyktują swoiste adhezyny fimbrialne i afimbrialne, reagujące z szerokim wachlarzem receptorów na powierzchni komórek nabłonka gospodarza. W licznych badaniach potwierdzono prozapalny wpływ adhezji DEAC na nabłonek jelita. Najnowsze dane wskazują na możliwy udział szczepów DAEC w procesie rozwoju raka jelita grubego oraz chorobie Leśniowskiego-Crohna. Z drugiej strony, szczepy DAEC są równie często jak od osób chorych, izolowane od osób zdrowych, co sugeruje, że potencjał patogenny tej grupy *E. coli* w dużym stopniu zależy od wytwarzanych przez nie czynników wirulencji oraz wieku zakażonych osób. Brak powszechnie dostępnych metod diagnostycznych utrudnia prawidłowe rozpoznawanie zakażeń wywoływanych przez DAEC, a tym samym możliwość leczenia, co w przypadku niektórych zakażeń np. układu moczowego, może prowadzić do poważnych następstw klinicznych.

Piśmiennictwo

1. Abbasi P., Kargar M., Doosi A., Mardareh J., Ghorbani-Dalini S., Dehyadegari M.A.: Molecular detection of diffusely adherent *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in Shiraz, Iran. *Arch. Pediatr. Infect. Dis.* 5, e37629 (2017)
2. Aijuka M., Santiago A.E., Giron J.A., Nataro J.P., Buys E.M.: Enteroaggregative *Escherichia coli* is the predominant diarrheagenic *E. coli* pathotype among irrigation water and food sources in South Africa. *Int. J. Food Microbiol.* 278, 44–51 (2018)
3. Baqui A.H., Sack R.B., Black R.E., Haider K., Hossain A., Alim A.R., Yunus M., Chowdhury H.R., Siddique A.K.: Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladeshi children less than 5 years of age. *J. Infect. Dis.* 166, 792–796 (1992)

4. Bernet-Camard M.F., Coconnier M.H., Hudault S., Servin A.L.: Pathogenicity of the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845: F1845 adhesin-decay accelerating factor interaction, brush border microvillus injury, and actin disassembly in cultured human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**, 1918–1928 (1996)
5. Benz I., Schmidt M.A.: Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126: H27). *Infect. Immun.* **60**, 13–18 (1992).
6. Bétis F., Brest P., Hofman V., Guignot J., Bernet-Camard M.F., Rossi B., Servin A., Hofman P.: The Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* stimulate interleukin-8 secretion, activate mitogen activated protein kinases, and promote polymorphonuclear transepithelial migration in T84 polarized epithelial cells. *Infect. Immun.* **71**, 1068–1074 (2003)
7. Bilge S.S., Clausen C.R., Lau W., Moseley S.L.: Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J. Bacteriol.* **171**, 4281–4289 (1989)
8. Bilge S.S., Apostol J.M., Fullner K.J., Moseley S.L.: Transcriptional organization of the F1845 fimbrial adhesin determinant of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **7**, 993–1006 (1993)
9. Blanc-Potard A.B., Tinsley C., Scaletsky I., Le Bouguenec C., Guignot J., Servin A.L., Nassif X., Bernet-Camard M.F.: Representational difference analysis between Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* and nonpathogenic *E. coli* K12. *Infect. Immun.* **70**, 5503–5511 (2002)
10. Bouzari S., Jafari A., Farhoudi-Moghaddam A.A., Shokouhi F., Parsi M.: Adherence of non-enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *J. Med. Microbiol.* **40**, 95–97 (1994)
11. Bouzari S., Jafari M.N., Shokouhi F., Parsi M., Jafari A.: Virulence-related sequences and adherence patterns in strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **185**, 89–93 (2000)
12. Brest P., Bétis F., Cuburu N., Selva E., Herrant M., Servin A., Auberger P., Hofman P.: Increased rate of apoptosis and diminished phagocytic ability of human neutrophils infected with Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* **72**, 5741–5749 (2004)
13. Bringer M.A., Barnich N., Glasser A.L., Bardot O., Darfeuille-Michaud A.: HtrA stress protein is involved in intramacrophagic replication of adherent, invasive *Escherichia coli* strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* **73**, 712–721 (2005)
14. Bringer M.A., Rolhion N., Glasser A.L., Darfeuille-Michaud A.: The oxidoreductase DsbA plays a key role in the ability of the Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 to resist macrophage killing. *J. Bacteriol.* **189**, 4860–4871 (2007)
15. Cane G., Ginouves A., Marchetti S., Busca R., Pouyssegur J., Berra E., Hofman P., Vouret-Craviari V.: HIF-1 α mediates the induction of IL-8 and VEGF expression on infection with Afa/Dr diffusely adhering *E. coli* and promotes EMT-like behavior. *Cell. Microbiol.* **12**, 640–653 (2010)
16. Charbonneau M.E., Mourez M.: Functional organization of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J. Bacteriol.* **189**, 9020–9029 (2007)
17. Cohen M.B., Nataro J.P., Bernstein D.I., Hawkins J., Roberts N., Staat M.A.: Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. *J. Pediatr.* **146**, 54–61 (2005)
18. Croxen M.A., Law R.J., Scholz R., Keeney K.M., Wlodarska M., Finlay B.B.: Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 822–880 (2013)
19. Cruz Spano L., da Cunha K.F., Monfardini M.V., de Cassia Bergamashi Fonesca R., Scaletsky I.C.: High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in Southeastern Brazil. *BMC Infect. Dis.* **17**, 773 (2017)
20. Darfeuille-Michaud A., Boudeau J., Bulois P., Neut C., Glasser A.L., Barnich N., Bringer M.A., Swidsinski A., Beaugerie L., Colombel J.F.: High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterol.* **127**, 412–421 (2004)
21. Echeverria P., Serichantalerg O., Changchawalit S., Baudry B., Levine M.M., Orskov F., Orskov I.: Tissue culture-adherent *Escherichia coli* in infantile diarrhea. *J. Infect. Dis.* **165**, 141–143 (1992)
22. Escobar-Paramo P., Clermont O., Blanc-Potard A.B., Bui H., Le Bouguenec C., Denamur E.: A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1085–1094 (2004)
23. Garcia M.I., Labigne A., Le Bouguenec C.: Nucleotide sequence of the afimbrial-adhesin-encoding *afa-3* gene cluster and its translocation via flanking IS1 insertion sequences. *J. Bacteriol.* **176**, 7601–7613 (1994).
24. Garcia M.I., Jouve M., Nataro J.P., Gounon P., Le Bouguenec C.: Characterization of the AfaD-like family of invasins encoded by pathogenic *Escherichia coli* associated with intestinal and extra-intestinal infections. *FEBS Lett.* **479**, 111–117 (2000)
25. Girón J.A., Jones T., Millán-Velasco F., Castro-Muñoz E., Zárate L., Fry J., Frankel G., Moseley S.L., Baudry B., Kaper J.B.: Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. *J. Infect. Dis.* **163**, 507–513 (1991)
26. Gerardin J., Lalioui L., Jacquemin E., Le Bouguenec C., Mainil J.G.: The *afa*-related gene cluster in necrotogenic and other *Escherichia coli* from animals belongs to the *afa-8* variant. *Vet. Microbiol.* **76**, 175–184 (2000)
27. Germani Y., Begaud E., Duval P., Le Bouguenec C.: Prevalence of enteropathogenic, enteroaggregative, and diffusely adherent *Escherichia coli* among isolates from children with diarrhea in New Caledonia. *J. Infect. Dis.* **174**, 1124–1126 (1996)
28. Goluszko P., Selvarangan R., Popov V., Pham T., Wen J.W., Singhal J.: Decay-accelerating factor and cytoskeleton redistribution pattern in HeLa cells infected with recombinant *Escherichia coli* strains expressing Dr family of adhesins. *Infect. Immun.* **67**, 3989–3997 (1999)
29. Gómez-Duarte O.G., Arzuza O., Urbina D., Bai J., Guerra J., Montes O., Puello M., Mendoza K., Castro G.Y.: Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from children's diarrheal stools in two Caribbean-Colombian cities. *Foodborne Pathog. Dis.* **7**, 199–206 (2010)
30. Guignot J., Peiffer I., Bernet-Camard M.F., Lublin D.M., Carnoy C., Moseley S.L., Servin A.L.: Recruitment of CD55 and CD66e brush border-associated glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by members of the Afa/Dr diffusely adhering family of *Escherichia coli* that infect the human polarized intestinal Caco-2/TC7 cells. *Infect. Immun.* **68**, 3554–3563 (2000).
31. Guignot J., Chaplais C., Cocounier-Polter M.H., Servin A.L.: The secreted autotransporter toxin, Sat, function as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **9**, 204–221 (2007)
32. Guignot J., Hudault S., Kansau I., Chau I., Servin A.L.: Human decay-accelerating factor and CEACAM receptor-mediated internalization and intracellular lifestyle of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* in epithelial cells. *Infect. Immun.* **77**, 517–531 (2009)

33. Gunzburg S.T., Chang B.J., Elliott S.J., Burke V., Gracey M.: Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia. *J. Infect. Dis.* **167**, 755–758 (1993)
34. Hardin J., Kroeker K., Chung B., Gall D.G.: Effect of pro-inflammatory interleukins on jejunal nutrient transport. *Gut*, **47**, 184–191 (2000)
35. Hur J., Jeon B.W., Kim Y.J., Oh I.G., Lee J.H.: *Escherichia coli* isolates from calf diarrhea in Korea and their virulent genetic characteristics. *J. Vet. Med. Sci.* **75**, 519–522 (2013)
36. Igwaran A., Iweriebor B.C., Okoh A.I.: Molecular characterization and antimicrobial resistance pattern of *Escherichia coli* recovered from wastewater treatment plants in Eastern Cape South Africa. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15**, 1237 (2018)
37. Jallat C., Livrelli V., Darfeuille-Michaud A., Rich C., Joly B.: *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2031–2037 (1993)
38. Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L.: Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–140 (2004)
39. Kaul A.K., Kumar D., Nagamani M., Goluszko P., Nowicki S., Nowicki B.J.: Rapid cyclic changes in density and accessibility of endometrial ligands for *Escherichia coli* Dr fimbriae. *Infect. Immun.* **64**, 611–615 (1996)
40. Keller R., Ordóñez J.G., de Oliveira R.R., Trabulsi L.R., Baldwin T.J., Knutton S.: Afa, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **70**, 2681–2689 (2002)
41. Knutton S., Shaw R., Phillips A.D., Smith H.R., Willshaw G.A., Watson P., Price E.: Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **33**, 32–40 (2001)
42. Konieczny M.P., Suhr M., Noll A., Autenrieth I.B., Schmidt M.A.: Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides inducing functional epitopes by the AIDA autotransporter system. *Pathog. Dis.* **27**, 321–332 (2000)
43. Konieczny M.P., Benz I., Hollinderbaumer B., Beinke C., Niederweis H., Schmidt M.A.: Molecular organization of the AIDA autotransporter translocator: the N-terminal β 1-domain is surface-exposed and stabilizes the transmembrane β 2-domain. *Antonie van Leeuwenhoek*, **80**, 19–34 (2001)
44. Laarmann S., Schmidt M.A.: The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesion recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiol.* **149**, 1871–1888 (2003)
45. Levine M.M., Ferreccio C., Prado V., Cayazzo M., Abrego P., Martinez J., Maggi L., Baldini M.M., Martin W., Maneval D.: Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.* **138**, 849–869 (1993)
46. Labigne-Roussel A.F., Lark D., Schoolnik G., Falkow S.: Cloning and expression of an afimbrial adhesin (AFA-I) responsible for P blood group-independent, mannose-resistant hemagglutination from a pyelonephritic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* **46**, 251–259 (1984)
47. Lalioui L., Jouve M., Gounon P., Le Bouguenec C.: Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves. *Infect. Immun.* **67**, 5048–5059 (1999)
48. Lalioui L., Le Bouguenec C.: *Afa-8* gene cluster is carried by a pathogenicity island inserted into the tRNA(Phe) of human and bovine pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Infect. Immun.* **69**, 937–948 (2001)
49. Le Bouguenec C.: Diarrhea-associated diffusely adherent *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 180–181 (1999)
50. Le Bouguenec C., Garcia M.I. i wsp. Characterization of AfaE adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *Escherichia coli* isolates: PCR assays for detection of Afa adhesins that do or do not recognize Dr blood group antigens. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1738–1745 (2001)
51. Le Bouguenec C., Servin A.L.: Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* **256**, 185–194 (2006)
52. Li D., Shen M., Xu Y., Liu C., Wang W., Wu J., Luo X., Jia X., Ma Y.: Virulence gene profiles and molecular genetic characteristics of diarrheagenic *Escherichia coli* from a hospital in Western China. *Gut Pathog.* **10**, 35 (2018)
53. Loomis W.P., Moseley S.L.: Translational control of mRNA processing in the F1845 fimbrial operon of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **30**, 843–853 (1998)
54. Lopes L.M., Fabbriotti S.H., Ferreira A.J., Kato M.A., Michalski J., Scaletsky I.C.: Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 1968–1972 (2005)
55. Lozer D.M., Souza T.B., Monfardari M.V., Vincentini F., Kitagawa S.S., Scaletsky I.C., Spano L.C.: Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. *BMC Infect. Dis.* **13**, 418 (2013)
56. Mainil J.G., Jacquemin E., Herault F., Oswald E.: Presence of *pap*-, *sfa*-, and *afa*-related sequences in necrotizing *Escherichia coli* isolates from cattle: evidence for new variants of the AFA family. *Can. J. Vet. Res.* **61**, 193–199 (1997)
57. Martin H.M., Campbell B.J., Hart C.A., Mpofo C., Nayar H., Singh R., Englyst H., Williams H.F., Rhodes J.M.: Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterol.* **127**, 80–93 (2004)
58. Martínez-Medina M., García-Gil L.J.: *Escherichia coli* in chronic inflammatory bowel disease: an update on adherent-invasive *Escherichia coli* pathogenicity. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **5**, 213–227 (2014)
59. Meraz I.M., Arikawa K., Nakamura H., Ogasawara J., Hase A., Nishikawa Y.: Association of IL-8-inducing strains of diffusely adherent *Escherichia coli* with sporadic diarrheal patients with less than 5 years of age. *Braz. J. Infect. Dis.* **11**, 44–49 (2007)
60. Nataro J.P., Kaper J.B., Robins-Browne R., Prado V., Vial P., Levine M.M.: Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **6**, 829–831 (1987)
61. Nataro J.P., Kaper J. B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 142–201 (1998)
62. Niewerth U., Voss T., Frey A., Le Bouguenec C., Baljer G., Franke S., Schmidt M.A.: The AIDA autotransporter system is associated with F18 and Stx2e in *E. coli* isolates derived from pigs suffering from edema disease and postweaning diarrhea. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**, 143–149 (2001)
63. Nowicki B., Svanborg-Eden C., Hull R., Hull S.: Molecular analysis and epidemiology of the Dr hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **57**, 446451 (1989)
64. O'Brien C.L., Bringer M.-A., Holt K.E., Gordon D.M., Dubois A.L., Barnich N., Darfeuille-Michaud A., Pavoli P.: Comparative genomics of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut* **0**, 1–8 (2016)
65. Ochoa T.J., Lanata C.F. i wsp. Detection of the CS20 colonization factor antigen in diffuse-adhering *Escherichia coli* strains. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **60**, 186–189 (2010)
66. Okeke I.N., Lamikanra A., Steinruck H., Kaper J.B.: Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood

- diarrhea in provincial southwestern Nigeria. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 7–12 (2000)
67. Okeke I.N.: Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. *J. Infect. Dev. Ctries.* **3**, 817–842 (2009)
 68. Peiffer I., Servin A.L., Bernet-Camard M.F.: Piracy of decay accelerating factor (CD55) signal transduction by the diffusely adhering strain *Escherichia coli* C1845 promotes cytoskeletal F-actin rearrangements in cultured human intestinal INT407 cells. *Infect. Immun.* **66**, 4036–4042 (1998)
 69. Peiffer I., Blanc-Potard A.B., Bernet-Camard M.F., Guignot J., Barbat A., Servin A.L.: Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* C1845 infection promotes selective injuries in the junctional domain of polarized human intestinal Caco-2/TC7 cells. *Infect. Immun.* **68**, 3431–3442 (2000)
 70. Pham T.Q., Goluszko P., Popov V., Nowicki S., Nowicki B.J.: Molecular cloning and characterization of Dr-II, a nonfimbrial adhesin-I-like adhesin isolated from gestational pyelonephritis-associated *Escherichia coli* that binds to decay-accelerating factor. *Infect. Immun.* **65**, 4309–4318 (1997)
 71. Poirineau P., Forestier C., Meyer M., Jallat C., Rich C., Malpuech G., De Champs C.: Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1961–1962 (1995)
 72. Prorok-Hamon M., Campbell B.J. i wsp.: Colonic mucosa-associated diffusely adherent *afaC+* *Escherichia coli* expressing *lpfA* and *pks* are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut*, **63**, 761–770 (2014)
 73. Scaletsky I.C., Michalski J., Torres A.G., Deuguer M.V., Kaper J.B.: Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesin found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **73**, 4753–4765 (2005)
 74. Selvarangan R., Goluszko P., Singhal J., Carnoy C., Moseley S., Hudson B., Nowicki S., Nowicki B.: Interaction of Dr adhesin with collagen type IV is a critical step in *Escherichia coli* renal persistence. *Infect. Immun.* **72**, 4827–4835 (2004)
 75. Semiramo N., Gleizes A., Turbica I., Sandre C., Martin-Esteban V., Gorges R., Servin A., Choller-Matin S.: Afa/Dr-expressing, diffusely adhering *Escherichia coli* strain C1845 triggers F1845 fimbria-dependent phosphatidyserine externalization on neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through an apoptosis-independent mechanism. *Infect. Immun.* **78**, 2974–2983 (2010)
 76. Servin A.L.: Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 264–292 (2005).
 77. Servin A.L.: Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 823–869 (2014)
 78. Sherlock O., Schembri M.A., Reisner A., Klemm A.: Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J. Bacteriol.* **186**, 8058–8065 (2004)
 79. Snelling A.M., Macfarlane-Smith L.R., Fletcher J.N., Okeke I.N.: The commonly-used DNA probe for diffusely-adherent *Escherichia coli* cross-reacts with a subset of enteroaggregative *E. coli*. *BMC Microbiol.* **9**, 269 (2009)
 80. Spano L.C., Sadovsky A.D., Segui P.N., Saick K.W., Kitagawa S.M., Pereira F.E., Fagundes-Neto U., Scaletsky I.C.: Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhea. *J. Med. Microbiol.* **57**, 359–363 (2008)
 81. Taddei C.R., Fasano A., Ferreria A.J., Trabulsi L.R., Martinez M.B.: Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**, 263–269 (2005)
 82. Tieng V., Le Bouguéne C., du Merle L., Bertheau P., Desreumaux P., Janin A., Charron D., Toubert A.: Binding of *Escherichia coli* adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2977–2982 (2002)
 83. Valentiner-Branth P., Steinsland H., Fischer T.K., Perch M., Scheutz F., Dias F., Aaby P., Molbak K., Sommerfelt H.: Cohort study of Guinean children: incidence, pathogenicity, conferred protection, and attributable risk for enteropathogens during the first 2 years of life. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4238–4245 (2003)
 84. Wang L., Zhang S., Zheng D., Fujikara S., Wakabayashi A., Okahata K., Suzuki M., Saeki A., Nakamura H., Hara-Kudo Y., Kage-Nakadai E., Nishikawa Y.: Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in food and fecal specimens obtained from cattle, pigs, chickens, asymptomatic carriers, and patients in Osaka and Hyogo, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **70**, 464–469 (2017)
 85. Yamamoto T., Koyama Y., Matsumoto M., Sonoda E., Nakayama S., Uchimura M., Paveenkittiporn W., Tamura K., Yokota T., Echeverria P.: Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. *J. Infect. Dis.* **166**, 1295–1310 (1992)

LYSSAVIRUS SPP. – WIRUSY WŚCIEKLIZNY JAKO WCIĄŻ AKTUALNY PROBLEM

Przemysław Gałązka¹, Patryk Kaczor^{2*}, Klaudyna Grzelakowska², Kamil Leis²

¹ Oddział Kliniczny Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Dzieci i Młodzieży, Szpital Uniwersytecki nr 1 im. dr Antoniego Jurasza, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

² Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wpłynęło we wrześniu 2018 r., zaakceptowano w kwietniu 2019 r.

Streszczenie: Rodzaj *Lyssavirus* spp. obejmuje obecnie 14 gatunków, które odpowiedzialne są za wywoływanie wścieklizny oraz chorób wścieklizno-podobnych i wścieklizno-pokrewnych. Pierwsze objawy infekcji przypominają przeziębienie i obejmują głównie gorączkę, ból głowy i ogólne przemęczenie. Następnie dochodzi do dysfunkcji mózgu i ostrych objawów neurologicznych, a ostatecznie – w większości przypadków – do śmierci. Lyssawirusy rozprzestrzeniają się przede wszystkim przez bezpośredni kontakt ze zwierzęciem stanowiącym rezerwuuar wirusowy. Złotym standardem w diagnostyce jest metoda bezpośredniej immunofluorescencji, za pomocą której wykrywane są antygeny wirusowe, głównie w ślinie chorego. Obecnie, do leczenia wścieklizny stosuje się eksperymentalną terapię przeprowadzaną zgodnie z protokołem Milwaukee.

1. Wstęp. 2. Systematyka. 2.1. *Lagos bat virus*. 2.2. *Mokola virus*. 2.3 *Duvenhage virus*. 2.4. *European bat lyssavirus* typ 1. 2.5. *European bat lyssavirus* typ 2. 2.6. *Australian bat lyssavirus*. 3. Charakterystyka. 3.1. Budowa molekularna. 3.2. Genom i ekspresja genów. 3.3. Cykl replikacyjny. 4. Chorobotwórczość. 4.1. Patogeneza. 4.2. Objawy wścieklizny. 5. Prewencja, profilaktyka, diagnostyka, leczenie. 5.1. Szczepienia. 5.2. Profilaktyka po-ekspozycyjna. 5.3. Diagnostyka. 5.4. Leczenie eksperymentalne. 6. Podsumowanie

LYSSAVIRUS SPP. – RABIES VIRUSES AS A STILL-PRESENT PROBLEM

Abstract: The genus *Lyssavirus* spp. currently includes 14 species that are responsible for causing rabies and rabies-like and rabies-related diseases. The first symptoms of infection are similar to a cold and include mainly fever, headache and general fatigue. Then comes brain dysfunction and acute neurological symptoms, and ultimately – in most cases – death. Lyssaviruses are spread mainly through direct contact with the carrier constituting the viral reservoir. The gold standard in diagnostics is the method of direct immunofluorescence, by means of which viral antigens are detected, mainly in the saliva of a patient. Currently, rabies treatment is an experimental therapy according to the Milwaukee protocol.

1. Introduction. 2. Systematics. 2.1. *Lagos bat virus*. 2.2. *Mokola virus*. 2.3 *Duvenhage virus*. 2.4. *European bat 1 lyssavirus*. 2.5. *European bat 2 lyssavirus*. 2.6. *Australian bat lyssavirus*. 3. Characteristics. 3.1. Molecular structure. 3.2. Genome and gene expression. 3.3. Life cycle. 4. Pathogenicity. 4.1. Pathogenesis. 4.2. Rabies symptoms. 5. Prevention, prophylaxis, diagnostics, treatment. 5.1. Vaccinations. 5.2. Post-exposure prophylaxis. 5.3. Diagnostics. 5.4. Experimental treatment. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Lyssavirus* spp., protokół Milwaukee, wirusy wścieklizno-podobne, wirusy wścieklizny, wścieklizna

Key words: *Lyssavirus* spp., Milwaukee protocol, rabies-related viruses, rabies viruses, rabies

1. Wstęp

Rodzaj *Lyssavirus*, należący do rodziny *Rhabdoviridae* (Rabdowirusy) i rzędu *Mononegavirales*, obejmuje występującego globalnie wirusa wścieklizny oraz kilkanaście gatunków wirusów wścieklizno-podobnych i wścieklizno-pokrewnych [29, 59, 65]. Wywołują one chorobę powszechnie nazywaną „wścieklizną”. Nazwa ta wywodzi się od łacińskiego *rabies* (ta z kolei od *rabhas* z indyjskiego języka sanskryt – „stosować przemoc”), co tłumaczy się jako „wściekłość”, ponieważ chorobę tę cechuje agresja oraz uczucie podniecenia. Patologia ta nazywana jest także czasami „wodowstrętem” od łacińskiego *hydrophobia*, co nawiązuje do jednego z objawów

tej choroby – mimowolnych skurczów mięśni na widok lub dźwięk wody [45, 46].

W roku 1931 w Indiach Zachodnich, 6 lat przed pierwszym wyizolowaniem wirusa Zachodniego Nilu (WNV – *West Nile virus*) [49], Joseph Lennox Pawan w mózgu nietoperza przejawiającego zachowania odbiegające od reszty ssaków tego samego gatunku odkrył ciała Negriego. Rok później stwierdził on, że zainfekowane nietoperze-wampiry z podrodziny *Desmodontinae* mogą przenosić wściekliznę na ludzi oraz zwierzęta [38, 39]. Choroba ta stanowi przykład klasycznej zoonozy, która rozprzestrzenia się z udziałem zwierząt na ludzi dwiema drogami. Pierwszą z nich, stanowiącą typ tzw. miejski, roznoszą przede wszystkim psy.

* Autor korespondencyjny: Patryk Kaczor, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz; tel. 52 585-40-15; e-mail: patryk.kaczor97@gmail.com

Z kolei typ tzw. leśny rozprowadzany jest przez dziko żyjące zwierzęta – głównie szopy, skunksy, nietoperze, lisy i borsuki. Czynnikiem sprawczym agresywnego zachowania zainfekowanych zwierząt jest *Lyssavirus*, co ułatwia jego dalsze rozprzestrzenianie się [32].

2. Systematyka

Jeszcze około 60 lat temu do rodzaju *Lyssavirus* zaliczano tylko jednego wirusa wścieklizny – RABV (*Rabies virus*), jednak badania z użyciem przeciwciał poliklonalnych przy użyciu metody krzyżowej seroneutralizacji wskazały na zróżnicowanie antygenowe izolowanych od zakażonych nietoperzy wirusów, co doprowadziło do wyodrębnienia 5 odmiennych serotypów [29, 65]. Informacje uzyskane dzięki wprowadzeniu do badań technik biologii molekularnej pozwoliły na rozgraniczenie konkretnych genotypów rodzaju *Lyssavirus*.

Nowy podział opierał się przede wszystkim na różnicach w sekwencji nukleotydowej badanych wirusów, a nie – jak dotychczasowy – na właściwościach antygenowych izolowanych szczepów [29]. Pozwoliło to na wyodrębnienie 7 genotypów w obrębie rodzaju *Lyssavirus*, (związanych z rozmieszczeniem geograficznym i specyficznymi żywicielami wirusów) (Tabela I) [3, 29, 48, 57, 65].

Istniejący już podział na genotypy posłużył jako podstawa dla taksonomicznego podziału rodzaju *Lyssavirus* na poszczególne gatunki [29]. Od roku 2016 wyróżnia się 14 gatunków. Były one odkrywane na przestrzeni lat zarówno w Europie (Niemcy, Finlandia), jak i w Azji (Kirgistan, Tadżykistan, wschodnia Rosja), w Afryce (Nigeria, Kenia, Tanzania) oraz w Australii. Według kolejności wyodrębniania gatunków były to: RABV – *Rabies virus*, LBV – *Logos bat virus*, MOKV – *Mokola virus*, EBLV-1 – *European bat lyssavirus* (typ 1.), DUVV – *Duvenhage virus*, EBLV-2 – *European bat lyssavirus* (typ 2.), ARAV – *Aravan virus*, ABLV – *Australian bat lyssavirus*, KHUV – *Khujand virus*, IRKV – *Irkut virus*, WCBV – *West Caucasian bat*

virus, SHIBV – *Shimoni bat virus*, IKOV – *Ikoma lyssavirus*, BBLV – *Bokeloh bat lyssavirus* [29]. W roku 2012 w Hiszpanii został odkryty prawdopodobnie kolejny wirus z tego rodzaju – LLEBV – *Lleida bat lyssavirus*. Nie został on jednak jeszcze oficjalnie zaklasyfikowany do *Lyssavirus* spp. [10, 29].

Wyróżnia się również inny podział wirusów tego rodzaju, który uwzględnia ich właściwości genetyczne, immunogenne oraz chorobotwórcze. Genotypy podzielono na 2 grupy filogenetyczne. Do grupy filogenetycznej I należą genotypy 1., 4., 5., 6. i 7., a do grupy filogenetycznej II – genotypy 2. i 3. [3, 29]. Wirusy przypisane do różnych grup filogenetycznych różnią się między sobą także właściwościami biologicznymi, takimi jak patogenność, zdolność wywoływania apoptozy czy rozpoznawanie receptorów komórkowych. Ponadto dotychczasowe wyniki uzyskane z prac badawczych, między innymi na zwierzętach, wskazują, że obecnie stosowane szczepionki nie są skuteczne w zapobieganiu zakażeniom wywołanym przez wirusy należące do grupy filogenetycznej II [48].

Zgodnie z obecnym stanem wiedzy obowiązującym podziałem lyssawirusów jest ten zaproponowany w roku 2018 przez ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) – Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów. *Lyssavirus* spp. należy do typu *Negarnaviricota*, klasy *Monjiviricetes*, rzędu *Mononegavirales* oraz rodziny *Rhabdoviridae*, składającej się z 17 innych rodzajów. Do lyssawirusów należy 16 gatunków oraz 2 określone jako niesklasyfikowane (Tabela II) [20, 21, 59].

Poniżej omówione zostały wybrane, najlepiej poznane do tej pory gatunki z rodzaju *Lyssavirus* spp., należące do odrębnych genotypów i grup filogenetycznych.

2.1. *Lagos bat virus*

Wirus tego gatunku stanowi genotyp 2. rodzaju *Lyssavirus* spp. i należy do grupy filogenetycznej II. Po zainfekowaniu ssaków wywołuje u nich chorobę wścieklizno-podobną. Występuje w centralnej i południowej Afryce. W roku 1956 w Nigerii po raz pierw-

Tabela I
Podział lyssawirusów

Genotyp	Wirus	Miejsce występowania	Żywiciel
1	<i>Rabies virus</i> (wirus wścieklizny)	Cały świat	Mięsożerne zwierzęta lądowe
2	<i>Lagos bat virus</i>	Afryka	Nietoperze owocożerne
3	<i>Mokola virus</i>	Afryka	Ryjówkowate, koty, psy i gryzonie
4	<i>Duvenhage virus</i>	Afryka	Nietoperze owadożerne
5	<i>European bat lyssavirus typ 1</i>	Europa	Nietoperze owadożerne
6	<i>European bat lyssavirus typ 2</i>	Europa	Nietoperze owadożerne
7	<i>Australian bat lyssavirus</i>	Australia i Oceania	Nietoperze owocożerne i owadożerne

Na podstawie [3, 29, 48, 65].

Tabela II
Alfabetyczne zestawienie członków rodziny *Lyssavirus* spp.

Wirus	Skrót	Grupa filogenetyczna
<i>Aravan virus</i>	ARAV	1
<i>Australian bat lyssavirus</i>	ABLV	
<i>Bokeloh bat lyssavirus</i>	BBLV	
<i>Duvenhage virus</i>	DUVV	
<i>European bat lyssavirus 1</i>	EBLV-1	
<i>European bat lyssavirus 2</i>	EBLV-2	
<i>Gannoruwa bat lyssavirus</i>	GBLV	
<i>Irkut virus</i>	IRKV	
<i>Khujand virus</i>	KHUV	
<i>Rabies virus</i> (wirus wścieklizny)	RABV	
<i>Lagos bat virus</i>	LBV	2
<i>Mokola virus</i>	MOKV	
<i>Shimoni bat virus</i>	SHIBV	
<i>Ikoma lyssavirus</i>	IKOV,	-
Kotalahti bat lyssavirus (niesklasyfikowany)	KBLV	
<i>Lleida bat lyssavirus</i>	LLEBV	
<i>Taiwan bat lyssavirus</i> (niesklasyfikowany)	TBLV	
<i>West Caucasian bat virus</i>	WCBV	

Na podstawie [20, 21, 59].

szy wyizolowano LBV u pochodzącego z wyspy Lagos nietoperza z rodziny rudawkowatych (*Pteropodidae*). Było to także pierwsze odkrycie wirusa pokrewnego do RABV. Nie stwierdzono do tej pory zainfekowania człowieka tym gatunkiem [7, 28].

2.2. Mokola virus

Genotyp 3. rodzaju *Lyssavirus* spp. obejmuje MOKV, który jednocześnie należy do grupy filogenetycznej II. Izolowany jest od ssaków, zamieszkujących tereny Afryki Subsaharyjskiej [58], u których wywołuje objawy podobne do wywoływanych przez wściekliznę. Do tej pory nie zidentyfikowano naturalnego rezerwuaru tego wirusa, jednak przypuszcza się, że stanowią go małe ssaki, głównie koty. Dotychczas udokumentowane zostały jedynie dwa przypadki zakażenia człowieka wirusem należącym do tego gatunku [14, 25].

2.3. Duvenhage virus

Gatunek ten odkryty został po raz pierwszy w roku 1970 w południowej Afryce u mężczyzny ugryzionego przez nietoperza, który następnie zmarł z powodu wystąpienia choroby manifestującej się wścieklizno-podobnymi objawami [55]. DUVV stanowi genotyp 4. i zaliczany jest do grupy filogenetycznej I. W roku 2006,

także w południowej Afryce, udokumentowany został drugi zgon, tym razem był to człowiek podrapany przez nietoperza [40], natomiast w roku 2007, w Amsterdamie, stwierdzono pierwszy przypadek śmierci w Europie z powodu infekcji wirusem tego gatunku. Prawdopodobnym nosicielem *Duvenhage virus* są nietoperze z podrzędu *Microchiroptera*, z których do tej pory udało się wyizolować DUVV jedynie dwa razy [56].

2.4. European bat lyssavirus typ 1

Wirus ten, należący do genotypu 5., został wyizolowany w Hiszpanii od nietoperzy *Eptesicus serotinus*. Gatunek dzieli się na EBLV-1a oraz EBLV-1b, występuje na terenie całej Europy – w piśmiennictwie dostępne są opisy zakażeń z Francji, Holandii czy Rosji. Nosicielami są nietoperze owadożerne. Do 2000 roku udokumentowano 630 przypadków zakażeń tym wirusem a do 2010 – 959 [2, 29, 48, 50, 51, 65].

2.5. European bat lyssavirus typ 2

Gatunek wyizolowano w 1996 roku w Wielkiej Brytanii od nietoperza *Myotis daubentonif*. Wirusy te występują na kontynencie europejskim, a żywicielami, podobnie jak w przypadku European bat lyssavirus typu 1, są nietoperze owadożerne [3, 23, 29, 48].

2.6. Australian bat lyssavirus

Czarne nietoperze owocożerne z gatunku *Pteropus alecto* stanowią jeden z pięciu naturalnych rezerwuarów ABLV [5]. Wirus ten zaliczany jest do grupy filogenetycznej I i stanowi genotyp 7. rodzaju *Lyssavirus* spp. Po raz pierwszy zidentyfikowany został w roku 1995 w Australii [53], a rok później stwierdzono pierwszą śmierć po infekcji ABLV. Do tej pory udokumentowane są trzy zgony spowodowane zakażeniem wirusem należącym do tego gatunku. U osób tych po podrapaniu lub ugryzieniu przez nietoperza przenoszącego ABLV rozwinęły się wścieklizno-podobne objawy [16, 18].

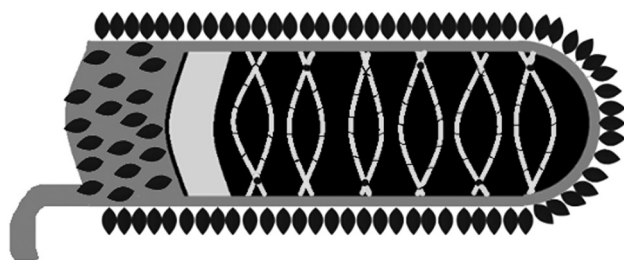
3. Charakterystyka

3.1. Budowa molekularna

Materiałem genetycznym wirusów z rodzaju *Lyssavirus* jest jednoniciowy RNA o ujemnej polarności, które koduje 5 białek wirusowych. Są to: nukleoproteina N, fosfoproteina P, glikoproteina G, polimeraza L i białko rdzenia M [1, 15]. 4 dodatkowe peptydy dostępne są poprzez alternatywną inicjację [52]. Sekwencja liderowa składa się z około 50 nukleotydów, poprzedzonych przez geny kodujące białka wirusa [65].

Wiriony mają długość 100–300 nm, średnicę 75 nm i kształt opisywany jako „zbliżony do pocisku”. Natomiast ich cząsteczki infekcyjne posiadają model zbliżony do cylindrycznego [1, 15]. Składają się one z dwóch strukturalnych i funkcjonalnych podjednostek. Pierwszą z nich stanowi zewnętrzna otoczka lipidowa (envelope) pokryta około 400, przypominającymi kolce o długości 10 nm, wypustkami glikoproteinowymi G (stanowiącymi trimery) [65], odpowiedzialnymi za rozpoznawanie specyficznych receptorów wirusowych na błonach komórkowych. Wypustki stanowią główne antygeny powierzchniowe i warunkują adsorpcję oraz indukują powstawanie przeciwciał neutralizujących [32]. Druga podjednostka utworzona jest z wewnętrznego, helikalnego rybonukleokapsydu (będącego rdzeniem rybonukleoproteinowym), skręconego symetrycznie i złożonego z genomowego RNA, które to jest ściśle związane z nukleoproteiną (białkiem N), białkiem L (polimerazą RNA) i z kofaktorem polimerazy RNA – białkiem P.

Rdzeń stanowi położone między rybonukleokapsydem a otoczką białko M, które odpowiada za ogólny kształt wirusa oraz bierze udział w uwalnianiu potomnych cząstek wirusowych z komórek gospodarza [65]. Nukleoproteina N stanowi główne białko strukturalne wirusa, chroniąc jego RNA przed rybonukleazami, zapewniając tym samym jego pozostanie w konfiguracji umożliwiającej transkrypcję [32]. Budowę wirusa przedstawiono schematycznie na Ryc. 1.



Ryc. 1. Schemat budowy wirusów należących do rodzaju *Lyssavirus* spp.

3.2. Genom i ekspresja genów

Materiał genetyczny *Lyssavirus* stanowi jednociowy, liniowy, niepodzielony RNA o ujemnej polarności, o wielkości około 11–12 tysięcy nukleotydów [37]. Ekspresja genów *Lyssavirus* zachodzi dzięki polimerazie RNA zależnej od RNA, która wiąże genom zawarty w kapsydzie w rejonie liderowym. Dochodzi do sekwencyjnej transkrypcji każdego genu poprzez rozpoznawanie sygnałów start i stop zawartych w genach wirusowych. Następnie do mRNA przyłączana jest czapeczka oraz dochodzi do jego poliadenylacji przez białka L w czasie syntezy [52].

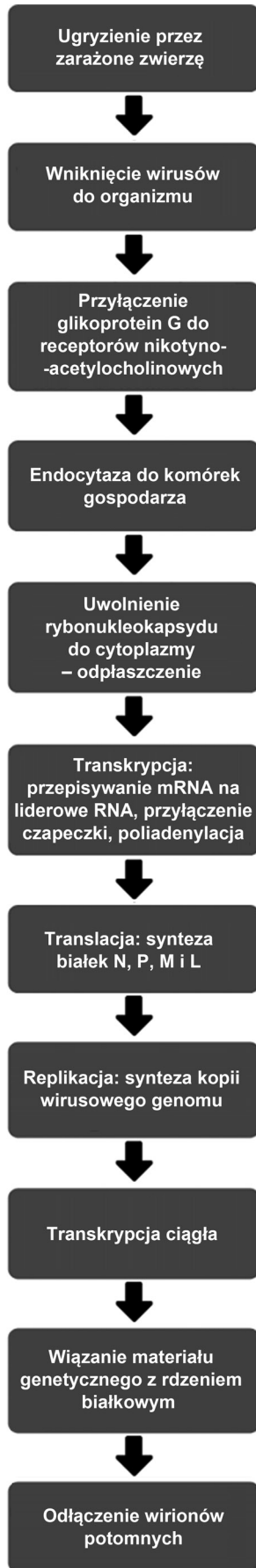
3.3. Cykl replikacyjny

Wirus wścieklizny wnika, namnaża się i rozprzestrzenia za pośrednictwem dróg nerwowych. Kwalifikuje go to do wirusów neurotropowych [36]. Cykl replikacyjny wirusa rozpoczyna się od przyłączenia wirusowych glikoprotein G do specyficznych receptorów nikotyno-acetylocholinowych gospodarza lub do cząsteczki adhezyjnej komórki nerwowej. Rozpoczyna to proces infekcji oraz umożliwia klatrynozę (pinocytoza) wirusa do komórek gospodarza (internalizacja).

Wirusy gromadzą się w dużych pęcherzykach cytoplazmatycznych [32, 65]. Następnie dochodzi do połączenia otoczki lipidowej wirusa z błoną komórkową gospodarza, co umożliwia uwolnienie rybonukleokapsydu do cytoplazmy [52]. Proces ten nosi nazwę odplaszczania [65]. Sprzyja mu kwaśne środowisko pęcherzyka [32]. Zarówno replikacja, jak i sama transkrypcja zachodzą w cytoplazmie w ciałkach Negriego [27].

Kolejnym etapem replikacji jest transkrypcja wirusowego RNA. Następnie wirusowe mRNA ulega translacji na wolnych rybosomach w cytoplazmie, prowadząc do syntezy białek N, P, M i L [65]. Białko G produkowane jest z udziałem aparatu Golgiego na związanych z błoną rybosomach, a następnie dostarczane, po wbudowaniu w pęcherzyki błonowe, na powierzchnię komórki [32]. Sama replikacja prawdopodobnie rozpoczyna się, gdy obecna jest wystarczająca ilość nukleoprotein niezbędnych do odgrodzienia nowosyntezowanych antygenomów od genomów [52]. Pierwszym jej etapem jest synteza pełnej długości kopii wirusowego genomu o dodatniej polarności. Gdy do niego dojdzie, transkrypcja RNA staje się ciągła, ignorując tym samym sekwencje nukleotydowe odpowiedzialne za jej ewentualne przerwanie (kodony STOP). Polimeraza wirusowa działa od końca 3' genomu i postępuje aż do wytworzenia pełnej kopii genomu. Duplikaty nici o dodatniej polarności stanowią następnie matrycę do syntezy pełnej nici o ujemnej polarności, która stanowi wirusowy genom [65].

Końcowy etap cyklu replikacyjny wirusa polega na wiązaniu się rybonukleokapsydu (na który składa się genom związany z białkiem polimerazy L i z białkiem N) z rdzeniem białkowym przy błonie cytoplazmatycznej, co następnie – po jego zwijaniu do skondensowanej formy – indukuje tworzenie kształtu określonego jako „zbliżony do pocisku”. Następnie przy udziale kompleksów ESCRT gospodarza w błonie plazmatycznej dochodzi do jego uwalniania przez pączkowanie, prowadząc tym samym do odłączenia nowych wirionów po pokryciu ich osłonką rybonukleokapsydu [32, 52]. Cykl replikacyjny wirusa został przedstawiony na Ryc. 2.



Ryc. 2. Schemat cyklu replikacyjnego wirusów należących do rodzaju *Lyssavirus* spp.

4. Chorobotwórczość

4.1. Patogeneza

Infekcja następuje po dostaniu się wirusa wścieklizny wraz ze śliną do rany na skutek ugryzienia, a także po kontakcie zanieczyszczonej śliny lub zakażonego mózgu zwierzęcia z uszkodzoną skórą, spojówkami lub błonami śluzowymi. Wirus nie przenika przez nieuszkodzoną skórę. Najgroźniejszą postacią infekcji jest ta, do której dochodzi przez błony śluzowe nosa, ponieważ występują tam zlokalizowane bardzo blisko mózgu zakończenia nerwu węchowego, przez co postępuje ona szczególnie szybko. W rzadkich przypadkach możliwe jest także zakażenie drogą kropelkowo-aerogenną [36] lub drogą jatrogenną [47]. Odnotowano również pojedyncze przypadki infekcji poprzez transplantację różnych organów, np. płuc i wątroby, po których nastąpił zgon biorcy [48].

Po wniknięciu dochodzi do jego replikacji w tkankach (oprócz tkanki nerwowej) lub bezpośredniej migracji do nerwów obwodowych, a tym samym przedostania się do centralnego układu nerwowego, do zwojów korzeni grzbietowych, na drodze wstecznego transportu aksoplazmatycznego. W momencie dotarcia lyssawirusa do mózgu i rdzenia kręgowego dochodzi do szybkiej progresji infekcji, która obejmuje komórki Purkiniego mózdzku, pień mózgu, hipokamp oraz komórki zwojów jąder mostu. W proces ten mogą być zaangażowane włókna czuciowe i ruchowe, w zależności od gatunku zwierzęcia [32]. W przypadku nietoperzy rany te często są bardzo powierzchowne (0,1–0,3 mm głębokości) i dotyczą jedynie naskórka, przez co narażeni na kontakt ludzie bardzo często nie wiążą infekcji z tym ugryzieniem. Z kolei zainfekowane zwierzęta mięsożerne powodują zarażenie poprzez rozległe, głębokie rany gryzione [6]. Okres inkubacji waha się od 2 tygodni do 6 lat, jednak średnio wynosi 2–3 miesiące. Zależy on od odległości miejsca infekcji od mózgu, zaległości rany, dawki wirusa, wieku oraz stanu odporności. Szacowana prędkość migracji wirusa, a tym samym prędkość, z jaką postępuje zakażenie nerwów, wynosi 15–100 mm na dzień. Następnie wirus przemieszcza się za pośrednictwem aferentnych nerwów obwodowych z centralnego układu nerwowego do silnie unerwionych miejsc (skóra głowy, skóra szyi, błona śluzowa nosa, mięsz nerek, komórki zrazików trzustki, siatkówka, ślinianki, rogówka, rdzeń kory nadnerczy), co prowadzi także do infekcji sąsiednich tkanek, np. tkanki wydzielniczej gruczołów ślinowych [32].

W patogenezie większości infekcji wirusowych biorą udział limfocyty T CD8+, jednakże w przypadku wścieklizny wirus dostaje się do komórek nerwowych co może prowadzić do indukcji zapalenia w ośrodkowym układzie nerwowym i skutkować zniszczeniem

nerwów i paraliżem. Wirus wścieklizny posiada cechy superantygeny, przez co prowadzi do aktywacji znacznej części limfocytów T. Prowadzi to pośrednio do reakcji obronnej organizmu na inne, niezwiązane z infekcją antygeny [19].

Wirus wścieklizny po dostaniu się do ośrodkowego układu nerwowego prowadzi do znacznych uszkodzeń neurologicznych. W wyniku infekcji dochodzi do zwiększonej ekspresji chemokin należących do rodziny cytokin. W przypadku myszy zarażonych w warunkach laboratoryjnych nadmierna aktywność tych białek prowadzi do indukcji apoptozy zakażonych komórek, zwiększonego napływu komórek zapalnych do ośrodkowego układu nerwowego, a ponadto uszczelnieniem bariery krew-mózg. Proces zapalny, który wystąpił u myszy zainfekowanych małą dawką wirusa w warunkach laboratoryjnych doprowadził do całkowitego wyeliminowania wirusa z mózgu. W przypadku zarażenia wirusem wścieklizny gryzoni nie przebiegającego w warunkach laboratoryjnych dochodziło do inwazji ośrodkowego układu nerwowego bez inicjacji reakcji odpornościowej organizmu [35].

W momencie wystąpienia pierwszych objawów klinicznych, z których sztanदारowym w większości przypadków jest ból neuropatyczny w pierwotnym miejscu infekcji (spowodowany replikacją wirusa w zwojach nerwowych korzeni grzbietowych oraz zapaleniem zwojów nerwowych – *ganglionitis*), lyssawirus obecny jest już w całym organizmie. Główne objawy kliniczne są związane z zakażeniem przez wirusa mózgu, mózdzku i rdzenia kręgowego oraz degeneracją neuronów [32]. Wyróżnia się dwa główne obrazy kliniczne wścieklizny: postać szałową i postać porażenną [65]. Przy czym często zdarza się, że postać szałowa (pobudzeniowa) przechodzi w postać porażenną. Po przebyciu okresu pobudzeniowego, w przypadku przeżycia przez zainfekowanego kolejnego napadu drgawek, dochodzi do porażen wiotkich, które następnie prowadzą do nieuchronnej śmierci. Jedną z form występowania choroby jest tzw. „cicha wścieklizna”, która przebiega bez postaci szałowej lub jest ona słabo wyrażona [36]. Po ok. 7–10 dniach od wystąpienia pierwszych objawów wścieklizny chory zapada w śpiączkę, po której umiera z powodu niewydolności oddechowej. Po zakażeniu organizmu z udziałem *Lyssavirus* dochodzi do wystąpienia zapalenia mózgu w około 80% przypadków, co stanowi śmiertelną postać pobudzeniową choroby. W przypadku rozwoju łagodnie przebiegającej wścieklizny porażennej dominującym objawem jest paraliż [47].

Aby w pełni zrozumieć sposób zakażenia organizmu przez rodzaj *Lyssavirus* spp. należy wziąć pod uwagę mechanizmy molekularne, na które wirusy te mają wpływ. Białko P lyssawirusów może doprowadzić do zahamowania RIG-I (retinoic acid-inducible gene I), należącego do błonowych receptorów rozpoznających

wzorce (PRR) zaangażowanych w rozpoznawanie wirusów przez nieswoistą odpowiedź odpornościową. Zablokowanie RIG-I przez białko P wirusów wścieklizny uniemożliwia zapoczątkowanie antywirusowej, apoptotycznej oraz prozapalnej odpowiedzi ustroju na zakażenie [24, 26, 30, 31]. Białko P wirusów wścieklizny stanowi także antagonistę interferonu typu I (IFN). Białko P lyssawirusów uniemożliwia fosforylację i dimeryzację IRF3, czyli 3. czynnika regulatorowego interferonu odpowiedzialnego za ekspresję niektórych genów o działaniu antywirusowym [12, 42]. Wirusowa fosfoproteina może także hamować sygnalizację szlaku przeciwwirusowego STAT-I, blokując transport dimerów STAT do jądra [9, 63]. W ten sposób, białko P jest przypuszczalnie kluczowym antagonistą interferonów w czasie infekcji wirusem wścieklizny umożliwiając wirusom replikację wirusów w zainfekowanych komórkach [8, 43].

Kolejnym z elementów, na który wpływ mają wirusy wścieklizny, a dokładniej *Rabies virus* (genotyp 1.) i *Mokola virus* (genotyp 3.), są łańcuchy lekkie LC8 dyneiny, czyli kompleksu białkowego odpowiedzialnego za ruch organelli komórkowych wzdłuż mikrotubuli. LC8 ulega ekspresji w różnych typach komórek a białko P lyssawirusów poprzez oddziaływanie z tym białkiem prawdopodobnie umożliwia rozprzestrzenianie się wirusa poprzez długie aksony nerwów obwodowych z pierwotnego miejsca infekcji, ostatecznie pozwalając na dotarcie do OUN. LC8 prawdopodobnie stanowi kluczowe ogniwo molekularne w patogenezie wirusów wścieklizny i umożliwia oddziaływanie lyssawirusów na komórkowy transport organizmu. Nie jest ono jednak bezpośrednio odpowiedzialne za ostateczne dotarcie wirusów do OUN [41, 54].

Wirusy wścieklizny prawdopodobnie mogą także zmieniać kanały jonowe oraz zajmować receptory komórkowe, a tym samym modyfikować neurotransmisję. U pacjentów chorych na wściekliznę stwierdzono spadek tetrahydrobiopteryny (BH4), a także patologiczny spadek przekaźników serotonergicznymi i dopaminergicznymi związany z utratą BH4. Niedobór BH4 prowadzi ostatecznie do zmniejszenia płynności obrotu serotoniny i dopaminy w mózgu, a tym samym strat tych neuroprzekaźników i uogólnionego spowolnienia aktywności elektrycznej w korze mózgu. Synteza neuroprzekaźników przebiega z udziałem m.in. hydroksylazy fenyloalaniny, hydroksylazy tyrozyny i hydroksylazy tryptofanu, których niezbędnym kofaktorem jest BH4. Spadek stężenia BH4 prowadzi w rezultacie do niedoboru m.in. adrenaliny, noradrenaliny, serotoniny, dopaminy i melatoniny [62].

Neuronalna syntaza tlenu azotu jest BH4-zależna, przez co niedobór BH4 może także prowadzić do potencjalnego niedokrwienia mózgu w wyniku upośledzenia unaczynienia mózgowego. Ponadto w przypadku

infekcji wirusowej makrofagów może dojść do uwolnienia z nich czynników prozapalnych, w tym chemokin, interleukin i cytokin oraz tlenu azotu. Obecność wirusa wścieklizny w komórce skutkuje ponadto ułatwieniem produkcji tlenu azotu. Zwiększona synteza tlenu azotu prawdopodobnie jest częścią antywirusowej odpowiedzi komórki na zakażenie i przypuszczalnie stanowi jeden z czynników wrodzonej odpowiedzi wpływający na replikację wirusów w komórce we wczesnym stadium infekcji [33, 62].

W większości udokumentowanych przypadków wścieklizny u ludzi do czasu wystąpienia ostrych objawów infekcji w surowicy krwi nie były wykrywalne swoiste przeciwciała przeciwko komórkom zainfekowanym wirusem wścieklizny. Także w płynie mózgowo-rdzeniowym nie wykryto przeciwciał przeciwko wirusowym glikoproteinom. Natomiast u pacjentów, u których w surowicy krwi stwierdzono obecność przeciwciał ich stężenia były bardzo niskie, określane jako prawie niewykrywalne. Udokumentowany jest przypadek pacjenta chorego na wściekliznę, którego wprowadzono w stan śpiączki farmakologicznej. Umożliwiło to indukcję odpowiedzi humoralnej organizmu oraz wytworzenie przeciwciał IgG wykrywalnych następnie zarówno w surowicy krwi, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym. Pacjent ten przeżył prawdopodobnie dzięki wytworzeniu przez jego organizm swoistych przeciwciał. Glikoproteina G wirusów wścieklizny stanowi główny antygen, przeciwko któremu indukowana jest ochronna odpowiedź układu odpornościowego ustroju. Istnieją także inne elementy, także jak cytokiny, które spełniają rolę w uodpornieniu organizmu na wściekliznę. Indukcja apoptozy koreluje prawdopodobnie z akumulacją glikoproteiny G w zainfekowanych komórkach. Z kolei apoptoza i następcza śmierć tych komórek skutkuje silną wrodzoną i nabytą odpornością organizmu [13, 22].

Wirusy wścieklizny prowadzą ostatecznie do dysfunkcji neuronalnej, która prawdopodobnie spowodowana jest zniszczeniem przez nie integralności cytoszkieletu i struktur synaptycznych neuronów. Niektóre patogeny z rodzaju *Lyssavirus* spp. są w stanie wprowadzić znaczące zmiany w ekspresji białek sieci cytoszkieletu komórek neuronalnych, w tym w izoformach tubuliny i beta-tropomiozyny oraz wimentyny, a także białek regulatorowych cytoszkieletu. Rozerwanie integralności cytoszkieletu stanowi prawdopodobnie jeden z elementów patogenezы wirusów wścieklizny. Wirusy wścieklizny wymagają do wnikięcia do neuronów integralności sieci aktynowej cytoszkieletu. Lyssawirusy dodatkowo są w stanie wprowadzić zmiany strukturalne organelli w neuronach, a także mogą już po wnikięciu do komórki neuronalnej wpływać na ich cytoszkielet aktynowy, który fizjologicznie pełni kluczowe funkcje neuronalne [11, 66].

4.2. Objawy wścieklizny

Pierwsze objawy infekcji wirusowej podobne są zwykłego przeziębienia i obejmują ogólne osłabienie i zmęczenie, dyskomfort, gorączkę, brak apetytu, nudności, wymioty i ból głowy. Mogą one trwać nawet kilka dni. W miejscu ugryzienia może być także odczuwalne klucie, mrowienie, ból lub swędzenie. Kolejnymi objawami związanymi bezpośrednio z przedostaniem się wirusa do ośrodkowego układu nerwowego mogą być dysfunkcja mózgu, podwyższony nastrój, niepokój i dezorientowanie. Wraz z progresją infekcji wystąpić mogą także bezsenność, majaczenie, halucynacje oraz dezorientacja. W drugiej fazie choroby, określanej jako postać porażenna, zaobserwować można ponadto ostre objawy neurologiczne – dyzartria (zaburzenia mowy), dysfagia (zaburzenia połykania), nadmierna produkcja i wydzielanie śliny oraz oczopląs.

Ostry okres infekcji kończy się zazwyczaj po 2 do 10 dniach. W momencie manifestacji pierwszych objawów wścieklizny w większości przypadków choroba doprowadzi do śmierci, a stosowane leczenie objawowe ma jedynie przynieść choremu tymczasową ulgę. W okresie rozwinięcia się pełnego obrazu klinicznego choroby charakterystyczny jest także wodowstręt (20–50% chorych), który objawia się występowaniem skurczów mięśni połykowych, a w skrajnych przypadkach także drgawkami całego ciała na widok lub sam odgłos lejącej się wody, oraz aerofobia [48]. Wykształca się ponadto zapalenie wielonerwowe [32, 34, 36, 47].

5. Prewencja, profilaktyka, diagnostyka, leczenie

5.1. Szczepienia

Prewencja zakażeń wścieklizną ma na celu wytworzenie odporności swoistej. Do wykształcenia odporności czynnej dochodzi w wyniku serii szczepień – swoiste zapobieganie czynne. Szczepionka zawiera inaktywowany wirus, który stanowi jednocześnie swoisty antygen mający na celu doprowadzenie do wytworzenia pamięci immunologicznej poprzez stymulację układu odpornościowego. Prewencja może obejmować dodatkowo wytworzenie odporności biernej poprzez podanie przeciwciał wraz z iniekcją ludzkiej immunoglobuliny – swoiste zapobieganie czynno-bierne [17, 34]. Glikoproteina wirusa wścieklizny (białko G) zawiera miejsca antygenowe będące celem działania zarówno przeciwciał indukowanych szczepieniami, jak i podanej immunoglobuliny [60].

Obowiązek stosowania szczepień przeciwko wściekliznie dotyczy osób narażonych na zakażenie w wyniku kontaktu ze zwierzęciem chorym lub podejrzanym o zakażenie, jednak są one również zalecane osobom,

które planują podróż do rejonów endemicznego występowania zachorowań na wściekliznę [17].

Protokoły szczepień przeciwko wściekliznie są stale uaktualniane i publikowane przez WHO. Aktualnie rekomendowane są nowoczesne, podawane domięśniowo lub podskórnie, szczepionki typu CCEEV (Cell Culture Vaccines and Embryonated Egg-based Vaccines), zawierające inaktywowane wirusy RABV. Mają być one stosowane zarówno w działaniach przed- jak i po-ekspozycyjnych w postaci serii iniekcji przeprowadzanych według wskazań producenta szczepionki. Najczęściej rekomendowane schematy to 3 dawki dla szczepienia profilaktycznego oraz 5 (w dni 0, 3, 7, 14 i 28) lub 4 dawki (w dni 0, 3, 7 i 21) dla szczepienia po-ekspozycyjnego. CCEEV są jednymi z najbardziej immunogennych szczepionek. Oznaczają się bezpieczeństwem stosowania i dobrą tolerancją wśród pacjentów [60].

Na przestrzeni lat wdrożono liczne programy zapobiegające wściekliznie, do których zalicza się m.in. stosowanie u osób w grupie ryzyka wysoce immunogennych, bezpiecznych szczepionek produkowanych w warunkach hodowli komórkowych, a także szczepienia lisów oraz zwierząt domowych – psów i kotów. Pozwoliły one na znaczne ograniczenie występowania wścieklizny u ludzi w Europie [48]. Immunoglobuliny przeciwko wirusowi wścieklizny mogą być podawane kobietom w ciąży oraz karmiącym. Wszelka profilaktyka po-narażeniowa powinna być zastosowana wobec wszystkich, którzy kwalifikują się według zaleceń WHO. Pacjenci chorzy na HIV spełniający określone warunki także mogą otrzymać szczepionkę na wściekliznę. W przypadku osób podróżujących należy ocenić ryzyko narażenia na zarażenie wirusem wścieklizny w sposób indywidualny, biorąc pod uwagę przede wszystkim występowanie wścieklizny w miejscu docelowym oraz planowane aktywności, np. przebywanie w jaskiniach, w których możliwa jest obecność i bezpośredni kontakt z nietoperzami [64].

Główny Inspektorat Sanitarny w Programie Szczepień Ochronnych na rok 2018 różnicuje sposób podawania szczepionki po ugryzieniu ze względu na rodzaj kontaktu oraz stan zdrowia zwierzęcia [17].

5.2. Profilaktyka po-ekspozycyjna

Względnie długi czas inkubacja wirusa wścieklizny w ludzkim organizmie stwarza możliwość uniknięcia konsekwencji klinicznych nawet po bezpośredniej ekspozycji [60]. Powolny przebieg wścieklizny pozwala na wywołanie aktywnej odpowiedzi immunologicznej, a tym samym zapewnienie ochrony przed dalszą infekcją [32]. Efekt ten jest możliwy jedynie poprzez wdrożenie szybkiej i efektywnej profilaktyki po-ekspozycyjnej.

Pierwszym krokiem zapobiegawczym powinno być przemycie rany wodą z mydłem lub substancją będącą

w stanie inaktywować wirusa. Oczyszczenie rany prowadzi do zmniejszenia inokulum patogenu w jej obrębie. Następnie zalecane jest podanie serii szczepień w celu sprowokowania organizmu do produkcji przeciwciał. Ich obecność zmniejsza ryzyko przedostania się RABV do nerwów obwodowych. Kolejnym krokiem w profilaktycznych działaniach po-ekspozycyjnych jest podanie w okolicę rany immunoglobuliny przeciwko wirusowi wścieklizny. Dostarczy ona niezbędnych przeciwciał do momentu rozpoczęcia ich produkcji przez organizm i umożliwi zneutralizowanie wirusa w miejscu jego wniknięcia [32, 60].

Do roku 2012 udokumentowano mniej niż 10 przypadków wyleczenia człowieka z wścieklizny, a jedynie w 2 z nich nie wdrożono wcześniejszej profilaktyki przed- lub po-narażeniowej [34]. W każdym przypadku zanieczyszczenia błony śluzowej lub otwartej rany śliną lub tkanką mózgową zwierzęcia podejrzanego o zachorowanie na wściekliznę należy zastosować profilaktykę [32]. Prawidłowo przeprowadzone, natychmiastowe działania po ekspozycji na RABV wykazują 100% skuteczność w zapobieganiu wściekliznie. Zachorowanie i ostatecznie śmierć z powodu choroby dotyczy przede wszystkim osób, które nie miały dostępu do szybkiej, właściwej profilaktyki po-ekspozycyjnej [60].

5.3. Diagnostyka

W każdym przypadku podejrzenia wścieklizny należy potwierdzić je za pomocą badań laboratoryjnych. W diagnostyce pomocny może być także rezonans magnetyczny, podczas którego obserwuje się umiarkowane wzmocnienie sygnału w sekwencji T2 w obrębie poszczególnych obszarów mózgu – pnia, podwzgórza, hipokampa oraz substancji białej i szarej. U pacjentów w fazie śpiączki wzmocnienie sygnału następuje po zastosowaniu gadoliny. W diagnostyce różnicowej wścieklizny tomografia komputerowa nie spełnia żadnej roli.

W badaniach laboratoryjnych infekcję lyssawirusem można stwierdzić poprzez wykrycie antygeny wirusa, swoistych przeciwciał neutralizujących w surowicy lub płynie mózgowo-rdzeniowym Inną metodą jest izolacja samego wirusa bądź jego kwasu nukleinowego. Antygen wirusowy wykrywa się za pomocą metody bezpośredniej immunofluorescencji, która stanowi tzw. „złoty standard”. Wykorzystuje się w tym celu przede wszystkim ślinę, preparaty odciskowe z rogówki (czułość 46%) lub materiał przygotowany po wykonaniu biopsji skóry pobranej z karku. W ostatnim przypadku czułość metody wynosi 50–94% i wzrasta wraz z czasem trwania infekcji. Podobną czułością cechuje się także test wykrywający kwas nukleinowy lyssawirusa w ślinie przy zastosowaniu metody PCR z odwrotną transkryptazą.

Żaden z testów nie cechuje się 100% skutecznością, wiarygodnością i czułością, więc w celu potwierdzenia infekcji zalecane jest wykonanie kilku testów jednocześnie. W diagnostyce pośmiertnej stosuje się takie same metody jak w przyżyciowej, lecz materiał badany stanowi głównie tkanka mózgowa [48]. W celu potwierdzenia bądź wykluczenia wścieklizny wykonywane są również testy wykrywania wewnątrzcytoplazmatycznych ciałek wtrętowych w zakażonych neuronach. Zawierają one ciała Negriego, czyli agregaty wirusowych rybonukleokapsydów. Występują one w nawet do 90% badanych tkanek mózgowych osób objętych infekcją [32].

5.4. Leczenie eksperymentalne

Protokół Milwaukee został opracowany przez dr. Rodneya Willoughby Juniora i stanowi raport z eksperymentalnej formy leczenia wścieklizny u człowieka, u 15-letniej dziewczynki z Wisconsin w USA – Jeanny Giese, u której wścieklizna rozwinęła się miesiąc po ugryzieniu przez nietoperza w lewy palec wskazujący, które to miało miejsce 12 września 2004 roku [44]. Do tego roku znane było jedynie 5 przypadków osób, które nie umarły po zainfekowaniu wirusem wścieklizny. Każda z tych osób była poddana profilaktyce po-ekspozycyjnej w postaci podania odpowiedniej szczepionki. Dziewczynka z USA poddana eksperymentalnej terapii według protokołu Milwaukee była pierwszą osobą, która przeżyła bez natychmiastowej, wcześniejszej profilaktyce po-narażeniowej [4]. Rana została przemyta jedynie wodą utlenioną. Pierwsze objawy neurologiczne zostały zauważone po 37 dniach od incydentu – dziewczynka została przyjęta do lokalnego szpitala z wysoką gorączką (39°C), zaburzeniami mowy, skurczem mięśni lewej ręki, podwójnym widzeniem, nudnościami i wymiotami, bez innych objawów grypy lub przeziębienia. Neurolog stwierdził u niej ponadto niezborność ruchową oraz obustronne porażenie nerwu odwodzącego. Po zdiagnozowaniu wścieklizny poprzez wyizolowane w 2. dniu hospitalizacji podczas badania przeciwciał przeciwko wściekliznie (a nie żywego wirusa) została ona poddana eksperymentalnemu leczeniu poprzez wprowadzenie w śpiączkę farmakologiczną i utrzymanie jej w niej jak najdłużej w celu uchronienia mózgu przed dalszym uszkodzeniem, a tym samym umożliwienia systemowi odpornościowemu dziewczynki wytworzenia przeciwciał niezbędnych do zwalczania wirusa. Podane zostały jej ketamina, rybawiryna, amantadyna i midazolam [44]. Ketamina jest antagonistą receptorów NMDA o udowodnionym na zwierzętach działaniu neuroprotektynym przy udarach i urazach mózgu. W terapii wścieklizny została zastosowana jako lek eksperymentalny, o braku udowodnionego działania na modelach

ludzkich. Teoretycznie miała ona chronić mózg przed ekscytotoksycznością kwasu glutaminowego, głównego neurotransmitera w ośrodkowym układzie nerwowym, jednak w przypadku wścieklizny uprzednio nie wykazano skuteczności nawet na modelu zwierzęcym [67]. Rybawiryna, wykazująca ograniczone możliwości wnikiwania do centralnego układu nerwowego, podawana była w dawkach będących w stanie podnieść poziom białek w płynie mózgowo-rdzeniowym, a tym samym wykazać poziom przepuszczalności bariery krew-mózg [44]. Podanie dziewczynce dużych dawek anestetyków w celu wprowadzenia jej w śpiączkę farmakologiczną o działaniu terapeutycznym miało doprowadzić do zmniejszenia aktywności metabolicznej jej organizmu oraz utrzymania nerwów w jak najlepszym stanie. Działanie to także miało formę eksperymentalną, o skuteczności potwierdzonej jedynie na modelach zwierzęcych w przypadku udarów i uszkodzeń mózgu oraz stanów padaczkowych. Śpiączka miała także zapobiegać niestabilności autonomicznego układu nerwowego, występującej przy zakażeniu wirusem wścieklizny [67].

Po 8 dniach pobytu w szpitalu zauważone zostały oznaki podjęcia walki z wirusem przez system odpornościowy dziewczynki po wykonaniu punkcji lędźwiowej. Wykazano zwiększony poziom przeciwciał przeciw wściekliznie, co pozwoliło na rozpoczęcie wyprowadzenia jej ze śpiączki. W 12. dniu hospitalizacji u dziewczynki ujawniła się grypa nie reagująca na standardowe leczenie. W 15. dniu leczenia zmniejszono temperaturę pokoju, w którym przebywała chora, o 5,5°C, co poskutkowało spadkiem o 3,6°C temperatury ciała dziewczynki. Pacjentka została uznana za wolną od wirusa wścieklizny po 31 dniach w szpitalu, a ponadto nie stwierdzono poważnego uszkodzenia zdolności umysłowych po przebytej chorobie oraz leczeniu. Około 5 miesięcy po hospitalizacji dziewczynka była świadoma i komunikatywna, ale stwierdzono u niej napadową dystonię (mimowolne ruchy powodujące wyginanie i skręcanie poszczególnych części ciała), dyzartrię oraz balizm (zamaszyste, gwałtowne ruchy kończyn, prowadzące do niestabilnego chodu) [44].

Dziewczynka zainfekowana była prawdopodobnie wyjątkowo łagodnym typem wirusa wścieklizny przenoszonego przez nietoperze-wampiry z podrodziny *Desmodontinae* [61] lub ugryzienie nastąpiło w miejscu bardzo oddalonym od ośrodkowego układu nerwowego, co umożliwiło jej przeżycie wścieklizny po zaplanowanym leczeniu według protokołu Milwaukee. Kolejnych 6 lub więcej prób leczenia objawowej wścieklizny z użyciem tego typu leczenia nie powiodło się. 4. lutego 2009 roku w Teksasie miała miejsce kolejna udana terapia według protokołu Milwaukee, także po ugryzieniu chłopca przez nietoperza-wampira [44].

Protokół Milwaukee od początku swojego powstania przechodził wiele modyfikacji. Ostatnia z nich miała na

celu eliminację rybowiryny oraz barbituranów z puli środków używanych w leczeniu wścieklizny tą metodą [61]. Ponadto, jednym z działań niepożądanych przy stosowaniu rybowiryny może być opóźnienie produkcji przeciwciał [4]. Z oryginalnych leków pozostały jedynie midazolam oraz ketamina, przez co obecnie protokół Milwaukee podobny jest do standardowego postępowania na oddziałach intensywnej terapii na całym świecie. W 2013 World Health Organization oficjalnie ogłosiła, że nie istnieje potwierdzona, skuteczna metoda leczenia wścieklizny [61]. Jedną z teorii eliminacji infekcji jest indukcja reakcji zapalnej organizmu z chemokina i IFN w roli głównej. Znalazła ona potwierdzenie jedynie w przypadku myszy zakażonych małymi dawkami wirusa w warunkach laboratoryjnych, jednak nie została ona potwierdzona przy infekcji *Lyssavirus* spp. w warunkach środowiskowych [35].

6. Podsumowanie

Rodzaj *Lyssavirus* wciąż stanowi obiekt badań i nie został w pełni poznany. Nieprzerwanie ma miejsce odkrywanie i klasyfikowanie nowych patogenów należących do lyssawirusów (w roku 2012 w Hiszpanii wyizolowany został prawdopodobnie kolejny gatunek), a najnowszy podział systematyczny pochodzi z roku 2016. Wirus wścieklizny występuje praktycznie na całym świecie pod postacią różnych gatunków należących do tego samego rodzaju. Ponadto cały czas trwają prace nad wynalezieniem skutecznego leczenia przeciwko infekcji – formę eksperymentalną na dzień dzisiejszy stanowi terapia według protokołu Milwaukee. Na zakażenie szczególnie narażone są osoby mające kontakt z dziką zwierzyną. Do metod zapobiegania i zmniejszenia drastyczności przebiegu choroby zaliczane są przede wszystkim szczepionki oraz bezpośrednia profilaktyka po-ekspozycyjna. Dzięki dobrze opracowanym metodom diagnostycznym możliwa jest także skuteczna, a przede wszystkim szybka identyfikacja infekcji. Złoty standard stanowi wykrycie antygeny wirusowego za pomocą metody bezpośredniej immunofluorescencji.

Piśmiennictwo

- Albertini A.A.V., Schoehn G., Weissenhorn W., Ruigrok R.W.H.: Structural aspects of rabies virus replication. *Cell. Mol. Life. Sci.* **65**, 282–294 (2008)
- Amengual B., Bourhy H., López-Roig M., Serra-Cobo J.: Temporal dynamics of European bat Lyssavirus type 1. and survival of *Myotis myotis* bats in natural colonies. *PLoS One*, **2**, e566 (2007)
- Arai Y.T., Kuzmin I.V., Kameoka Y., Botvinkin A.D.: New lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*), Kyrgyzstan. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 333–337 (2003)
- Aramburo A., Willoughby R.E., Bollen A.W., Glaser C.A., Hsieh C.J., Davis S.L., Martin K.W., Roy-Burman A.: Failure of the Milwaukee protocol in a child with rabies. *Clin. Infect. Dis.* (2011)
- Banyard A.C., Hayman D., Johnson N., McElhinney L., Fooks A.R.: Chapter 12 – Bats and Lyssaviruses. *Adv. Virus. Res.* **79**, 239–289 (2011)
- Begeman L., GeurtsvanKessel C., Finke S., Freuling C.M., Koopmans M., Müller T., Ruigrok T.J.H., Kuiken T.: Comparative pathogenesis of rabies in bats and carnivores, and implications for spillover to humans. *Lancet Infect. Dis.* **18**, e147–e159 (2018)
- Boulger L.R., Porterfield J.S.: Isolation of a virus from Nigerian fruit bats. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **52**, 421–424 (1958)
- Brzózka K., Finke S., Conzelmann K.K.: Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J. Virol.* **79**, 7673–7681 (2005)
- Brzózka K., Finke S., Conzelmann K.K.: Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2. *J. Virol.* **80**, 2675–2683 (2006)
- Ceballos N.A., Morón S.V., Berciano J.M., Nicolás O., López C.A., Juste J., Nevado C.R., Setién Á.A., Echevarría J.E.: Novel *Lyssavirus* in Bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 793–795 (2013)
- Ceccaldi P.E., Valtorta F., Braud S., Hellio R., Tsiang H.: Alteration of the actin-based cytoskeleton by rabies virus. *J. Gen. Virol.* **78**, 2831–2835 (1997)
- Chopy D., Detje C.N., Lafage M., Kalinke U., Lafon M.: The type I interferon response bridges rabies virus infection and reduces pathogenicity. *J. Neurovirol.* **17**, 353 (2011)
- Faber M., Pulmanusahakul R., Hodawadekar S.S., Spitsin S., McGettigan J.P., Schnell M.J., Dietzschold B.: Overexpression of the rabies virus glycoprotein results in enhancement of apoptosis and antiviral immune response. *J. Virol.* **76**, 3374–3381 (2002)
- Familusi J.B., Moore D.L.: Isolation of a rabies related virus from the cerebrospinal fluid of a child with “aseptic meningitis”. *Afr. J. Med. Sci.* **3**, 93–96 (1972)
- Finke S., Conzelmann K.K.: Replication strategies of rabies virus. *Virus. Res.* **111**, 120–131 (2005)
- Francis J.R., Nourse C., Vaska V.L., Calvert S., Northill J.A., McCall B., Mattke A.C.: Australian Bat Lyssavirus in a Child: The First Reported Case. *Pediatrics*, **133**, e1063–e1067 (2014)
- Główny Inspektor Sanitarny: Komunikat Głównego Inspektora Sanitarnego w sprawie Programu Szczepień Ochronnych na rok 2018. *Dziennik Urzędowy Ministra Zdrowia*, **poz. 108**, Warszawa (2017)
- Hanna J.N., Carney I.K., Smith G.A., Deverill J.E., Botha J.A., Serafin I.L., Barrower B.J., Fitzpatrick P.F., Searle J.W.: Australian bat lyssavirus infection: a second human case, with a long incubation period. *Med. J. Aust.* **172**, 597–599 (2000)
- Hooper D.C.: The role of immune responses in the pathogenesis of rabies. *J. Neurovirol.* (2005)
- International Committee on Taxonomy of Viruses: Genus: *Lyssavirus*, https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus (27.02.2019)
- International Committee on Taxonomy of Viruses: Taxonomy, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (27.02.2019)
- Johnson N., Cunningham A.F., Fooks A.R.: The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine*, **28**, 3896–3901 (2010)
- Johnson N., Selden D., Parsons G., Healy D., Brookes S.M., McElhinney L.M., Hutson A.M., Fooks A.R.: Isolation of Euro-

- pean bat *lyssavirus* type 2 from Daubenton's bat in the United Kingdom. *Vet. Rec.* **152**, 387 (2003)
24. Kell A.M., Gale Jr M.: RIG-I in RNA virus recognition. *Virology*, **479**, 110–121 (2015)
 25. Kgaladi J., Wright N., Coertse J., Markotter W., Marston D., Fooks A.R., Freuling C.M., Müller T.F., Sabeta C.T., Nel L.H.: Diversity and epidemiology of *Mokola virus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2511 (2013)
 26. Kowalinski E., Lunardi T., McCarthy A.A., Louber J., Brunel J., Grigorov B. i wsp.: Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell*, **147**, 423–435 (2011)
 27. Lahaye X., Vidy A., Pomier C., Obiang L., Harper F., Gaudin Y., Blondel D.: Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J. Virol.* **83**, 7948–7958 (2009)
 28. Markotter W., Randles J., Rupprecht C.E., Sabeta C.T., Taylor P.J., Wandeler A.I., Nel L.H.: *Lagos Bat Virus*, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 504–506 (2006)
 29. Marzec A., Smreczak M., Żmudziński J.F.: Taksonomia rodzaju *Lyssavirus*. *Med. Wet.* **72**, 281–283 (2016)
 30. Masatani T., Ito N., Shimizu K., Ito Y., Nakagawa K., Sawaki Y. i wsp.: Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response. *J. Virol.* **84**, 4002–4012 (2010)
 31. Masatani T., Ozawa M., Yamada K., Ito N., Horie M., Matsuo A. i wsp.: Contribution of the interaction between the rabies virus P protein and I-kappa B kinase – to the inhibition of type I IFN induction signalling. *J. Gen. Virol.* **97**, 316–326 (2016)
 32. Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A.: *Mikrobiologia*, red. Przondo-Mordarska A., Martirosian G., Szkaradkiewicz A., Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2011, s. 569–573
 33. Nakamichi K., Inoue S., Takasaki T., Morimoto K., Kurane I.: Rabies virus stimulates nitric oxide production and CXC chemokine ligand 10 expression in macrophages through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J. Virol.* **78**, 9376–9388 (2004)
 34. National Association of State Public Health Veterinarians, Compendium of Animal Rabies Prevention and Control Committee, Brown C.M., Slavinski S., Ettestad P., Sidwa T.J., Sorhage F.E.: Compendium of animal rabies prevention and control, 2016. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **248**, 505–517 (2016)
 35. Niu X., Wang H., Fu Z.F.: Role of Chemokines in Rabies Pathogenesis and Protection. *Adv. Virus. Res.* (2011)
 36. Ostrowska J.D., Hermanowska-Szpakowicz T.: Wścieklizna i jej profilaktyka u ludzi. *Med. Wet.* **53**, 144–147 (1997)
 37. Pancer K., Gut W., Litwińska B.: Filowirusy – wirusy obecne od milionów lat – dlaczego teraz wybuchła tak wielka epidemia? *Post. Mikrobiol.* **55**, 205–214 (2016)
 38. Pawan J.L.: Rabies in the vampire bat of Trinidad, with special reference to the clinical course and the latency of infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **30**, 101–129 (1936)
 39. Pawan J.L.: The transmission of paralytic rabies in Trinidad by the vampire bat (*Desmodus rotundus murinus* Wagner, 1840). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **30**, 137–156 (1936)
 40. Paweska J.T., Blumberg L.H., Liebenberg C., Hewlett R.H., Grobelaar A.A., Leman P.A., Croft J.E., Nel L.H., Nutt L., Swanepoel R.: Fatal Human Infection with Rabies-related *Duvenhage Virus*, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1965–1967 (2006)
 41. Poisson N., Real E., Gaudin Y., Vaney M.C., King S., Jacob Y. i wsp.: Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P. *J. Gen. Virol.* **82**, 2691–2696 (2001)
 42. Rieder M., Brzózka K., Pfaller C.K., Cox J.H., Stitz L., Conzelmann K.K.: Genetic dissection of interferon-antagonistic functions of rabies virus phosphoprotein: inhibition of interferon regulatory factor 3 activation is important for pathogenicity. *J. Virol.* **85**, 842–852 (2011)
 43. Rieder M., Finke S., Conzelmann K.K.: Interferon in *lyssavirus* infection. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **125**, 209–218 (2012)
 44. Rodney E., Rupprecht C.E. i wsp.: Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2508–2514 (2005)
 45. Rosner F.: Rabies in the Talmud. *Med. Hist.* **18**, 198 (1974)
 46. Rupprecht C.E., Smith J.S., Fekadu M., Childs J.E.: The ascension of wildlife rabies: a cause for public health concern or intervention?. *Emerg. Infect. Dis.* **1**, 107 (1995)
 47. Rynans S., de Walthoffen S.W., Dzieciatkowski T., Młynarczyk G.: Wirusowe zakażenia ośrodkowego układu nerwowego. Część II: Wirusy RNA. *Post. Mikrobiol.* **4**, 349–354 (2013)
 48. Sadowska-Todys M.: Wścieklizna – aktualne problemy epidemiologiczne. *Pol. Przegl. Neurol.* **2**, 37–42 (2006)
 49. Samorek-Salamonowicz E., Niczyporuk J.S.: Wirus Zachodniego Nilu oraz inne nowo pojawiające się zagrożenia zdrowia publicznego. *Post. Mikrobiol.* **3**, 187–190 (2010)
 50. Schatz J., Freuling C.M. i wsp.: Bat rabies surveillance in Europe. *Zoonoses Public Health.* **60**, 22–34 (2013)
 51. Serra-Cobo J., Amengual B., Abellán C., Bourhy H.: European bat *lyssavirus* infection in Spanish bat populations. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 413 (2002)
 52. SIB Swiss Institute of Bioinformatics: *Lyssavirus*, ViralZone, <https://viralzone.expasy.org/22> (22.04.2018)
 53. Speare R., Skerratt L., Foster R., Berger L., Hooper P., Lunt R., Blair D., Hansman D., Goulet M., Cooper S.: Australian bat *lyssavirus* infection in three fruit bats from north Queensland. *Commun. Dis. Intell.* **21**, 117–120 (1997)
 54. Tan G.S., Preuss M.A., Williams J.C., Schnell M.J.: The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7229–7234 (2007)
 55. Tignor G.H., Murphy F.A., Clark H.F., Shope R.E., Madore P., Bauer S.P., Buckley S.M., Meredith C.D.: Duvenhage Virus: Morphological, Biochemical, Histopathological and Antigenic Relationships to the Rabies Serogroup. *J. Gen. Virol.* **37**, 595–611 (1977)
 56. van Thiel P.P.A.M., van den Hoek J.A.R., Eftimov F., Tepaske R., Zaaijer H.J., Spanjaard L., de Boer H.E.L., van Doornum G.J.J., Schutten M., Osterhaus A.D., Kager P.A.: Fatal case of human rabies (*Duvenhage virus*) from a bat in Kenya: the Netherlands, December 2007. *Eurosurveillance*, **13**, 1–2 (2008)
 57. Vázquez-Morón S., Avellón A., Echevarría J.E.: RT-PCR for detection of all seven genotypes of *Lyssavirus* genus. *J. Virol. Methods*, **135**, 281–287 (2006)
 58. Von Teichman B.F., De Koker W.C., Bosch S.J.E., Bishop G.C., Meredith C.D., Bingham J.: *Mokola virus* infection: description of recent South African cases and a review of the virus epidemiology: case report. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **69**, 169–171 (1998)
 59. Walker P.J., Blasdel K.R., Calisher C.H., Dietzgen R.G., Kondo H., Kurath G. i wsp.: ICTV virus taxonomy profile: Rhabdoviridae. *J. Gen. Virol.* **99**, 447–448 (2018)
 60. WHO/Department of Control of Neglected Tropical Diseases: Rabies vaccines: WHO position paper – April 2018 – Weekly epidemiological record (2018)
 61. Wilde H., Hemachudha T.: The “Milwaukee protocol” for treatment of human rabies is no longer valid. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **34**, 678–9 (2015)

62. Willoughby R.E., Opladen T., Maier T., Rhead W., Schmiedel S., Hoyer J., Drosten C., Rupprecht C.E., Hyland K., Hofmann G.F.: Tetrahydrobiopterin deficiency in human rabies. *J. Inherit. Metab. Dis.* **32**, 65–72 (2009)
63. Wiltzer L., Okada K., Yamaoka S., Larrous F., Kuusisto H.V., Sugiyama M. i wsp.: Interaction of rabies virus P-protein with STAT proteins is critical to lethal rabies disease. *J. Infect. Dis.* **209**, 1744–1753 (2013)
64. World Health O.: Rabies vaccines: WHO position paper, April 2018 – Recommendations. *Vaccine*, (2018)
65. World Health Organization: WHO expert consultation on rabies: first report. World Health Organization 2005, Geneva (2004)
66. Zandi F., Eslami N., Torkashvand F., Fayaz A., Khalaj V., Vaziri B.: Expression changes of cytoskeletal associated proteins in proteomic profiling of neuroblastoma cells infected with different strains of rabies virus. *J. Med. Virol.* **85**, 336–347 (2013)
67. Zeiler F.A., Jackson A.C.: Critical appraisal of the Milwaukee protocol for rabies: this failed approach should be abandoned. *Can. J. Neurol. Sci.* **43**, 44–51 (2015)

PREWALENCJA SYMPTOMATYCZNYCH DERMATOFITÓZ U PSÓW I KOTÓW ORAZ PATOMECHANIZM INFEKЦИИ DERMATOFITOWYCH

Dominik Łagowski¹, Sebastian Gnat^{1,*}, Aneta Nowakiewicz¹, Marcelina Osińska¹, Przemysław Zięba²

¹Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej
²Zakład Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Wpłynęło w lutym, zaakceptowano w maju 2019 r.

Streszczenie: Dermatofitozy są chorobami skóry spowodowanymi zakażeniem jej powierzchniowych warstw oraz innych skeratynizowanych struktur takich jak włosy i paznokcie przez grzyby określane mianem dermatofitów. W literaturze naukowej opisanych jest ponad 50 gatunków dermatofitów sklasyfikowanych w rodzajach *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Arthroderma*, *Lophophyton* i *Paraphyton*. Dermatofity uważane są za patogeny, nie stanowią składnika mikrobioty skóry, a ich występowanie u zwierząt oraz ludzi nie może być uznane za naturalne. Przegląd literatury naukowej pod kątem występowania i rozpowszechnienia dermatomykoz u zwierząt towarzyszących ujawnił znaczne różnice w prewalencji infekcji pomiędzy rasami. Jako zasadnicze czynniki epidemiologiczne najczęściej wymieniane są: pochodzenie zwierzęcia oraz typ występującej infekcji. W tym kontekście ciekawych danych dostarczają wyniki badań nad grzybiczą mikrobiotą sierści kotów i psów. Interesujące, że wśród wymienianych gatunków dermatofitów bytujących na skórze zwierząt bez objawów infekcji znalazł się antropofil *Trichophyton rubrum*. Czy nosicielstwo tego gatunku u zwierząt ma znaczenie w epidemiologii infekcji u ludzi? Dodatkowo, hodowcy zwierząt i lekarze weterynarii wyrażają przeświadczenie o dużej wrażliwości na infekcje dermatofitowe tylko niektórych ras psów i kotów. Mechanizm patogenyzy infekcji dermatofitowej nie jest jeszcze do końca poznany, jednak możemy wyróżnić w nim trzy główne etapy: adhezję arthrospór do korneocytów, ich kiełkowanie i rozwój mycelium oraz penetrację grzyba do skeratynizowanych tkanek. Cykl życiowy dermatofita zamyka się szybciej aniżeli ujawniają się pierwsze objawy infekcji, co może stanowić zagrożenie epidemiologiczne. Czynniki wirulencji dermatofitów są różnorakie egzoenzymy, wśród których najczęściej wymienia się keratynazę, proteazę, lipazę, fosfolipazę, żelatynazę, DNazę oraz toksyny powodujące zjawisko hemolizy odpowiadające za zapewnianie patogenom substancji odżywczych i utrzymanie się w *stratum corneum* gospodarza. Zewnętrznym odzwierciedleniem działania czynników wirulencji dermatofitów są objawy kliniczne infekcji.

1. Wprowadzenie. 2. Dermatofitozy u psów i kotów. 2.1. Problemy diagnostyczne w dermatofitozach zoofilnych. 2.2. Prewalencja dermatofitoz u psów i kotów. 2.3. Czynniki predysponujące do dermatofitoz. 2.4. Predylekcje rasowe w infekcjach dermatofitowych. 3. Patogeneza i czynniki wirulencji dermatofitów. 3.1. Rozwój infekcji dermatofitowej. 3.2. Patogeneza infekcji. 3.3. Czynniki wirulencji dermatofitów. 3.4. Objawy kliniczne w dermatomykozach psów i kotów. 3.5. Odpowiedź immunologiczna gospodarza. 4. Podsumowanie

PREVALENCE OF SYMPTOMATIC DERMATOPHYTOSES IN DOGS AND CATS AND THE PATHOMECHANISM OF DERMATOPHYTE INFECTIONS

Abstract: Dermatophytoses are skin diseases related to infection of surface layers of skin and other keratinised structures such as hair and nails, caused by fungi referred to as dermatophytes. The scientific literature provides descriptions of over 50 dermatophytic species classified in the genera *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Arthroderma*, *Lophophyton*, and *Paraphyton*. Dermatophytes are regarded as pathogens; they are not a component of skin microbiota and their occurrence in animals and humans cannot be considered natural. The review of the scientific literature focused on the occurrence and prevalence of dermatomycoses in companion animals revealed significant differences in the prevalence of the infections. Two main factors are most frequently assumed to have the greatest epidemiological importance, i.e. the animal origin and the type of infection. In this aspect, interesting data are provided by investigations of the fungal microbiota present in cat and dog coat. Interestingly, an anthropophilic species *Trichophyton rubrum* was found to be one of the species of dermatophytes colonising the skin of animals that did not present symptoms of infection. Is the carrier state of this species important in the epidemiology of human infections? Additionally, animal breeders and veterinarians claim high sensitivity of only some breeds of dogs and cats to dermatophyte infections. The pathomechanism of dermatophyte infections has not been fully elucidated yet; however, three main stages can be distinguished: adhesion of arthrospores to corneocytes, their germination and development of mycelium, and fungal penetration into keratinised tissues. Importantly, the dermatophyte life cycle ends before the appearance of the first symptoms of the infection, which may pose an epidemiological threat. Dermatophyte virulence factors include various exoenzymes, mainly keratinase, protease, lipase, phospholipase, gelatinase, and DNase as well as toxins causing haemolysis responsible for nutrient supply to pathogens and persistence in the *stratum corneum* of the host. Clinical symptoms of the infection are an external manifestations of the dermatophyte virulence factors.

1. Introduction. 2. Dermatophytoses in dogs and cats 2.1. Diagnostic problems in zoophilic dermatophytoses 2.2. Prevalence of dermatophytosis in dogs and cats 2.3. Dermatophytosis predisposing factors 2.4. Breed predilections in dermatophyte infections 3. Pathogenesis and dermatophyte virulence factors 3.1. Development of dermatophyte infection 3.2. Pathogenesis of infection 3.3. Dermatophyte virulence factors. 3.4. Clinical symptoms in canine and feline dermatomycoses 3.5. Host immune response. 4. Summary

* Autor korespondencyjny: dr hab. Sebastian Gnat, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Instytut Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt, Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; tel. 81 445 60 93; e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl

Słowa kluczowe: dermatomykozy, dermatofity, prewalencja infekcji, czynniki wirulencji, patogenezę
Key words: dermatomycoses, dermatophytes, infection prevalence, virulence factors, pathogenesis

1. Wprowadzenie

Dermatomykozy są chorobami skóry spowodowanymi zakażeniem jej powierzchniowych warstw oraz innych sklerotyzowanych struktur takich jak włosy i paznokcie przez grzyby określane mianem dermatofitów [106]. Ze względu na przystosowanie życiowe te mikroorganizmy eukariotyczne można podzielić na trzy grupy: atakujące ludzi określane jako antropofilne, związane ze zwierzętami – zoofilne i żyjące w glebie – geofilne [35, 44]. Dermatofity należą do organizmów eurybiotycznych, występujących na całym świecie [106]. Grzybyce powierzchniowe skóry stanowią ważną jednostkę chorobową z powodu ich wysoce zaraźliwego charakteru, znacznego potencjału zoonotycznego oraz słabo wyrażonych objawów klinicznych, które dodatkowo mogą imitować inne choroby. Dermatomykozy u większości immunokompetentnych gospodarzy mają charakter samoograniczający się i mogą ustępować samoistnie w ciągu kilku tygodni lub miesięcy. Niemniej jednak właściwe postawienie rozpoznania oraz wprowadzenie odpowiedniego leczenia, nie tylko skraca czas potrzebny do wyleczenia pacjenta, ale również zabezpiecza przed rozprzestrzenieniem się artrospor dermatofitów na inne zwierzęta i ludzi, którzy mają bezpośredni kontakt z osobnikiem zakażonym lub korzystają z tych samych przyborów do pielęgnacji oraz utrzymania higieny [40, 43].

W literaturze naukowej opisanych jest ponad 50 gatunków dermatofitów sklasyfikowanych w rodzajach *Trichophyton* (Malmsten 1848), *Microsporum* (Gruby 1843), *Epidermophyton* (Sabour. 1907), *Nannizzia* (Stockdale 1961), *Arthroderma* (Curr. 1860), *Lophophyton* (Matr. & Dassonv. 1899) i *Paraphyton* (Y. Gräser, Dukik & de Hoog 2018) [28, 48]. Liczną grupę dermatofitów stanowią gatunki zoofilne, obecnie mykologicy zaliczają do niej ponad 30 przedstawicieli [28, 48]. Dermatofity zoofilne wytworzyły szereg adaptacji, szczególnie dotyczących ich aktywności metabolicznej, które umożliwiają im przeżycie w *stratum corneum* gospodarzy zwierzęcych [39]. Najczęściej wymienianymi gatunkami dermatofitów zoofilnych o dużym znaczeniu epidemiologicznym są *Trichophyton mentagrophytes* (C.P. Robin 1895) związany z infekcjami u zwierząt futerkowych, *Trichophyton verrucosum* (E. Bodin 1902) mający szczególne powinowactwo do keratyny bydłowej, *Microsporum canis* (E. Bodin ex Guég. 1902) związany z infekcjami u psów i kotów, *Microsporum equinum* (E. Bodin ex Guég. 1907) i *Trichophyton equinum* (Geddoelst 1902) atakujący konie, *Microspo-*

rum persicolor (Guiart & Grigoraki 1928) izolowany od gryzoni, *Microsporum nanum* (C.A. Fuentes 1956) od trzody chlewnej [40, 41, 43, 106, 109].

2. Dermatofitozy u psów i kotów

2.1. Problemy diagnostyczne w dermatofitozach spowodowanych przez gatunki zoofilne

Klinicyści i diagnosty mikrobiologiczni posługują się najczęściej nomenklaturą form bezpłciowych dermatofitów, zwanych anamorfami. W rzeczywistości, to właśnie te formy izolowane są najczęściej z przypadków klinicznych dermatomykoz u zwierząt (rodzaje *Trichophyton* i *Microsporum*) [44, 106]. Należy jednak pamiętać, że w warunkach laboratoryjnych udało się uzyskać stadia płciowe niektórych gatunków dermatofitów, określane jako stadia doskonałe lub teleomorfy, co w konsekwencji doprowadziło do wyodrębnienia rodzaju *Arthroderma*, a pośrednio także utworzenia kompleksów gatunków *Trichophyton benhamiae* kompleks, *Trichophyton mentagrophytes* kompleks i *Microsporum canis* kompleks [28, 100, 101]. Głównym problemem na jaki natrafiają diagnosty, wynikającym z przeprowadzonych doświadczeń krzyżowania płciowego, jest występowanie podwójnego systemu klasyfikacji i nazewnictwa dla dermatofitów. Tradycyjnie używana nazwa *T. mentagrophytes*, jest *sensu stricto* kompleksem kilku różnych gatunków dermatofitów zarówno zoofilnych jak i antropofilnych, które zostały zróżnicowane na podstawie preferencji do typu keratyny, cech morfologicznych, molekularnych i stadium płciowego [74, 100, 101]. Zoofilne gatunki należące do anamorficznego kompleksu *T. mentagrophytes* sklasyfikowano teleomorficznie jako *Arthroderma benhamiae* (Ajello & S.L. Cheng 1967) na podstawie doświadczeń koniugacji szczepów wyizolowanych od gryzoni – w tym od świnek morskich, a także od psów i kotów. Natomiast teleomorfa *Arthroderma vanbreuseghemii* (Takashio 1973) odpowiada zoofilnym szczepom *T. mentagrophytes* izolowanym głównie od myszy i szynszyli, ale w licznych przypadkach również od psów i kotów; oraz co najważniejsze, od ludzi mających kontakt ze zwierzętami towarzyszącymi wykazującymi objawy kliniczne, jak i będącymi bezobjawowymi nosicielami [33, 96]. Z kolei *Trichophyton interdigitale* (Priestley 1917) jest ściśle antropofilnym, anamorficznym gatunkiem należącym do kompleksu *T. mentagrophytes*, dla którego nie wykazano tworzenia

formy doskonałej [44]. Należy pamiętać, że deklaracja amsterdamska w sprawie nazewnictwa grzybów przyjęta w 2011 roku, wskazała, aby każdy mikroorganizm eukariotyczny posiadał tylko jedną formalnie używaną nazwę nomenklaturyczną [67].

Procesy płciowe są jeszcze bardziej skomplikowane dla gatunków geofilnych, np. anamorf *Microsporium gypseum* (Guiart & Grigoraki 1928) jest obecnie uznawany za kompleks trzech odrębnych gatunków teleomorficznych: *Arthroderma fulvum* (Weitzman, McGinnis, A.A. Padhye & Ajello 1986), *A. gypseum* (Weitzman, McGinnis, A.A. Padhye & Ajello 1986) i *A. incurvatum* (Weitzman, McGinnis, A.A. Padhye & Ajello 1986), u których nie dochodzi do międzygatunkowej koniugacji [100, 101]. Chociaż geofilne gatunki dermatofitów są najczęściej związane z rozkładem keratyny pochodzenia odzwierzęcego, która obecna jest w glebie, niektóre z tych organizmów mogą wywoływać infekcje u ludzi i zwierząt [66]. Naturalnym miejscem bytowania dermatofitów geofilnych są stanowiska zlokalizowane wokół siedlisk (nor, jam) określonych gatunków ssaków lądowych [15]. Psy myśliwskie mające kontakt z glebą są grupą szczególnie narażoną na infekcje pochodzenia geofilnego. Dodatkowo, ta grupa grzybów może być mechanicznie przenoszona przez zwierzęta na powłokach zewnętrznych [15, 35, 43], imitując bezobjawowe nosicielstwo, co powoduje, że różnica w zajmowanych niszach ekologicznych przez dermatofity geofilne i zoofilne nie zawsze jest ostra. Diagnostyka tych dermatofitów jest znacznie utrudniona, szczególnie w aspekcie odróżnienia ich od infekcji o etiologii zoofilnej.

Omówione problemy diagnostyczne nie są jedynymi napotykanymi w identyfikacji grzybów zoofilnych.

Nowy system klasyfikacji dermatofitów zaproponowany przez zespół Sybrena De Hoog [28] oparty jest w głównej mierze na kryterium molekularnym. Relacje taksonomiczne w obrębie rodziny *Arthrodermataceae* w tym systemie modelowo przedstawia drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie analizy regionu ITS (ang. Internal Transcribed Spacer) rDNA [28, 44]. Wyznaczone kryterium nie ma jednak dostatecznie silnej zdolności dyskryminacyjnej do różnicowania gatunków dermatofitów o odmiennych przystosowaniach ekologicznych [44]. Dwa gatunki: *T. mentagrophytes* i *T. interdigitale*, które pod względem sekwencji ITS są jednolite genomowo [46], wykazują zupełnie odrębne przystosowania ekologiczne. Pierwszy z nich jest *stricte* antropofilny, drugi – zoofilny [43, 44, 46]. Podobnie, kryterium klasyfikacyjne oparte na ITS rDNA nie umożliwia zróżnicowania zoofilnego *T. equinum* od antropofilnego *T. tonsurans* [46]. Problem dotyczy także dermatofitów z rodzaju *Microsporium*, niektóre gatunki zoofilne, w tym *M. canis* i *M. equinum*, są filogenetycznie blisko spokrewnione z gatunkami antropofilnymi, takimi jak *M. ferrugineum* (M. Ota 1921) i *M. audouinii* (Gruby 1843) [46, 49, 95]. Wymienione przykłady dotyczą zasadniczego problemu w mykologii medycznej, jakim jest specyficzność ekologiczna dermatofitów i występowanie ścisłych rezerwuarów związanych z gospodarzem (Tabela I).

2.2. Prewalencja dermatofitów u psów i kotów

Przegląd literatury naukowej z 29 krajów świata dotyczącej problematyki występowania i rozpowszechnienia dermatofitów u zwierząt towarzyszących ujawnił

Tabela I
Rezerwuary najczęściej izolowanych gatunków dermatofitów zoofilnych, częstotliwość ich transmisji na ludzi oraz regiony występowania

Gatunek	Gospodarz	Częstotliwość u ludzi	Występowanie
<i>Microsporium canis</i>	Koty, psy	często	Na całym świecie
<i>Microsporium equinum</i>	Konie	rzadko	Afryka, Australia, Europa, Nowa Zelandia, Ameryka
<i>Microsporium gallinae</i>	Kury, indyki	rzadko	Na całym świecie
<i>Microsporium gypseum</i>	Konie, psy, gryzonie	rzadko	Na całym świecie
<i>Microsporium nanum</i>	Świnie	rzadko	Ameryka, Europa, Australia
<i>Microsporium persicolor</i>	Gryzonie, nornice	rzadko	Europa, północna Ameryka
<i>Trichophyton equinum</i>	Konie	sporadycznie	Na całym świecie
<i>Trichophyton equinum var. autotrophicum</i>	Konie	rzadko	Australia, Nowa Zelandia
<i>Trichophyton erinacei</i>	Psy, jeże	sporadycznie	Europa, Nowa Zelandia
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Gryzonie, psy, konie, inne zwierzęta	często	Na całym świecie
<i>Trichophyton verrucosum</i>	Bydło	często	Na całym świecie
<i>Trichophyton simii</i>	Małpy, drób, psy	rzadko	Indie, Brazylia

znaczne różnice w prevalencji infekcji. Dwa główne czynniki, które były najczęściej wymieniane jako zasadnicze epidemiologiczne, to sposób utrzymania zwierzęcia (domowe, w tym wolno wychodzące, dziko żyjące, mające dostęp do wolnego wybiegu, hodowlane lub laboratoryjne) oraz typ występującej infekcji (objawowa lub bezobjawowa) [39, 41, 70, 71, 91]. Ze względu na szeroki zakres stosowanej metodologii w badaniach różnych ośrodków naukowych, bezpośrednio porównanie wyników nie było możliwe, ale zaznaczone zostały wyraźne tendencje prevalencji dermatofitów u zwierząt. Dermatofity były częściej izolowane od zwierząt z wyraźnymi objawami infekcji w porównaniu do zwierząt będących nosicielami bezobjawowymi, a także od zwierząt przebywających w grupach lub tych, których możliwości poruszania się nie były ograniczone, zwłaszcza dotyczyło to kotów. W rejonach o ciepłym klimacie, szczególnie w Brazylii, Chile, Indiach, Włoszech i w południowej części Stanów Zjednoczonych częstość izolacji dermatofitów od zwierząt była wyraźnie większa niż w przypadku rejonów o umiarkowanym lub chłodnym klimacie [12, 13, 15, 16].

Dermatofity uważane są za patogeny, nie stanowią składnika mikrobioty skóry, a ich występowanie u zwierząt oraz ludzi nie może być uznane za naturalne [44]. Najnowsze wyniki badań dotyczące mikrobioty skórnej u zdrowych jak i alergicznych kotów i psów z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji (NGS, Next Generation Sequencing) nie wykazały, aby dermatofity stanowiły część naturalnej bioty skórnej [70, 106]. Wnioski te potwierdza obecne stanowisko środowiska mikrobiologów wskazujące, że wszystkie gatunki grzybów strzępkowych wyizolowanych z sierści zdrowych zwierząt są wynikiem jej zanieczyszczenia przez zarodniki znajdujące się w środowisku, a nie stanowią właściwej flory skóry, jak w przypadku bakterii [15, 75, 76].

W tym kontekście ciekawych danych dostarczają wyniki badań nad grzybiczą mikrobiotą sierści kotów i psów. Od kotów niewykazujących żadnych klinicznych objawów dermatomykoz, została wyizolowana zróżnicowana pod względem gatunkowym grupa grzybów, która obejmowała 15 rodzajów, z czego 13 stanowiły grzyby saprofityczne, obejmujące głównie gatunki rodzajów: *Aspergillus* (P. Micheli 1729), *Alternaria* (Nees 1816), *Penicillium* (Link 1809) i *Cladosporium* (Link 1816), a tylko dwa to dermatofity: *M. gypseum* i *A. vanbreuseghemii* [41, 70, 71]. Co ciekawe, wśród gatunków dermatofitów wyizolowanych od 14 kotów bez objawów dermatomykozy, z których siedem przetrzymywanych było w domach jednorodzinnych, a siedem w wielorodzinnych, znalazł się antropofil *Trichophyton rubrum* (Sabour. 1911) [75]. W tym samym czasie żaden z właścicieli nie skarżył się na występowanie jakichkolwiek zmian skórnych, co świadczyło o braku zakażenia właścicieli przez koty bądź domowników między

sobą. Natomiast w innym badaniu, *T. rubrum* został zidentyfikowany w sierści czterech ze 176 badanych kotów, a u właścicieli zdiagnozowano *tinea pedis* [76]. Interesujące jest, że wszystkie z badanych kotów, należące do 14 różnych ras z siedmiu hodowli, przebywały wyłącznie w domach i w obrębie hodowli miały między sobą ciągły kontakt. Jedynie w jednej z hodowli odnotowano trzy przypadki opuszczenia hodowli i okazjonalnego kontaktu z kotem przebywającym wyłącznie na zewnątrz [76]. Z kolei najczęściej izolowanymi grzybami ze skóry psów bez dermatomykoz były gatunki pleśni należące do rodzajów *Cladosporium* i *Alternaria*. Nie stwierdzono izolacji żadnych gatunków dermatofitów [15].

Analiza częstości diagnozowania dermatomykoz u psów i kotów w klinikach weterynaryjnych na całym świecie pozwoliła wysnuć wniosek, że objawowe infekcje dermatofitowe są rzadko stawianym rozpoznaniem. W badaniach przeprowadzonych w latach 1988–2003 w Stanach Zjednoczonych na grupie 1407 kotów stwierdzono, że dermatofitozy zostały zdiagnozowane tylko u 45 (2,4%) kotów, zdecydowanie rzadziej niż alergie i/lub przypadki atopowego zapalenia skóry (26%), bakteryjne zakażenia skóry (10%), nużyce (6,1%), czy inwazje pcheł (5,2%) [94]. Jeszcze niższą prevalencję dermatomykoz odnotowano w Kanadzie, gdzie tylko u czterech ze 111 kotów (3,6%) i u 3 z 419 psów (0,71%) postawiono takie rozpoznanie [93]. W Europie badania takie prowadzone były w ośrodkach weterynaryjnych w Wielkiej Brytanii. Grzybicze dermatofitowe stwierdzono u dwóch spośród 154 badanych kotów (1,3%) i u trzech z 559 psów (0,53%) [56]. Ciekawych danych dostarczają badania statystyczne przeprowadzone w Wielkiej Brytanii na podstawie analizy dokumentacji medycznej 91 klinik i przychodni weterynaryjnych z okresu 5 lat (2009–2014). Problemy dermatologiczne u 142 576 przebadanych w tym okresie kotów stanowiły jedynie 10,4% zdiagnozowanych chorób. Szkoda, że w badaniu nie uwzględniono dermatomykoz jako osobnych jednostek chorobowych, co może jednak sugerować, że występują one bardzo rzadko i stanowią problem marginalny [84]. Natomiast w pracy Hobi i wsp. dotyczącej przyczyn świądu u kotów, w grupie 502 badanych kotów, u 11 (2,1%) z nich zdiagnozowano dermatofitozę [57]. Należy zaznaczyć, że przedstawione dane dotyczą wyłącznie zakażeń symptomatycznych u psów i kotów. Z epidemiologicznego punktu widzenia największe znaczenie mają dermatofitozy asymptomatyczne, określane często jako nosicielstwo.

2.3. Czynniki predysponujące do dermatofitoz

Najczęściej wymienianymi czynnikami usposabiającymi do występowania symptomatycznych dermatomykoz są: wiek zwierzęcia, możliwość swobodnego poru-

szania się po otwartym terenie, zagęszczenie w populacji oraz klimat w jakim przebywają [69, 73, 97]. Podaje się, że osobniki młodociane (kocięta i szczenięta), żyjące w dużym zagęszczeniu innych zwierząt, szczególnie w krajach o ciepłym i wilgotnym klimacie, dodatkowo dysponujące możliwością opuszczania domów są predysponowane do infekcji dermatofitowych [25, 41, 53, 106]. Ważne miejsce w ocenie czynników usposabiających do zakażeń zajmuje stan immunologiczny zwierząt. Powszechnie wiadomo, że choroby powodujące immunosupresję mogą predysponować koty i psy do rozwoju dermatomykoz, jak również innych chorób zakaźnych [97]. Ciekawych danych dostarczają prace Sierra i wsp. [97], Mancianti i wsp. [69] i Mignon i wsp. [73] dotyczące oceny czy kolonizacja grzybami u kotów z obniżoną funkcją układu immunologicznego, w tym asymptomatycznych nosicieli dermatofitów, może stanowić czynnik zwiększający ryzyko infekcji endogennych [69, 73, 97]. W pierwszej z wymienionych prac, badaniu poddano mykobiotę skóry u kotów seropozytywnych dla wirusa niedoboru odpornościowego (FIV, *Feline immunodeficiency virus*) (n=24), wirusa białaczki kotów (FeLV, *Feline leukemia virus*) (n=10) lub obu wirusów występujących u jednego osobnika jednocześnie (n=1) w porównaniu do mykobioty seronegatywnych wobec tych wirusów kotów, choć obciążonych innymi chorobami ogólnoustrojowymi (n=50). Badanie wykazało, że koty seropozytywne pod względem FIV i FeLV cechowały się większą różnorodnością saprofitycznej bioty grzybiczej skóry, a w szczególności grzybów z rodzaju *Malassezia* (Baill. 1889). Natomiast w przypadku dermatofitów nie było różnicy między kotami seropozytywnymi i seronegatywnymi, a wyizolowanymi gatunkami były *M. canis*, *M. gypseum*, *M. persicolor* i *Trichophyton terrestre* [97]. W pracy Mancianti porównaniu poddano mykobiotę skóry kotów dodatnich serologicznie pod względem FIV (n=35) i kotów seronegatywnych dla tego wirusa (n=55) [90]. Koty te pochodziły z hodowli domowych, schronisk dla zwierząt lub były wolno żyjące w przestrzeni miejskiej. Od 26 z 35 kotów seropozytywnych pod względem FIV (FIV+) i 14 z 55 kotów seronegatywnych (FIV-) wyizolowano *M. canis*, mimo, że zwierzęta te nie wykazywały żadnych objawów klinicznych wskazujących na dermatomykozę. Istotnym brakiem przedstawionych badań jest brak podziału na grupy zwierząt w zależności od miejsca bytowania. Z tego powodu niemożliwe jest określenie czy koty FIV+ pochodzące z hodowli domowych, schronisk lub wolno żyjące są bardziej podatne na międzyosobnicze transmisje *M. canis*, czy taka zależność nie występuje. Sprzecznych danych dostarczają wyniki badań prowadzonych przez Mignon i wsp., w których nie stwierdzono związku między infekcją FIV a nosicielstwem dermatofitów [73]. Ostateczne wnioski muszą być potwierdzone szerszymi analizami.

Niewiele jest doniesień naukowych dotyczących współwystępowania dermatomykoz z innymi chorobami powodującymi immunosupresję. Dostępny jest jeden opis przypadku kota z żółtakami (*xanthoma*) na skórze wraz ze współistniejącą nużycą i dermatofitozą [105]. W dwóch badaniach dotyczących leczenia lekami immunosupresyjnymi pęcherzycy liściastej u kotów, nie stwierdzono jednoczesnego rozwoju dermatofitozy [58, 90]. U jednego kota wystąpiła dermatofitoza wywołana przez *M. canis* w trakcie leczenia łysienia plackowatego z wykorzystaniem cyklosporyny [83]. W przypadku psów, opisano współwystępowanie infekcji dermatofitowych wraz z chorobami metabolicznymi [110]. Wyraźne predyspozycje zostały odnotowane przy zdiagnozowanym hiperadrenokortycyzmie [52, 110]. Inne opisane przypadki towarzyszących dermatomykoz dotyczą psów rasy Yorkshire terier z cukrzycą, a także z leiszmaniozą i/lub erlichiozą [21]. Dermatomykoza została zdiagnozowana również u psów z nużycą, dostępna jest jednak tylko jedna publikacja opisująca taki przypadek [3]. Zdaniem autorów takie współistniejące infekcje są bardziej powszechne niż można się tego spodziewać jeśli pod uwagę weźmie się również asymptomatyczne nosicielstwo.

2.4. Predylekcje rasowe w infekcjach dermatofitowych

Hodowcy zwierząt i lekarze weterynarii wyrażają przeświadczenie o dużej wrażliwości na infekcje dermatofitowe niektórych ras psów i kotów. Doniesienia naukowe nie potwierdzają jednoznacznie zależności między rasą a prewalencją dermatomykoz, a wszelkie informacje o predylekcjach rasowych funkcjonują tylko jako przypuszczenia. Jedną z najczęściej wymienianych ras kotów o dużej wrażliwości na infekcje dermatofitowe są koty perskie. Scott i wsp. wykazali, że 75% przypadków zdiagnozowanych dermatomykoz u kotów w Klinice Małych Zwierząt (Small Animal Clinic) na Uniwersytecie w Montrealu dotyczyła kotów perskich, ale całkowita liczba zdiagnozowanych w tym okresie przypadków wynosiła tylko cztery [93]. Podobnych obserwacji dokonali Lewis i wsp., w przeprowadzonych badaniach rozpoznano 61 przypadków dermatomykoz, z których 15 występowało u kotów perskich [67]. Należy jednak nadmienić, że w tym badaniu koty perskie były nadreprezentowane, stanowiły one bowiem 5% wszystkich przypadków dotyczących kotów w klinice weterynaryjnej, ale aż 24,6% kotów z grzybicą skóry [67]. Podobnie, jak w przypadku opisu badań z Wlk. Brytanii [84], w doniesieniach dotyczących leczenia dermatologicznego opisy przypadków u kotów perskich stanowią również najliczniejszą grupę wszystkich raportów, co może dodatkowo sugerować, że prewalencja dermatomykoz u tej rasy jest wysoka [8, 11, 22, 23, 59–62, 80, 81, 86, 103, 108]. Pierwsze próby zastosowania gryzeofulwiny

w leczeniu infekcji dermatofitowych dotyczyły właśnie kotów perskich, natomiast w trakcie badania farmakokinetyki i farmakodynamiki itrakonazolu, koty perskie stanowiły znaczną część każdej z grup badanych [61, 62]. Niemal bez wyjątku opisy przypadków podskórnych zakażeń wywoływanych przez dermatofity zostały odnotowane u ras długowłosych, w szczególności u kotów perskich [8, 11, 22, 60, 80, 81, 103, 108].

Niektóre rasy psów również wydają się być predysponowane do występowania infekcji dermatofitowych. W literaturze naukowej dostępnych jest kilka opisów przypadków, gdzie psy rasy Yorkshire terrier zostały sklasyfikowane jako predysponowane do powierzchniowych i podskórnych grzybic wywoływanych przez *M. canis* [7, 16, 20, 107]. Cafarchia i wsp. na podstawie przeprowadzonych badań podają, że spośród 55 psów z infekcją dermatofitową, aż 13 (23,6%) stanowiły psy rasy Yorkshire terrier [16], natomiast Brihante i wsp. dermatomykozę zdiagnozowali u 27 psów, z których 10 (37%) stanowiły psy tej rasy [14]. Nie jest to jedyna rasa psów o wysokiej prevalencji symptomatycznych infekcji dermatofitowych. Psy ras myśliwskich i pracujących, tj. wyżeł niemiecki krótkowłosa, foksterier szorstkowłosa, labrador retriever, groenendael, beagle, pointer, Jack Russell terrier, owczarek niemiecki i jagdterrier również wydają się być predysponowane do dermatomykoz, szczególnie powodowanych grzybami geofilnymi takimi jak *M. persicolor* (Guiart & Grigoraki 1928) i *M. gypseum* (Guiart & Grigoraki 1928), prawdopodobnie ze względu na zwiększony kontakt z glebą zawierającą artrospory [11, 20, 78].

3. Patogeneza i czynniki wirulencji dermatofitów

3.1. Rozwój infekcji dermatofitowej

Za formę infekcyjną dermatofitów uważa się artrospory, które są propagulami rozmnażania bezpłciowego, powstającymi w wyniku fragmentacji strzępek grzyba [76, 77, 78]. W literaturze zostały opisane dwie drogi transmisji artrospor: bezpośrednia i pośrednia [42]. Pierwsza z nich odnosi się do bezpośredniego kontaktu osobnika zakażonego, także asymptotycznie, ze zwierzęciem zdrowym [106]. Transmisja pośrednia obejmuje możliwości przeniesienia artrospor na osobnika zdrowego poprzez narzędzia do pielęgnacji skóry i sierści, pościel, obrożę oraz inne przybory mające kontakt ze zwierzęciem i osobami zakażonymi dermatofitami [42–44, 106]. W każdym z tych przypadków mikrourazy skóry stanowią ważnym czynnikiem w rozwoju infekcji [43].

W dermatomykozach wywołanych przez *M. canis* zazwyczaj drogą transmisji jest kontakt z zakażonym zwierzęciem, głównie kotem, albo ze skażonymi przy-

borami do pielęgnacji zwierzęcia [41]. W 2018 r. nasz zespół wykazał [41], że częstość zakażeń *M. canis* u zwierząt, u których doszło do uszkodzeń skóry, jest zwykle wyższa u kotów niż u psów, a ponad 90% kocich i 75% psich zmian skórnych jest etiologicznie związanych z tym grzybem. W przypadku infekcji spowodowanych przez zoofilne gatunki rodzaju *Trichophyton*, doniesienia naukowe ostatnich lat wskazują, że transmisja bezpośrednia i pośrednia związana jest z kontaktem z zarażonymi gryzoniami lub ich siedliskami [43]. Co więcej, odchody szczurze lub innych dzikich gryzoni pozostawiane w miejscach dostępu zwierząt, a nawet owady mające kontakt z tymi odchodami, są wymieniane jako wektory artrospor [25, 43]. Wskazanie źródła infekcji jest znacznie łatwiejsze w przypadku mniej powszechnych dermatofitów geofilnych. Zakażenia *M. gypseum* są spowodowane kontaktem ze skażoną glebą, szczególnie w miejscach nor i jam gryzoni [35, 44]. Innymi wymienianymi przyczynami tworzącymi dobre warunki do rozwoju dermatofitów są także mikrourazy skóry zwierząt, ze względu na występujący wówczas świąd i zwiększoną wilgotność, oraz inwazje ektopasożytów [82]. Znaczenie mikrourazów w rozwoju dermatomykozy potwierdzono *in vivo*. Laboracyjne wywołanie symptomatycznej infekcji dermatofitowej wymagało, aby powierzchnia skóry była lekko, mechanicznie uszkodzona i stale wilgotna przed inokulacją grzyba [30]. Dodatkowo, wylizywanie się kotów jest prawdopodobnie jednym z mechanizmów obronnych przed infekcją skóry [30]. Doświadczalne wywołanie infekcji grzybiczej w warunkach laboratoryjnych było trudne do osiągnięcia właśnie ze względu na wylizywanie się kotów, które w ten sposób pozbywały się artrospor z powierzchni skóry i sierści. Wymusiło to zastosowanie w badaniach obroży elżbietańskich, które uniemożliwiły wylizywanie się [30]. Dopiero wówczas doszło do rozwoju symptomów dermatomykozy w warunkach *in vitro*.

3.2. Mechanizm infekcji

Mechanizm infekcji dermatofitowej nie jest jeszcze do końca poznany, jednak możemy wyróżnić w nim trzy główne etapy. Na wstępie należy nadmienić, że obraz kliniczny dermatomykozy, stopień wyrażenia objawów i ich dotkliwość będą zależały od czynników zależnych w głównej mierze od stanu immunologicznego i wrażliwości organizmu gospodarza oraz zjadliwości samego grzyba [5, 6, 35]. Za pierwszy etap rozwoju infekcji należy uznać moment, w którym artrospory przylegają do korneocytów zrogowaciałej warstwy naskórka ludzi i zwierząt [41, 104]. Doniesienia naukowe podają, że ten pierwszy etap patogenyzy trwa od czterech do sześciu godzin, a jego mecha-

nizm oparty jest na działaniu sił elektrostatycznych pomiędzy specyficznymi adhezynami na powierzchni artrospora a korneocytami [5, 37, 104]. Ważnymi czynnikami w tym procesie są: optymalna temperatura (25–35°C), wysoka wilgotność (80%) oraz kwaśne pH (5,5–6,7) [4–6, 37, 104]. Istotną rolę odgrywają również gatunkowo specyficzne proteazy np. subtylizyny [37]. Drugim etapem patogenezы infekcji dermatofitowej jest kiełkowanie artrospora [2]. W badaniach *in vitro* wykazano odmienny czas germinacji zarodników w infekcji dermatofitami zoofilnymi u zwierząt i ludzi. W modelu z wykorzystaniem korneocytów zwierzęcych i izolatów *T. mentagrophytes* germinacja zarodników występowała w ciągu od 4 do 6 godzin od momentu nawiązania kontaktu, w przypadku modelu z ludzkim naskórkiem dopiero po 24 godzinach [2, 41]. Przyjmuje się, że rozpoczęcie wrastania mycelium w *stratum corneum* kończy ten etap patogenezы [34, 35]. Trzecim etapem jest penetracja grzyba do skeratynizowanych struktur gospodarza [34]. Rozrost mycelium jest najczęściej wielokierunkowy, co ma przełożenie na tempo rozprzestrzeniania infekcji [30]. W ciągu 7 dni od adhezji artrospora do keratynocytów strzępki grzyba zaczynają tworzyć artrokonidia, zamykając tym samy cykl życiowy grzyba [2]. Od tego momentu infekcja staje się zaraźliwa, pomimo że w zdecydowanej większości przypadków, pozostaje jeszcze bezobjawowa [2, 34, 35]. Pierwsze objawy kliniczne pojawiają się zazwyczaj po upływie od jednego do trzech tygodni od ekspozycji na artrokonidia [2, 30, 34].

3.3. Czynniki wirulencji dermatofitów

Czynniki wirulencji dermatofitów są różnorakie egzoenzymy, wśród których najczęściej wymienia się keratynazę, proteazę, lipazę, fosfolipazę, żelatynazę, DNazę oraz hemolizynę, odpowiadające za zapewnienie patogenom substancji odżywczych i utrzymanie się w *stratum corneum* gospodarza [35, 39, 87]. Doniesienia ostatnich lat wskazują, że enzymy te posiadają wysoką specyficzność substratową, która warunkuje spektrum gospodarzy u poszczególnych gatunków dermatofitów [40]. Uwolnione enzymy pełnią rolę antygenów indukujących i modelujących stan zapalny [31, 87].

Najlepiej przebadaną grupą enzymów dermatofitów, uważaną przez wielu naukowców za główny czynnik wirulencji zaangażowany w inwazję i wykorzystanie jako źródła substancji odżywczych zrogowaciałych warstw naskórka, stanowią proteazy [39, 40]. Przypuszczalnie, wydzielanie proteaz jest stymulowane podczas inwazji dermatofitu przez niektóre komponenty naskórka żywiciela [63]. Niektórzy autorzy sugerują, że dermatofity wydzielają proteazy w celu ułatwienia adhezji do tkanki gospodarza, a nawet mogą być nie-

zbędne, aby ten proces mógł zajść [87]. Aktywność proteolityczna dermatofitów wynika ze zdolności do sekrecji różnych enzymów, które jako endoproteazy (subtylizyny i fungalizyny), jak i egzoproteazy (peptydaza S i proteinaza serynowa) umożliwiają patogenom rozkład keratyny do peptydów i aminokwasów [28, 39, 40]. Degradacji keratyny towarzyszy równoczesna redukcja i rozszczepianie wiązań dwusiarczkowych łączących filamenty keratynowe do aminokwasów cysteiny i selenocysteiny [65, 66]. Proces ten możliwy jest dzięki aktywności pompy siarczynowej kodowanej przez gen SSU1 [66]. Regulacja powstawania siarczynu z cysteiny jest kolejnym ważnym mechanizmem wirulencji, opierającym się w głównej mierze na aktywności dioksygenazy cysteinowej (Cdo1) [50]. Choć jest oczywiste, że aktywność proteolityczna jest niezwykle ważna dla degradacji struktur o zwartej budowie keratynowej, jednakże proteazy same w sobie nie są zdolne do rozpuszczania elementów keratynowych bogatych w cystynę [50, 66]. Wydaje się, że schemat rozkładu proteolitycznego powodowanego przez dermatofity jest specyficzny dla infekowanego gatunku i wyznacza zakres wrażliwych gospodarzy [40], a pośrednio wpływa również na ich odpowiedź immunologiczną [104]. Innymi mechanizmami wpływania na odpowiedź immunologiczną gospodarza, oprócz sekrecji enzymów proteolitycznych są czynniki pozaenzymatyczne, tj.: hamowanie aktywności limfocytów przy pomocy mannanów znajdujących się w ścianie komórkowej grzybów, zmiany profilu aktywności makrofagów, czy też wpływanie na spowolnienie tempa wymiany keratynocytów [26, 45, 104].

Kolejną grupą enzymów zaangażowanych w rozwój symptomatycznych infekcji dermatofitowych są lipazy. Enzymy te mają istotne znaczenie dla przetrwania patogenów na powierzchni skóry, zanim grzyby przenikną do niższych, bogatszych w białko warstw naskórka [55]. Lipazy umożliwiają dermatofitom wykorzystywanie lipidów jako pierwotnego źródła węgla [39]. Co ciekawe, na powierzchni skóry znajdują się kwasy tłuszczowe pochodzące z bakteryjnej hydrolizy tłuszczu i niektóre z nich, w szczególności te o masie molekularnej zbliżonej do masy kwasu undecylenowego, mają właściwości fungistatyczne [99]. Niejednokrotnie są one stosowane w terapii przeciwgrzybiczej [79]. Rozbieżność między hamującym wzrost grzybów działaniem kwasów tłuszczowych obecnych na powierzchni skóry gospodarza, a z drugiej strony możliwością wykorzystania przez patogeny lipidów skóry jako substancji odżywczych, można wytłumaczyć mechanizmem autoregulacyjnym lipolizy grzybowej [39]. Aktywność lipaz produkowanych przez dermatofity jest odwrotnie proporcjonalna do ilości uwolnionych kwasów tłuszczowych, ponieważ enzymy te są inaktywowane przez nadmiar kwasów tłuszczowych [39]. Przypuszczalnie,

aktywność lipolityczna dermatofitów zoofilnych, szczególnie *M. canis*, jest odpowiedzialna za powstawanie liszaju obrączkowego na skórze zwierząt [17].

Zjawisko hemolizy wywoływane przez hemolizyny wytwarzane przez dermatofity odgrywają ważną rolę w równowadze między odpornością komórkową gospodarza, a zdolnością grzyba do zmniejszenia odpowiedzi immunologicznej [39]. Wykazano, że aktywność hemolityczna dermatofitów jest skorelowana z ciężkością i przewlekłością powstających w dermatomykozie zmian klinicznych [49]. Mechanizm wywoływania lizy erytrocytów przez dermatofity nie jest do końca poznany. Przypuszcza się, że aktywność ta jest związana z wydzielaniem na zewnątrz komórki lipaz i fosfolipaz, które mogą uszkadzać błony erytrocytów [92]. Z drugiej strony, aktywność fosfolipaz oceniana *in vitro* nie wyjaśnia powstawania hemolizy. Wykazano doświadczalnie, że dodanie oczyszczonych fosfolipaz grzybowych do zawiesiny erytrocytów nie powoduje ich lizy [39, 92]. Prawdopodobnie potrzebne jest działanie dodatkowego, nieokreślonego czynnika [39]. Dotychczas prowadzone badania naukowe nie dały podstaw, aby bezpośrednio wiązać aktywność enzymatyczną dermatofitów z wywoływaniem hemolizy [17, 18, 39, 92]. Ciekawe obserwacje zachodzenia hemolizy zostały dokonane dla niektórych gatunków dermatofitów, tj. *T. rubrum*, *T. equinum* i *T. verrucosum*. Dla izolatów klinicznych tych dermatofitów hemoliza została określona jako podwójna, tj. ze strefą całkowitej hemolizy wokół kolonii grzyba i strefą niecałkowitej hemolizy w odległości kilku milimetrów od niej [39, 43, 92]. Zjawisko podwójnej hemolizy może wskazywać na wydzielanie przez te dermatofity dwóch różnych czynników cytolitycznych [92]. Zasadniczo, wyraźnie słabsza aktywność hemolityczna została odnotowana dla dermatofitów antropofilnych, a także grzybów z rodzaju *Microsporum* i dla *Epidermophyton floccosum* [39].

Słabo przebadanym czynnikiem wirulencji dermatofitów są DNazy. W badaniach naukowych stwierdzono, że dermatofity wyizolowane z przypadków o przebiegu przewlekłym, wykazywały wysoką aktywność dezoksyrybonukleaz [39]. Natomiast, izolaty pozyskane ze zmian klinicznych w ostrym przebiegu choroby wykazywały niską aktywność tego enzymu *in vitro* [39]. Na tej podstawie wysunięty został wniosek, że DNaza nie odgrywa żadnej roli w powstawaniu zmian skórnych, ale może sprzyjać rozwojowi infekcji w jej początkowej fazie [39]. Innym, szeroko rozpowszechnionym czynnikiem wirulencji dermatofitów jest elastaza. Wytwarzanie tego enzymu przez dermatofity jest związane z silnie wyrażonym stanem zapalnym, a w przypadku *T. mentagrophytes* z pojawieniem się zmian na skórze u zwierząt [17]. Wykazano natomiast, że aktywność elastazy oznaczona *in vitro* u *M. canis* jest znacząca u izolatów od ludzi, a znikoma u szczepów zwierzęcych [17, 39].

3.4. Objawy kliniczne w dermatofitozach psów i kotów

Zewnętrzny odzwierciedleniem działania czynników wirulencji dermatofitów są objawy kliniczne infekcji. Ze względu na wyjątkową predyspozycję dermatofitów do rozkładu keratyny najczęściej występującymi objawami ich rozwoju są: wypadanie włosów, powstawanie grudek, łusek, strupów, rumieni i przebarwień skóry oraz zmiany w wyglądzie paznokcia [41–43, 106]. Zmiany te pojawiają się zazwyczaj asymetrycznie [77]. Natomiast świąd skóry należy potraktować jako objaw, który w zależności od danego przypadku chorobowego może wystąpić lub też nie [30]. U kotów, niezależnie od rasy, ze względu na swój drażniący charakter, świąd może być objawem zarówno dermatofitozy, jak również ropnego zapalenia skóry lub zespołu eozynofilowego [30]. Zmiany kliniczne u kotów pojawiają się w pierwszej kolejności w okolicy oczu, na uszach i wokół jamy ustnej, a następnie rozprzestrzeniają się w kierunku kończyn [29, 38]. Ze względu na podobne objawy, diagnostyka różnicowa dermatofitozy u kotów powinna uwzględnić zapalenie opuszek palcowych oraz uogólnione złuszczone zapalenie skóry [51]. Należy zwrócić uwagę na fakt, że badania sierści kotów, które już wcześniej poddawano leczeniu z powodu infekcji dermatofitowej, często trwającemu długi okres, mogą dawać fałszywie ujemny wynik fluorescencji w lampie Wooda [24]. Stanowi to zasadniczy argument za koniecznością wykonywania mykologicznych badań identyfikacyjnych w każdym przypadku.

Dermatomykozy u psów, rzadziej niż u kotów mogą przyjmować formę guzów [23, 24]. W takich przypadkach rozpoznanie czynnika etiologicznego grzybicy jest trudne, a diagnostyka oparta jest o badanie cytologiczne fragmentu zmiany lub aspiratu z biopsji cienkoigłowej [7, 8, 10, 22–24, 60, 80, 81, 103, 108]. Najczęściej reprezentowanymi rasami w przypadkach infekcji dermatofitowych, przyjmujących postać guzków, są koty perskie i psy rasy Yorkshire terier [21]. W obrazie klinicznym obserwuje się zazwyczaj od jednego do kilku guzków podskórnych [8, 11, 108]. Odmianą zmian guzkowatych u psów jest kerion, który może przyjąć postać pojedynczych lub mnogich guzków, o kopulastym przekroju, z towarzyszącym wylusieniem i stanem zapalnym [22, 24, 80]. W badaniu histopatologicznym tego typu zmian widoczne są ziarniniaki z fragmentami włosów, zawierającymi zarodniki grzybów [24]. Badanie diagnostyczne z wykorzystaniem lampy Wooda u psów z kerionem bardzo często wprowadza w błąd. Cornegliani i wsp. wykazali, że badanie sierści psów z kerionem w przebiegu dermatofitozy (n = 23), dawało ujemny wynik fluorescencji w lampie Wooda, a tylko w przypadku ośmiu z nich w badaniu bezpośrednim włosa stwierdzono artrospory [24]. Natomiast, w przy-

padku 21 psów z tego badania, cytologia wykazywała największą siłę identyfikacyjną, pozwalając stwierdzić występowanie grzyba [24]. W rzadziej występujących w przebiegu dermatofitozy u psów przypadkach pseudomycetomy i mycetomy guzki mają charakter wrzodziejący, z sączącą się surowiczo-ropną wydzieliną bogatą w komórki zapalne [22, 80]. Grzybica powierzchniowa przyjmująca postać krostek (pustules) jest opisywana sporadycznie u psów i histologicznie może imitować pęcherzykę liściastą [85, 88]. Należy zwrócić uwagę na fakt, że we wszystkich podanych przypadkach ważne jest jednocześnie wykonywanie badania cytologicznego, jak i posiewu na podłoże mykologiczne, które umożliwia wyizolowanie kultury patogenu.

Tak duże zróżnicowanie objawów klinicznych dermatomykozy można wiązać z reakcją gospodarza na stan zapalny oraz odpowiedzią jego układu odpornościowego. U zwierząt z innymi współistniejącymi chorobami skóry, zmiany mają charakter wieloogniskowy i są rozproszone po całym organizmie [7, 91, 103]. Polak i wsp. stwierdzili, że występowanie wieloogniskowych infekcji dermatofitowych u kotów diagnozowane jest zdecydowanie częściej w ośrodkach miejskich. Najprawdopodobniej czynnikiem predysponującym do takich postaci dermatomykoz jest długotrwałe poddawanie zwierzęcia działaniu stresu [89]. Z kolei u psów myśliwskich wieloogniskowe zmiany pojawiają się na kufie (pysku) i głowie, ze względu na kontakt z glebą, ukierunkowując tym samym diagnostykę na dermatofity geofilne [10, 20]. W przypadku, jeżeli to paznokieć jest dotknięty grzybicą można zaobserwować jego szponowatość (onychogryfoza) i zmianę zabarwienia [88].

3.5. Odpowiedź immunologiczna gospodarza

Odpowiedź immunologiczna na infekcję dermatofitową stanowi połączenie działania specyficznych przeciwciał i odpowiedzi humoralnej [73]. Zupełne wyleczenie i ochrona przed ponownym zakażeniem zależą jednak w głównej mierze zależy od sprawnej, komórkowej odpowiedzi immunologicznej, obejmującej działanie komórek efektorowych, tj. makrofagów i neutrofilów, oraz interferonu gamma ($IFN\gamma$) [98, 104]. Interesujące, że niektóre gatunki dermatofitów mają zdolność do unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza, co zostało opisane w przypadkach infekcji chronicznych [9]. U osobników zakażonych *T. rubrum*, za przyczyną mannanów ściany komórkowej grzyba, dochodzi do immunosupresji, poprzez zahamowanie aktywności leukocytów o niesegmentowanym jądrze [9]. Dodatkowo, bezpośredni kontakt między konidiami *T. rubrum* a makrofagami skutkuje wytwarzaniem przez te komórki odpornościowe czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- α), interleukiny 10 (IL-10)

oraz tlenu azotu, co w konsekwencji doprowadza do śmierci makrofaga [21].

Lorenz i wsp. wykazali, że przeciwciała klasy IgG, IgA i IgM nie pełnią zasadniczej funkcji odpornościowej w zakażeniach dermatofitami [68]. U kotów z objawową grzybicą wywołaną przez *M. canis* zaobserwowano natychmiastowe i opóźnione reakcje śródskórne w odpowiedzi na podanie białek dermatofitów [31]. Głównymi zmianami, odnotowanymi po podaniu antygeny grzybowego było podwyższone miano przeciwciał oraz wzmożona proliferacja limfocytów [31]. Wykazano, że koty, które wcześniej przebyły zakażenie *M. canis*, miały znacznie wyższą aktywność limfocytów względem antygenów skórnych, w porównaniu z kotami, które nigdy wcześniej nie były chore [21, 31]. Z kolei zbliżoną aktywność limfocytów odnotowano u kotów aktualnie chorych na dermatomykozę oraz kotów, które wcześniej przebyły infekcję [19, 31]. Natomiast, miano przeciwciał w grupie kotów aktualnie chorujących było istotnie wyższe niż u osobników wyleczonych z dermatomykozy [19, 68].

4. Podsumowanie

Infekcje dermatofitowe przenoszone są przede wszystkim poprzez kontakt z sierścią lub zmianami skórnymi zakażonego zwierzęcia, przyborami do pielęgnacji i zabawy, z którymi ma kontakt, a także przez asymptomatycznych nosicieli. Akumulacja łusek skórnych i sierści zwierząt w środowisku stanowi prawdopodobne źródło zakażenia dla ludzi. Dermatofitoza jest powszechną chorobą skóry u osób z obniżoną odpornością; niemniej jednak przegląd literatury wskazuje, że głównym patogenem będącym czynnikiem etiologicznym infekcji u ludzi jest *T. rubrum*, a nie najczęściej izolowany od zwierząt towarzyszących *M. canis*. Pomimo, że zakażenia dermatofitami, mogą być wyleczone powszechnie dostępnymi antybiotykami i chemioterapeutykami, to leczenie jest przedłużone, a objawy często nawracają. W takich przypadkach odnalezienie źródła infekcji powinno być istotnym celem badania diagnostycznego, a psy, koty i inne zwierzęta domowe zawsze powinny być brane pod uwagę.

Piśmiennictwo

1. Ahmadi B., Mirhendi H., Makimura K., de Hoog G.S., Shidfar M.R., Nouripour-Sisakht S., Jalalizand N.: Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene. *Med. Mycol.* **54**, 500–514 (2016)
2. Aljabre S.H., Richardson M.D., Scott E.M., Shankland G.S.: Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human stratum corneum *in vitro*. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**, 145–152 (1992)

3. Angarano D.W., Scott D.W.: Use of ketoconazole in treatment of dermatophytosis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**, 1433–1434 (1987)
4. Baldo A., Mathy A., Tabart J., Camponova P., Vermout S., Massart L., Maréchal F., Galleni M., Mignon B.: Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. *Br. J. Dermatol.* **162**, 990–997 (2010)
5. Baldo A., Monod M., Mathy A., Cambier L., Bagut E.T., Defaweux V., Symoens F., Antoine N., Mignon B.: Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. *Mycoses*, **55**, 218–223 (2012)
6. Baldo A., Tabart J., Vermout S., Mathy A., Collard A., Losson B., Mignon B.: Secreted subtilisins of *Microsporum canis* are involved in adherence of arthroconidia to feline corneocytes. *J. Med. Microbiol.* **57**, 1152–1156 (2008)
7. Bergman R.L., Medleau L., Hnilica K., Howerth E.: Dermatophyte granulomas caused by *Trichophyton mentagrophytes* in a dog. *Vet. Dermatol.* **13**, 51–54 (2002)
8. Black S.S., Abernethy T.E., Tyler J.W., Thomas M.W., Garmavina A., Jensen H.E.: Intra-abdominal dermatophytic pseudomycetoma in a Persian cat. *J. Vet. Intern. Med.* **15**, 245–248 (2001)
9. Blake J.S., Dahl M.V., Herron M.J., Nelson R.D.: An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 657–661 (1991)
10. Bond R., Middleton D.J., Scarff D.H., Lampion A.I.: Chronic dermatophytosis due to *Microsporum persicolor* infection in three dogs. *J. Small Anim. Pract.* **33**, 571–576 (1992)
11. Bond R., Pocknell A.M., Tozet C.E.: Pseudomycetoma caused by *Microsporum canis* in a Persian cat: lack of response to oral terbinafine. *J. Small Anim. Pract.* **42**, 557–560 (2001)
12. Boyanowski K.J., Ihrke P.J., Moriello K.A., Kass P.H.: Isolation of fungal flora from the hair coats of shelter cats in the Pacific coastal USA. *Vet. Dermatol.* **11**, 143–150 (2000)
13. Breuer-Strosberg R.: Reported frequency of dermatophytes in cats and dogs in Austria]. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **100**, 483–485 (1993)
14. Brilhante R.S.N., Cavalcante C.S.P., Soares-Junior F.A., Cordeiro R.A., Sidrim J.J.C., Rocha M.F.G.: High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: epidemiological and diagnostic features. *Mycopathologia*, **156**, 303–308 (2003)
15. Cabanes F.J., Abarca M.L., Bragulat M.R., Castella G.: Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs. *Mycopathologia*, **133**, 1–7 (1996)
16. Cafarchia C., Romito D., Sasanelli M., Lia R., Capelli G., Otranto D.: The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy. *Mycoses*, **47**, 508–513 (2004)
17. Cafarchia C., Figueredo L.A., Coccioli C., Camarda A., Otranto D.: Enzymatic activity of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* from breeding rabbits with and without skin lesions. *Mycoses*, **55**, 45–49 (2012)
18. Cafarchia C., Iatta R., Latrofa M.S., Graser Y., Otranto D.: Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect. Genet. Evol.* **20**, 336–351 (2013)
19. Campos M.R.M., Russo M., Gomes E., Almeida S.R.: Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes Infect.* **8**, 372–379 (2006)
20. Carlotti, B.: Dermatophytosis due to *Microsporum persicolor* (13 cases) or *Microsporum gypseum* (20 cases) in dogs. *Vet. Dermatol.* **10**, 17–27 (1999)
21. Cerundolo R.: Generalized *Microsporum canis* dermatophytosis in six Yorkshire terrier dogs. *Vet. Dermatol.* **15**, 181–187 (2004)
22. Chang S.C., Liao J.W., Shyu C.L., Hsu W.L., Wong M.L.: Dermatophytic pseudomycetomas in four cats. *Vet. Dermatol.* **22**, 181–187 (2011)
23. Colombo S., Cornegliani L., Vercelli A.: Efficacy of itraconazole as a combined continuous/pulse therapy in feline dermatophytosis: preliminary results in nine cases. *Vet. Dermatol.* **12**, 347–350 (2001)
24. Cornegliani L., Persico P., Colombo S.: Canine nodular dermatophytosis (kerion): 23 cases. *Vet. Dermatol.* **20**, 185–190 (2009)
25. Czaika V.A., Lam P.A.: *Trichophyton mentagrophytes* cause underestimated contagious zoophilic fungal infection. *Mycoses*, **56**, 33–37 (2013)
26. Dahl M. V.: Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *J. Am. Acad. Dermatol.* **28**, S19–S23 (1993)
27. de Hoog G.S., Lackner M. i wsp.: Commentaries: Name Changes in Medically Important Fungi and Their Implications for Clinical Practice. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 1056 LP-1062 (2015)
28. de Hoog G.S., Graser Y. i wsp.: Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, **182**, 5–31 (2017)
29. DeBoer D.J., Moriello K.A.: Investigations of a killed dermatophyte cell-wall vaccine against infection with *Microsporum canis* in cats. *Res. Vet. Sci.* **59**, 110–113 (1995)
30. DeBoer D.J., Moriello K.A.: Development of an experimental model of *Microsporum canis* infection in cats. *Vet. Microbiol.* **42**, 289–295 (1994)
31. DeBoer D.J., Moriello K.A.: Humoral and cellular immune responses to *Microsporum canis* in naturally occurring feline dermatophytosis. *Med. Mycol.* **31**, 121–132 (1993)
32. DeBoer D.J., Moriello K.A., Blum J.L., Volk L.M., Bredahl L.K.: Safety and immunologic effects after inoculation of inactivated and combined live-inactivated dermatophytosis vaccines in cats. *Am. J. Vet. Res.* **63**, 1532–1537 (2002)
33. Drouot S., Mignon B., Fratti M., Roosje P., Monod M.: Pets as the main source of two zoonotic species of the *Trichophyton mentagrophytes* complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae*. *Vet. Dermatol.* **20**, 13–18 (2009)
34. Duek L., Kaufman G., Ulman Y., Berdicevsky I.: The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. *J. Infect.* **48**, 175–180 (2004)
35. Dworecka-Kaszak B., Dąbrowska I.: Dermatophytes: new taxonomy and differentiation methods. Review of current state of knowledge about mechanisms of pathogenesis and pathogen-host interaction. *Med. Weter.* **73**, 613–617 (2017)
36. Elavarashi E., Kindo A.J., Rangarajan S.: Enzymatic and non-enzymatic virulence activities of dermatophytes on solid media. *J. Clin. Diagn. Res.* **11**, DC23–DC25 (2017)
37. Esquenazi D., Alviano C.S., de Souza W., Rozental S.: The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Res. Microbiol.* **155**, 144–153 (2004)
38. Frymus T., Horzinek M.C. i wsp.: Dermatophytosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* **15**, 598–604 (2013)
39. Gnat S., Lagowski D., Nowakiewicz A., Zieba P.: Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 700–709 (2018)
40. Gnat S., Lagowski D., Nowakiewicz A., Zieba P.: The host range of dermatophytes, it is at all possible? Phenotypic evaluation of the keratinolytic activity of *Trichophyton verrucosum* clinical isolates. *Mycoses*, **62**, 274–283 (2019)

41. Gnat S., Lagowski D., Nowakiewicz A., Zieba P.: *Tinea corporis* by *Microsporum canis* in mycological laboratory staff: Unexpected results of epidemiological investigation. *Mycoses*, **61**, 945–953 (2018)
42. Gnat S., Lagowski D., Nowakiewicz A., Trościańczyk A., Zieba P.: Infection of *Trichophyton verrucosum* in cattle breeders, Poland: A 40-year retrospective study on the genomic variability of strains. *Mycoses*, **61**, 681–690 (2018)
43. Gnat S., Nowakiewicz A., Lagowski D., Trościanczyk A., Zieba P.: Multiple-strain *Trichophyton mentagrophytes* infection in a silver fox (*Vulpes vulpes*) from a breeding farm. *Med. Mycol.* **57**, 171–180 (2019)
44. Gnat S., Nowakiewicz A., Zieba P.: Taksonomia dermatofitów – systemy klasyfikacyjne się zmieniają, problemy identyfikacyjne pozostają te same. *Post. Mikrobiol.* **58**, 49–58 (2019)
45. Grando S.A., Herron M.J., Dahl M. V, Nelson R.D.: Binding and uptake of *Trichophyton rubrum* mannan by human epidermal keratinocytes: a time-course study. *Acta Derm. Venereol.* **72**, 273–276 (1992)
46. Graser Y., De Hoog S., Summerbell R.C.: Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. *Med. Mycol.* **44**, 199–209 (2006)
47. Graser Y., Kuijpers A.F., El Fari M., Presber W., de Hoog G.S.: Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporum canis* complex. *Med. Mycol.* **38**, 143–153 (2000)
48. Graser Y., Monod M., Bouchara J.P., Dukik K., Nenoff P., Kargl A., Kupsch C., Zhan P., Packeu A., Chaturvedi V., de Hoog S.: New insights in dermatophyte research. *Med. Mycol.* **56**, 2–9 (2018)
49. Graser Y., Scott J., Summerbell R.: The new species concept in dermatophytes—a polyphasic approach. *Mycopathologia*, **166**, 239–256 (2008)
50. Grumbt M., Monod M., Yamada T., Hertweck C., Kunert J., Staib P.: Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1550–1555 (2013)
51. Guaguere E., Hubert B., Delabre C.: Feline pododermatoses. *Vet. Dermatol.* **3**, 1–12 (1992)
52. Hall E.J., Miller W.H., Medleau L.: Ketoconazole treatment of generalized dermatophytosis in a dog with hyperadrenocorticism. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **20**, 597–602 (1984)
53. Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M.: Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, **51**, 2–15 (2008)
54. Hawksworth D.L., Zhang N. i wsp.: The amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus* **2**, 105–112 (2011)
55. Hellgren L., Vincent J.: Lipolytic activity of some dermatophytes. *J. Med. Microbiol.* **13**, 155–157 (1980)
57. Hill P.B., Williams V.: Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. *Vet. Rec.* **158**, 533–539 (2006)
58. Hobi S., Favrot C. i wsp.: Clinical characteristics and causes of pruritus in cats: a multicentre study on feline hypersensitivity-associated dermatoses. *Vet. Dermatol.* **22**, 406–413 (2011)
59. Irwin K.E., Beale K.M., Fadok V.A.: Use of modified ciclosporin in the management of feline pemphigus foliaceus: a retrospective analysis. *Vet. Dermatol.* **23**, 403–e76 (2012)
60. Jaham C. de, Page N., Lambert A.J.: Enilconazole emulsion in the treatment of dermatophytosis in Persian cats: tolerance and suitability (w) *Advances in Veterinary Dermatology*, wyd. 3, Quebec, 1998
61. Kano R., Edamura K., Yumikura H., Maruyama H., Asano K., Tanaka S., Hasegawa A.: Confirmed case of feline mycetoma due to *Microsporum canis*. *Mycoses*, **52**, 80–83 (2009)
62. Kaplan W., Ajello L.: Oral treatment of spontaneous ringworm in cats with griseofulvin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **135**, 253–261 (1959)
63. Kaplan W., Ajello L.: Therapy of spontaneous ringworm in cats with orally administered griseofulvin. *Arch. Dermatol.* **81**, 714–723 (1960)
64. Kaufman G., Horwitz B.A., Duek L., Ullman Y., Berdicevsky I.: Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. *Med. Mycol.* **45**, 149–155 (2007)
65. Keep J.M.: The epidemiology and control of *Microsporum canis* Bodin in a cat community. *Aust. Vet. J.* **35**, 374–378 (1959)
66. Lange L., Huang Y., Busk P.K.: Microbial decomposition of keratin in nature— a new hypothesis of industrial relevance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 2083–2096 (2016)
67. Lechenne B., Reichard U., Zaugg C., Fratti M., Kunert J., Boulat O., Monod M.: Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. *Microbiology*, **153**, 905–913 (2007)
68. Lewis D.T., Foil C.S., Hosgood G.: Epidemiology and clinical features of dermatophytosis in dogs and cats at Louisiana State University: 1981–1990. *Vet. Dermatol.* **2**, 53–58 (1991)
69. Lorenz M.C., Fink G.R.: Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot. Cell* **1**, 657–662 (2002)
70. Mancianti F., Giannelli C., Bendinelli M., Poli A.: Mycological findings in feline immunodeficiency virus-infected cats. *J. Med. Vet. Mycol.* **30**, 257–259 (1992)
71. Meason-Smith C., Diesel A., Patterson A.P., Older C.E., Johnson T.J., Mansell J.M., Suchodolski J.S., Rodrigues Hoffmann A.: Characterization of the cutaneous mycobiota in healthy and allergic cats using next generation sequencing. *Vet. Dermatol.* **28**, 71–e17 (2017)
72. Meason-Smith C., Diesel A., Patterson A.P., Older C.E., Mansell J.M., Suchodolski J.S., Rodrigues Hoffmann A.: What is living on your dog's skin? Characterization of the canine cutaneous mycobiota and fungal dysbiosis in canine allergic dermatitis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **91**, (2015)
73. Mignon B.R., Losson B.J.: Prevalence and characterization of *Microsporum canis* carriage in cats. *J. Med. Vet. Mycol.* **35**, 249–256 (1997)
74. Mignon B., Tabart J., Baldo A., Mathy A., Losson B., Vermout S.: Immunization and dermatophytes. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**, 134–140 (2008)
75. Monod M., Fratti M., Mignon B., Baudraz-Rosset F.: Dermatophytes transmitted by pets and cattle. *Rev. Med. Suisse* **10**, 749–753 (2014)
76. Moriello K.A., DeBoer D.J.: Fungal flora of the coat of pet cats. *Am. J. Vet. Res.* **52**, 602–606 (1991)
77. Moriello K.A., Deboer D.J.: Fungal flora of the haircoat of cats with and without dermatophytosis. *J. Med. Vet. Mycol.* **29**, 285–292 (1991)
78. Moriello K.A., Coyner K., Paterson S., Mignon B.: Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats. *Vet. Dermatol.* **28**, 266–e68 (2017)
79. Muller A., Guaguere E., Degorce-Rubiales F., Bourdoiseau G.: Dermatophytosis due to *Microsporum persicolor*: a retrospective study of 16 cases. *Can. Vet. J.* **52**, 385–388 (2011)
80. Noble S.L., Forbes R.C., Stamm P.L.: Diagnosis and management of common tinea infections. *Am. Fam. Physician.* **58**, 163–174, 177–178 (1998)
81. Nobre M. de O., Negri Mueller E., Teixeira Tillmann M., da Silva Rosa C., Normanton Guim T., Vives P., Fernandes M., Madrid I.M., Fernandes C.G., Meireles M.C.A.: Disease progression of dermatophytic pseudomycetoma in a Persian cat. *Rev. Iberoam. Micol.* **27**, 98–100 (2010)
82. Nuttall T.J., German A.J., Holden S.L., Hopkinson C., McEwan N.A.: Successful resolution of dermatophyte mycetoma

- following terbinafine treatment in two cats. *Vet. Dermatol.* **19**, 405–410 (2008)
83. Ogawa H., Summerbell R.C., Clemons K. V, Koga T., Ran Y.P., Rashid A., Sohnle P.G., Stevens D.A., Tsuboi R.: Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. *Med. Mycol.* **36** Suppl 1, 166–173 (1998)
 84. Olivry T., Power H.T., Woo J.C., Moore P.F., Tobin D.J.: Anti-isthmus autoimmunity in a novel feline acquired alopecia resembling pseudopelade of humans. *Vet. Dermatol.* **11**, 261–270 (2000)
 85. O'Neill D.G., Church D.B., McGreevy P.D., Thomson P.C., Brodbelt D.C.: Prevalence of disorders recorded in cats attending primary-care veterinary practices in England. *Vet. J.* **202**, 286–291 (2014)
 86. Parker W.M., Yager J.A.: *Trichophyton* dermatophytosis- a disease easily confused with pemphigus erythematosus. *Can. Vet. J.* **38**, 502–505 (1997)
 87. Paterson S.: Miconazole/chlorhexidine shampoo as an adjunct to systemic therapy in controlling dermatophytosis in cats. *J. Small Anim. Pract.* **40**, 163–166 (1999)
 88. Peres N.T. de A., Maranhao F.C.A., Rossi A., Martinez-Rossi N.M.: Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An. Bras. Dermatol.* **85**, 657–667 (2010)
 89. Poisson L., Mueller R.S., Olivry T.: Canine pustular dermatophytosis of the corneum mimicking pemphigus foliaceus. *Prat. Medicale Chir. L Anim. Cie.* **33**, 229–234 (1998)
 90. Polak K.C., Levy J.K., Crawford P.C., Leutenegger C.M., Moriello K.A.: Infectious diseases in large-scale cat hoarding investigations. *Vet. J.* **201**, 189–195 (2014)
 91. Preziosi D.E., Goldschmidt M.H., Greek J.S., Jeffers J.G., Shanley K.S., Drobatz K., Mauldin E.A.: Feline pemphigus foliaceus: a retrospective analysis of 57 cases. *Vet. Dermatol.* **14**, 313–321 (2003)
 92. Rodrigues Hoffmann A., Suchodolski J.S. i wsp.: The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PLoS One*, **9**, e83197 (2014)
 93. Schaufuss P., Steller U.: Haemolytic activities of *Trichophyton* species. *Med. Mycol.* **41**, 511–516 (2003)
 94. Scott D.W., Paradis M.: A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: Small Animal Clinic, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec (1987–1988). *Can. Vet. J.* **31**, 830–835 (1990)
 95. Scott D.W., Miller W.H., Erb H.N.: Feline dermatology at Cornell University: 1407 cases (1988–2003). *J. Feline Med. Surg.* **15**, 307–316 (2013)
 96. Sharma R., de Hoog S., Presber W., Gräser Y.: A virulent genotype of *Microsporum canis* is responsible for the majority of human infections. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1377–1385 (2007)
 97. Sieklucki U., Oh S.H., Hoyer L.L.: Frequent isolation of *Arthroderma benhamiae* from dogs with dermatophytosis. *Vet. Dermatol.* **25**, 39–e14 (2014)
 98. Sierra P., Guillot J., Jacob H., Bussieras S., Chermette R.: Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* **61**, 158–161 (2000)
 99. Sparkes A.H., Gruffydd-Jones T.J., Stokes C.R.: Acquired immunity in experimental feline *Microsporum canis* infection. *Res. Vet. Sci.* **61**, 165–168 (1996)
 100. Sulzberger M.B., Kanof A.: Undecylenic and propionic acids in the prevention and treatment of dermatophytosis. *Arch. Derm. Syphilol.* **55**, 391–395 (1947)
 101. Symoens F., Jousson O., Packeu A., Fratti M., Staib P., Mignon B., Monod M.: The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: intraspecies variability and mating behaviour. *J. Med. Microbiol.* **62**, 377–385 (2013)
 102. Symoens F., Jousson O., Planard C., Fratti M., Staib P., Mignon B., Monod M.: Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 260–266 (2011)
 103. Taylor J.W.: One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* **2**, 113–120 (2011)
 104. Thian A., Woodgyer A.J., Holloway S.A.: Dysgonic strain of *Microsporum canis* pseudomycetoma in a Domestic Long-hair cat. *Aust. Vet. J.* **86**, 324–328 (2008)
 105. Vermout S., Tabart J., Baldo A., Mathy A., Losson B., Mignon B.: Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, **166**, 267–275 (2008)
 106. Vogelnest L.J.: Cutaneous xanthomas with concurrent demodicosis and dermatophytosis in a cat. *Aust. Vet. J.* **79**, 470–475 (2001)
 107. Weitzman I., Summerbell R.C.: The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 240–259 (1995)
 108. Yokoi S., Sekiguchi M., Kano R., Kobayashi T.: Dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* infection in a dog. *Japanese J. Vet. Dermatology* **16**, 211–215 (2010)
 109. Zimmerman K., Feldman B., Robertson J., Herring E.S., Manning T.: Dermal mass aspirate from a Persian cat. *Vet. Clin. Pathol.* **32**, 213–217 (2003)
 110. Ziolkowska G., Nowakiewicz A., Gnat S., Trościanczyk A., Zieba P., Dziedzic B.M.: Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. *Mycoses*, **58**, 119–126 (2015)
 111. Zur G., White S.D.: Hyperadrenocorticism in 10 dogs with skin lesions as the only presenting clinical signs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **47**, 419–427 (2011)

ANTIBACTERIAL EFFECT OF NATURAL OILS – AN OPPORTUNITY TO SOLVE THE PROBLEM OF ANTIBIOTIC RESISTANCE ON THE EXAMPLE OF *PSEUDOMONAS* SPP.

Katarzyna Leja*, Kamila Szudera-Kończal, Kamila Myszka, Katarzyna Czaczyk

Department of Biotechnology and Food Microbiology, Poznan University of Life Sciences

Received in November 2018, accepted in April 2019

Abstract: Presently, the overuse of antibiotics is a great problem all over the world. The reason for this phenomenon is both primary and secondary resistance. Primary resistance is a congenital feature of microbes and does not depend on its contact with a drug. It is chromosomally coded and cannot be transmitted to other species of bacteria. Secondary resistance, on the other hand, develops as a result of contact with the antibiotic substance. Genes located in plasmids are responsible for the formation of this type of resistance. One plasmid often contains resistance genes for several different antibiotics. Plasmids can transfer gene-encoded resistance from one bacterial cell to another by conjugation and transduction. As a result of the overuse of antibiotics in humans and animals, a growing number of infections – such as pneumonia, salmonellosis, tuberculosis, and gonorrhoea – are becoming more troublesome to treat. Antibiotic resistance leads also to longer hospital stays, higher medical costs and finally increased mortality. Now people are finally becoming aware of the consequences of the overuse of antibiotics. Thus, interest in natural bacteriostatic materials, such as plant essential oils, has observably grown. A number of scientific studies have confirmed the antimicrobial activity of plant-derived essential oils against pathogenic bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*. A very important advantage of plant oils is the fact that they are active in low, sub-lethal concentrations, without provoking the acquisition resistance mechanisms in bacteria. The aim of this review was to explain the mechanisms of antibiotic resistance formation on the example of *Pseudomonas aeruginosa* and to demonstrate that it is worth looking for alternative treatment methods which can lead to limiting the use of antibiotics. Finally, this work tries to explain how the oils work.

1. Introduction. 2. The characteristics of *Pseudomonas* genus. 2.1. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. The mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. 3.1. Intrinsic resistance. 3.2. Adaptive resistance. 3.3. Plasmid resistance. 4. The most common resistances of clinical *P. aeruginosa* strains to antibiotics. 4.1. Resistance to aminoglycosides. 4.2. Resistance to fluoroquinolones. 4.3. Resistance to cephalosporins. 5. Essential oils from plants as a natural alternative for antibiotics. 5.1. Antibacterial activity of plant EOs against *Pseudomonas* spp. 5.2. How EOs work on the bacteria cell. 6. Summary

PRZECIWDROBNOUSTROJOWA AKTYWNOŚĆ OLEJKÓW ETERYCZNYCH SZANSĄ ROZWIĄZANIA PROBLEMU ANTYBIOTYKODPORNOŚCI NA PRZYKŁADZIE BAKTERII *PSEUDOMONAS* SPP.

Streszczenie: Nadużywanie antybiotyków stanowi ogromny problem na całym świecie, powodując wzrost antybiotykoodporności u patogennych bakterii. Powodem tego zjawiska jest zarówno oporność pierwotna, jak i wtórna. Oporność pierwotna jest cechą wrodzoną drobnoustrojów i nie zależy od jego kontaktu z lekiem. Kodowana jest chromosomalnie i nie może być przekazywana innym gatunkom bakterii. Oporność wtórna natomiast pojawia się w wyniku kontaktu z substancją antybiotykową. Za powstawanie tego typu oporności odpowiadają geny zlokalizowane w plazmidach. Jeden plazmid zawiera często geny oporności na kilka różnych antybiotyków. Plazmidy mogą przenosić geny kodujące oporność z jednej komórki bakteryjnej na inną na drodze koniugacji i transdukcji. W wyniku nadużywania antybiotyków u ludzi i zwierząt coraz większa liczba infekcji – takich jak zapalenie płuc, salmonelloza, gruźlica i rzeżączka – staje się coraz trudniejsza w leczeniu. Oporność na antybiotyki prowadzi również do dłuższych pobytów w szpitalu, wyższych kosztów leczenia i ostatecznie do zwiększenia śmiertelności. Obecnie ludzie zaczynają być wreszcie świadomi konsekwencji nadużywania silnych środków bakteriobójczych. Dlatego poszukuje się rozwiązań alternatywnych. Przykładem jest wykorzystanie bakteriostatycznej aktywności leków roślinnych pochodzenia roślinnego. Wiele badań naukowych potwierdziło działanie przeciwdrobnoustrojowe olejków eterycznych pochodzenia roślinnego wobec bakterii chorobotwórczych, w tym *Pseudomonas aeruginosa*. Bardzo ważną zaletą olejów roślinnych jest fakt, że są aktywne w niskich, sub-lethalnych stężeniach, bez powodowania mechanizmów oporności u bakterii. Celem niniejszej pracy było wyjaśnienie mechanizmów powstawania oporności na antybiotyki na przykładzie bakterii *Pseudomonas aeruginosa* oraz wskazanie konieczności poszukiwania alternatywnych metod terapii, które mogłyby przynajmniej częściowo przyczynić się do ograniczenia spożycia antybiotyków. Podjęto także próbę wyjaśnienia mechanizmów oddziaływania olejów na komórki bakterii.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. 2.1. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. Mechanizmy antybiotykoodporności u *Pseudomonas* spp. 3.1. Oporność wewnętrzna. 3.2. Oporność adaptacyjna. 3.3. Oporność plazmidowa. 4. Najczęstsza oporność klinicznych szczepów *P. aeruginosa* na antybiotyki. 4.1. Oporność na aminoglikozydy. 4.2. Oporność na fluorochinolony. 4.3. Oporność na cefalosporyny. 5. Roślinne olejki eteryczne – alternatywa dla antybiotyków. 5.1. Przeciwdrobnoustrojowa aktywność olejków eterycznych względem *Pseudomonas* spp. 5.2. Mechanizm oddziaływania olejków eterycznych na komórki bakterii. 6. Podsumowanie

Key words: antibacterial activity, antibiotic resistance, plants essential oils, *Pseudomonas* spp.

Słowa kluczowe: aktywność przeciwdrobnoustrojowa, oporność na antybiotyki, roślinne olejki eteryczne, *Pseudomonas* spp.

* Corresponding author: Dr. Katarzyna Leja, Department of Biotechnology and Food Microbiology, Poznan University of Life Science, Wojska Polskiego 48, 60-637 Poznań; phone: +48 61 848 6023; ORCID: 0000-0001-9683-3514; e-mail: katarzyna.leja@up.poznan.pl

1. Introduction

The increase in consumption of antibiotics has provoked the formation of resistance mechanisms in bacteria as a result of chromosomal changes or the exchange of genetic material via plasmids and transposons. This problem involves many pathogenic bacteria, including *Pseudomonas* spp. For instance, *P. aeruginosa* (responsible for severe nosocomial infections) is a clinically significant pathogen with confirmed resistance to multiple classes of antibiotics, such as fluoroquinolones, β -lactam antibiotics, and aminoglycosides [9, 53, 78, 81, 85]. The overuse of antibiotics in treatment and in industry will only further increase resistance, and will thus render it impossible to treat infections caused by drug resistant bacteria. Therefore, it is necessary to reduce the consumption of antibiotics and look for alternative substances with antimicrobial activity, which are not antibiotics, like essential oils from plants.

Essential oils (EOs) are in fact not oils, but they are very poorly soluble in water, and this makes them similar to oils. Plant-derived EOs can be obtained from various plant parts, including seeds, flower, buds, twigs, leaves, woods, fruits, and roots. They are usually prepared by fragrance extraction techniques such as distillation (including steam distillation), cold pressing, or extraction (maceration) [24, 89, 92]. Generally, EOs are complex mixtures of hundreds of individual aroma compounds [2]. All of these bioactive components have their own significant activity and that is why EOs acquire antimicrobial [73], antioxidant [20], antimycotic [13], antiviral [84], antiparasitic [94], antitoxicogenic and insecticidal [2] properties.

The majority of EOs are classified as GRAS (Generally Recognized As Safe). Moreover, due to their fragrance and flavour as well as antimicrobial properties, they can be used in food products [9–10, 48, 81, 88]. Although the food industry primarily uses EOs as flavourings, they represent a rich source of natural antimicrobials for foods preservation, which is currently being widely studied [4, 30, 32, 40]. The interest in EOs and their application in food preservation has been significantly amplified in recent years by the increasingly negative consumer perception of synthetic preservatives [40]. It has been demonstrated that EOs are able to inhibit the growth of some food spoilage bacteria such as *Clostridium* spp. (among others *C. botulinum*, *C. perfringens*) [46], *Bacillus* spp. (*B. stearothermophilus*, *B. cereus*) [29], *Lactobacillus* spp. (*L. acidophilus*) [65] and also food-related *Pseudomonas* spp. (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. lundensis*, *P. fragi*, *P. putida*, *P. orientalis*) [6, 49–50, 70–71].

Despite pioneering work that has elucidated the mode of antimicrobial action of a few EOs constituents in model food systems or in real food [among others

4, 30, 32], any detailed knowledge about how most of the compounds work is still lacking [40]. This knowledge is necessary to predict how EOs work on different microorganisms cells.

The purpose of this review is to provide an overview of current knowledge about the mechanism of antibiotic resistance in bacteria on the example of the *Pseudomonas* species, antimicrobial activity as well as EOs mode of action and their constituents.

2. The characteristics of *Pseudomonas* genus

The genus *Pseudomonas* was first described by Migula in 1894 in just two concise sentences: “Cells with polar organs of motility. Formation of spores occurs in some species, but it is rare” [61]. Additional information about *Pseudomonas* was provided by Migula only in his later works. In 1895, he presented the *Pseudomonas pyocyanea* species which was renamed *P. aeruginosa* [48, 60–61].

Bacteria from the *Pseudomonas* genera were eagerly researched due to their widespread occurrence in the natural environment and capacity to grow in very simple media [72]. As a result of the study, it was demonstrated that *Pseudomonas* plays a key role in the process of mineralizing organic matter in nature. Moreover, Dooren de Jong’s (1926) research introduced the methodology for the phenotypic characterization of strains, which has had a significant impact on taxonomic research on the genus for nearly 40 years [51].

The *Pseudomonas* genus represents a diverse group of bacteria, characterized by an enormous metabolic capacity which is manifested, *inter alia*, by the ability to adapt to diverse and challenging environments, the capability to synthesize a variety of low-molecular-weight biopolymers (among others, polyhydroxyalkanoates and gellan) [62, 86] and also by the ability to degrade recalcitrant compounds (among others, atrazine, chlorobiphenyl, m-toluate, polychlorinated biphenyl, nitrobenzene, 1,4-dichlorobenzene, 1,2,4-trichlorobenzene, naphthalene) [7, 15, 17, 19, 35, 42, 63, 69, 97]. Moreover, it is one of the most ecologically significant groups of bacteria – members of that genus are even present in terrestrial and marine environments and also in association with animals and plants. Such a free spread of bacteria from this species in the natural environment certainly results from its genomic diversity and genetic adaptability [42].

The cells of bacteria belonging to *Pseudomonas* genera are rod-shaped (less than 1 μm in diameter and not more than 4–5 μm in length) (Fig. 1), Gram-negative, polarly flagellated (in some species lateral flagella may also be produced) and they do not produce spores. Fimbriae pili can be observed in the cells of many species

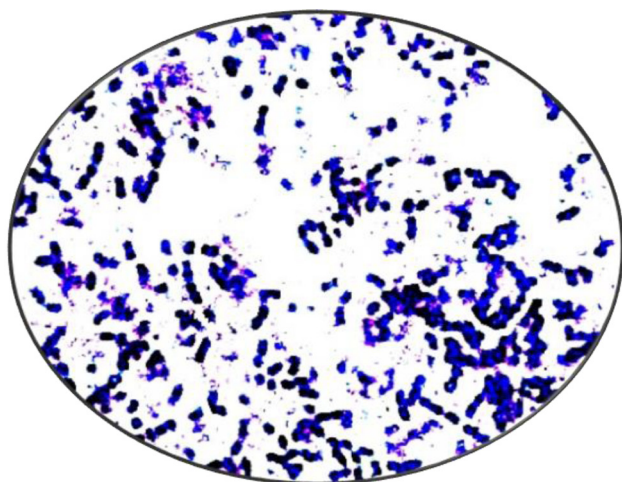


Fig. 1. *Pseudomonas orientalis*.

The cells were coloured by crystal violet (1000x, Axiovert).

and probably all species are able to perform cell-to-cell contact, phage adsorption, attachment to cell surface and twitching motility. *Pseudomonas* strains are absolute aerobes. For many strains, nitrate can act as an electron acceptor under aerobic conditions [72].

The *Pseudomonas* genus includes many pathogenic species. However, of these *P. aeruginosa* is the most commonly associated with antibiotic resistance.

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, like most Gram-negative pathogens, shows an increasing resistance to the majority of standard antibiotics used. A particularly dangerous phenomenon is the accumulation of resistance after the exposure of these bacteria to antibiotics and cross-resistance between them. This is responsible for multi-drug resistance, *inter alia*, in *P. aeruginosa*. This situation is particularly worrying because it creates a state reminiscent of the pre-antibiotic era [8].

P. aeruginosa is a common cause of health care-associated infections, including pneumonia and infections of the bloodstream, urinary tract, and surgical-site infections. Generally, more than 6,000 (13%) of the 51,000 health care-associated *P. aeruginosa* infections occurring in the United States each year are multi-drug resistant. Thus, infections caused by *P. aeruginosa* are responsible for 400 deaths per year [52]. In Europe, it is estimated that *P. aeruginosa* is responsible for 10% of all hospital-acquired infections, but this number is constantly on the rise [3, 8, 80]. The factors influencing the growing resistance in *P. aeruginosa* include the low permeability of its cell wall, the genetic capacity to express a wide repertoire of resistance mechanisms, the constitutive expression of various efflux pumps, and the production of antibiotic-inactivating enzymes. Moreover, the evidence that it can acquire additional resistance

genes from other organisms via plasmids, transposons and bacteriophages is presented [48–49, 59]. Because of this complex multidrug resistance, *P. aeruginosa* is used as a model organism in research on resistance or susceptibility to synthetic or natural antibacterials [3, 5, 36, 47–49, 54, 81].

3. The mechanism of antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp.

Antibiotics are among the most effective drugs used for human therapy. However, the synthesis of large numbers of antibiotics over the past four decades has caused complacency about the threat of bacterial resistance. Antibiotics are extensively used not only in human treatment but also for animal farming and agricultural purposes. Unfortunately, they may be released into the natural environment and pollute it. The most evident consequence of antibiotic release into the natural environments is the phenomenon of resistant bacteria [9, 58]. Antibiotic-resistant bacteria that are very difficult or even impossible to eradicate are becoming increasingly common and are posing a global health crisis [58], because the release of residues containing human microbiota into an environment containing bacteria with resistive elements significantly increases the possibility that human-linked bacteria may acquire novel resistance determinants (the contact of human microbiota with other types of microbiota in different ecosystems will increase the possibility of genetic variation and the possible emergence of novel mechanisms of resistance) [58].

Generally, the resistance of bacteria to antibiotics can be determined by genes encoded in the chromosome or/and some mobile elements such as plasmids, transposons and integrons. However, new resistance mechanisms are constantly being described, and new genes and vectors of transmission are identified on a regular basis [8, 28, 58]. Bacteria may be naturally resistant to some groups of antibiotics or they can acquire resistance due to different genetic events such as mutations or the transfer of genetic information through direct contact with cells [23, 58].

3.1. Intrinsic resistance

Microorganisms in every environment on earth are exposed to antimicrobials and therefore some species (such as *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*) possess an intrinsically low susceptibility to antibiotics. Free-living opportunistic pathogens often have large genomes that allow the colonization of diverse environments through metabolic versatility that helps to degrade and resist the toxicity

of compounds present in these ecosystems. This can include large numbers of biodegradative enzymes which cooperate in the modification and utilization of antibiotics as a food resource. Additionally, efflux pumps – originally involved in signal trafficking or resistance to toxic compounds produced by plants or rhizosphere-associated microbiota – can be also used for effluxing antibiotics [41, 57, 77].

P. aeruginosa has been classified within the group of six highly antibiotic-resistant bacteria that are the primary causative agents of nosocomial (hospital-acquired) infections [66]. An understanding of how this intrinsic resistance works was not easy to come by and was tackled by Murray *et al.* [66]. Primarily, they assumed that this resistance is related to gene expression in the presence of nonlethal levels of an antimicrobial with the idea that genes which are differentially regulated by low levels of an antimicrobial will provide an immediate insight into factors important for intrinsic resistance. However, it turned out that most of the genes identified in these studies have proven not to be significant in terms of intrinsic resistance. Another idea of theirs was based on screening transposon mutant libraries for increased or decreased susceptibility to sub-MIC antimicrobials. These studies revealed novel resistance determinants, although it is necessary to continue them in order to test more antibiotics and confirm all the results obtained [66].

3.2. Adaptive immunity

The exposure of susceptible *P. aeruginosa* to an aminoglycoside results in rapid drug concentration-dependent killing followed by a phase of bacterial refractoriness characterized by slow drug concentration-independent killing. This adaptive resistance, which is distinct from the post-antibiotic effect and which disappears when the organism is no longer incubated with the aminoglycoside, has been observed *in vitro*, in animal models of infection, and in patients with cystic fibrosis. This adaptive resistance is certainly not a result of mutation events. Reduced intracellular accumulation of aminoglycosides (which is concomitant to adaptive resistance) was first interpreted as the consequence of a lower drug uptake across the bacterial envelopes. Supporting this assumption, pleiotropic changes in the protein profiles of the cytoplasmic membrane were detected in drug-exposed bacteria. The membrane potential – the driving force for drug entry – appears to be marginally diminished in adaptively resistant bacteria. This finding agrees well with the observation that surviving bacteria grow normally during the post-exposure refractory phase [37]. According to Lambert [49], aminoglycosides are not able to cross the outer membrane via porin channels. They promote their own uptake by binding to the lipopolysaccharide on the outer face of the membrane. Aminoglycosides

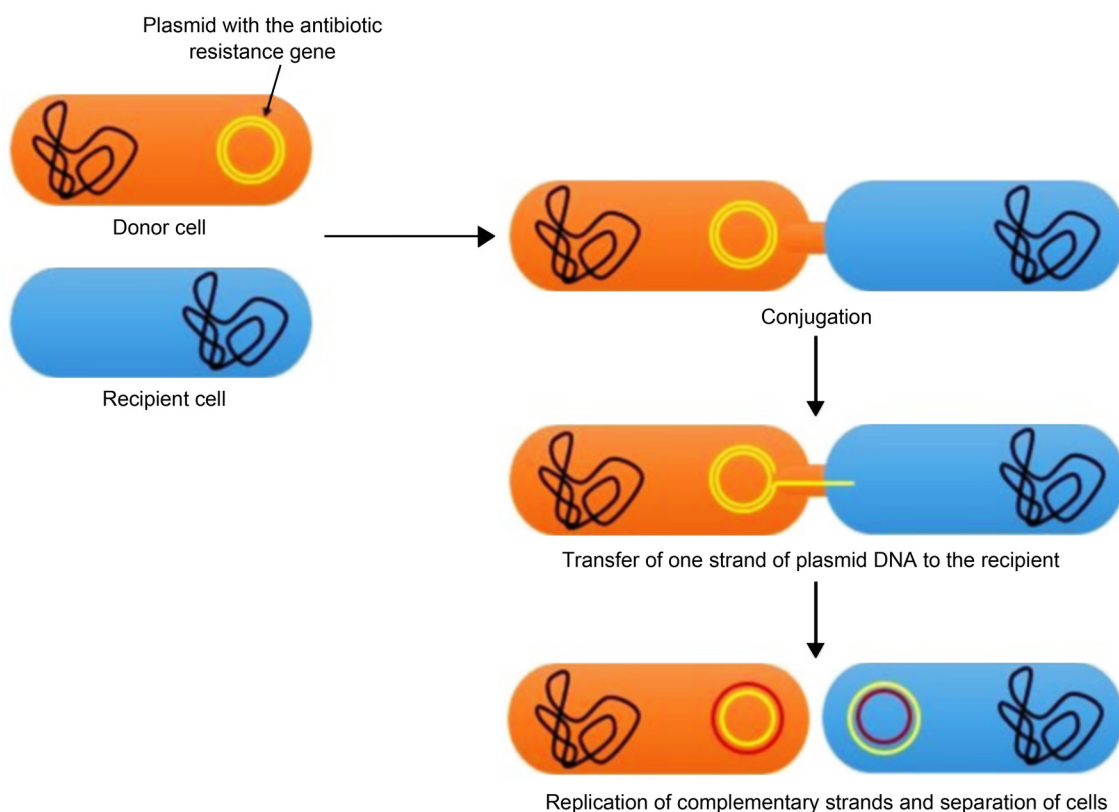


Fig. 2. Resistance arising as a result of spontaneous mutation in chromosomal DNA.

destroys the permeability barrier of the outer membrane and allows the antibiotics to penetrate through the wall to the cytoplasmic membrane. Aminoglycosides are then actively transported into the cells, where they interfere with protein synthesis at the ribosomes. Lambert [49] stated that resistance to aminoglycosides in laboratory strains of *P. aeruginosa* can be observed due to the overexpression of an outer membrane protein, OprH, which protects the lipopolysaccharides from binding the antibiotics but he underlined that this form of resistance has not been encountered widely in clinical isolates.

In clinical practice, colistin and polymyxin B are most commonly used to treat *P. aeruginosa* infections. Thus, an increase in the number of polymyxins-resistant clinical isolates is being reported. The polymyxins are antimicrobial cyclic oligopeptides that interact with the phospholipids of bacterial cell membranes and thereby lead to increased cell wall permeability and, as a result, the death of the bacteria. In *P. aeruginosa*, polymyxin resistance is strictly associated with covalent addition of 4-amino-L-arabinose to phosphate groups within the lipid A and core oligosaccharide moieties of lipopolysaccharides. Genes in the *arnBCADTEFpmrE* operon encode enzymes responsible for synthesis and transfer of L-Ara4N to lipid A. This amino-sugar modification interferes with charge interactions between phosphate groups within lipopolysaccharides and amino groups within the cyclic polymyxin oligopeptide. In Gram-negative bacteria (including *P. aeruginosa*) the PmrAB and PhoPQ two-component regulatory systems stimulate transcription of the *arnBCADTEF-pmrE* operon in response to antimicrobial peptide exposure or divalent

cation depletion. The sensor kinase PmrB activates the transcriptional response regulator PmrA through a phosphotransfer relay. Activation of PmrA can also occur as a consequence of *pmrB* mutation, previously observed as a cause of polymyxin resistance in a laboratory strain as well as in clinical isolates [64].

3.3. Plasmid resistance

Plasmid is most commonly a fragment of double-stranded circular DNA present in bacterial cells, physically separated from chromosomal DNA, which can replicate independently of the chromosome and has the ability to move to other cells. Some of the genes carried by the plasmid have a beneficial role for the host cells. One such example is enabling the host cell to survive in an environment that would be lethal or restrictive for growth. Some of these genes encode traits for antibiotic resistance as well as resistance to heavy metals [23, 55]. These resistance plasmids can be transferred from cell to cell through the mechanisms of transformation, conjugation and transduction. Conjugation is a very rare phenomenon, probably because it involves strict requirements. The donor cell must contain a conjugative element (it can be transposon or plasmid), and donor as well as recipient cells must establish physical contact that is sufficiently stable to allow the transfer of DNA. Both cells must be metabolically active to allow DNA synthesis (Fig. 3). The transduction process requires a metabolically active donor cell in which transducing phage particles are produced during viral reproduction. The recipient can be spatially and temporarily separated from the donor, because the genetic

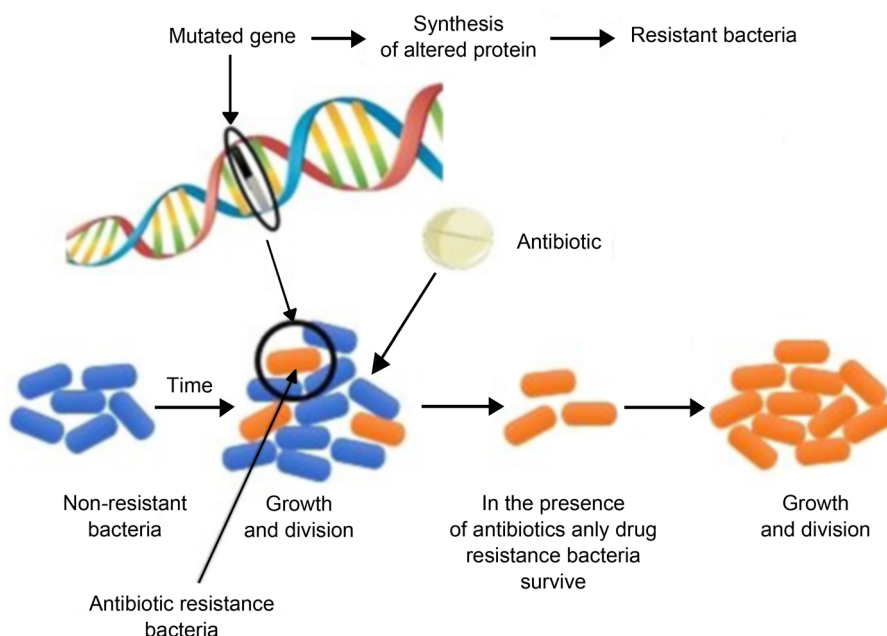


Fig. 3. Transfer of plasmids containing resistance genes from cell to cell.

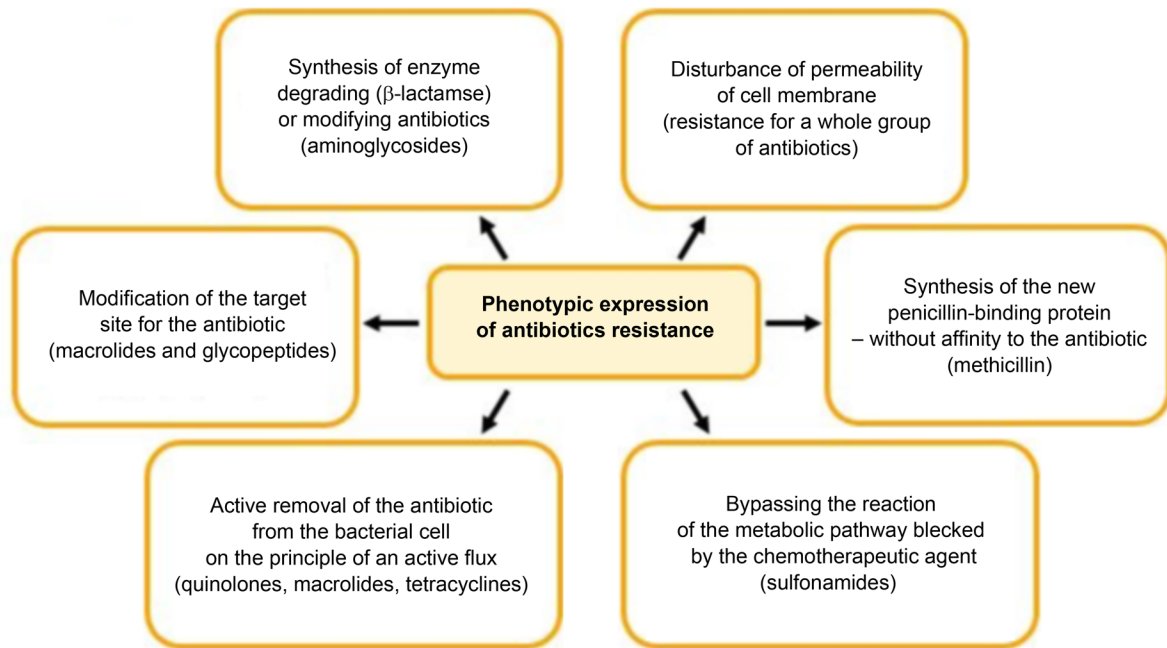


Fig. 4. Phenotypic expression of antibiotic resistance. Based on Doughari et al. [20].

information in the transducing particle can persist. In the transduction process the resistance gene can be transferred by phages because they are often resistant to many physical and chemical agents and can survive in the environment. The transformation process does not require a living donor cell, because the release of DNA during death and cell lysis is sufficient to provide free DNA. The persistence and dissemination of DNA in the environment determine how far in time and space the recipient cell can be separated from the donor. The recipient must be physiologically active to be able to adopt DNA. A close genetic relationship between donor and recipient cells is not necessary for the transfer of genes by transformation [14, 55, 93].

Studies of multiple antibiotic resistance determined by plasmids and transposons in Gram-negative bacteria (including *Pseudomonas* spp.) lead to the discovery of integrons. Integrons are genetic elements that represent an excision – an integration system involved in the capture, mobilization, and expression of gene cassettes conferring resistance to β -lactams, aminoglycosides, chloramphenicol, trimethoprim, sulfonamides, spectinomycin, streptomycin, and other antibiotics. All known integrons possess three elements essential for capturing exogenous genes: the integrase (*intI*) gene, a primary recombination site (*attI*), and a strong promoter. Gene cassettes are captured with the use of *attI* which allows recombination between the *attI* of the integron and a 59-nt element (also known as *attC* site) of a cassette. Unlike other excision-integration systems, integrons have multiple tandem gene cassettes inserted in one *attI* site and *intI* adjacent to *attI* rather than located in a gene cassette [43].

4. The most common resistance of clinical *P. aeruginosa* strains to antibiotics

P. aeruginosa, nosocomial pathogen, among other illnesses, are a cause of pneumonia, cystic fibrosis, meningitis, abscess, soft tissue infections, urinary tract infections, catheter associated infections, corneal infections and conjunctival erythema [15]. *P. aeruginosa* strains possess a diversity of resistance mechanisms which may lead to multi-drug or even pan-drug resistance. Standard antibiotic regimes against *P. aeruginosa* (penicillin, cephalosporins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and carbapenems) are becoming increasingly ineffective due to the rise in drug resistance [15, 21, 23].

The mechanism of antibiotic resistance in *P. aeruginosa* is multi-factorial and includes the expression of multiple antibiotic modifying enzymes (e.g. aminoglycoside modifying enzymes, β -lactamases including extended-spectrum β -lactamases and metallo-lactamases), antibiotic efflux pumps (MexAB-OprM, MexEF-OprN, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM) as well as the acquisition of chromosomally or plasmid encoded antibiotic resistance genes. Also chromosomal mutations caused by alterations in DNA gyrase and topoisomerase IV gene and lower membrane permeability in *P. aeruginosa* can contribute to antibiotic resistance [15].

4.1. Resistance to aminoglycosides

Aminoglycosides are commonly used in the treatment of infections caused by *P. aeruginosa* such as tobramycin, gentamicin, amikacin [79]. The mecha-

nism of bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics is very complicated and can run in three directions. In the first mode, the antibiotic can be subjected to enzymatic modification, the structure of the cellular receptor may change and the membrane permeability and transport of the antibiotic into the interior of the cell are disturbed [80, 83]. The second mechanism of bacterial resistance to aminoglycosides (characterized especially for Gram-negative bacteria, including *P. aeruginosa*) is based on the disruption of the energy-dependent antibiotic transport system to the cell receptor (ribosome 30S subunit), as a result of which the antibiotic does not reach the target site of action [80].

The third mechanism is based on a chromosomal mutation and leads to a change in the S12 protein of the ribosome 30S subunit and the loss of antibiotic binding ability [23]. Bolard *et al.* [98] documented that resistance of clinical strains of *P. aeruginosa* to aminoglycosides resulted from the production of transferable aminoglycoside-modifying enzymes, of 16S rRNA methylases, and mutational derepression of intrinsic multidrug efflux [98].

4.2. Resistance to fluoroquinolones

Fluoroquinolones have a broad range of antibacterial activity which is useful in the treatment of different diseases (e.g., urinary tract infections, gastrointestinal infections, respiratory tract infections, sexually transmitted diseases, bone and joint infections, and infections of the skin and soft tissue) [80]. The fluoroquinolones resistance genes are located in bacterial chromosome and mutations are the main mechanism of this resistance. The resistance to these antibiotics is predominantly caused by mutations in DNA topoisomerase II (gyrase) and topoisomerase IV enzymes [79]. These genes are responsible for the introduction and/or removal of supercoils in and the catenation/decatenation of DNA. Thus, they play an essential role in the replication, transcription, recombination, and repair of DNA. Gyrase is the preferred target of fluoroquinolones in Gram-negative bacteria; therefore, the resistance mutation first occurred in this enzyme. In some highly resistant isolates, additional mutations in topoisomerase IV can be observed. Both gyrase and topoisomerase are each comprised of two subunits, with fluoroquinolones resistance mutations occurring typically in the region assigned as “quinolone resistance determining region” (QRDR) of GyrA and/or ParC. Such mutations commonly occurred in fluoroquinolones-resistant *P. aeruginosa* [79].

An active efflux of the agents via antibiotic efflux pump is a typical phenomenon in *P. aeruginosa* where efflux-mediated resistance to quinolones (along with mutations in the genes of gyrase and topoisomerase)

seems to predominate as a mechanism of resistance to these agents. The active efflux mechanism is due to the broad substrate specificity of the fluoroquinolones efflux systems, which are capable of accommodating a variety of clinically relevant antimicrobial agents in addition to them [80]. Four members of the Resistance Nodulation Division family of multi-drug efflux systems, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-oprN, and MexXY-OprM are described to accommodate fluoroquinolones. Expression of *mexAB-oprM*, controlled directly or indirectly by three repressors MexR, NalD and NalC and mutations in *mexR*, *nalC* and *nalD*, have been observed in fluoroquinolone-resistant clinical *P. aeruginosa* isolates [79].

4.3. Resistance to cephalosporins

Besides fluorquinolones, β -lactam antibiotics are most frequently applied in the treatment of bacterial infections (e.g. bacterial meningitis, otitis media, salmonellosis). During the past 30 years, emergence and dissemination of β -lactam resistance in some pathogenic strains such as *P. aeruginosa* has become a serious problem worldwide. Of particular concern is the increasing resistance to 3rd and 4th cephalosporins generation and carbapenems. Gram-negative bacteria pursue various molecular strategies for developing resistance to these antibiotics, most commonly the ability to hydrolytic cleavage of the β -lactam ring of cephalosporins by β -lactamases, antibiotic expulsion by chromosomally encoded efflux mechanisms and reduced drug uptake owing to the loss of outer membrane porin proteins [79]. In *P. aeruginosa* four molecular classes (A-D) of β -lactamases, including metal dependent (Zn^{2+} – requiring, class B) and metal-independent (active site serine, classes A, C, and D) β -lactamases have been observed (79). *P. aeruginosa* typically carries chromosomal genes for two of the β -lactamases. It acts as a class C cephalosporinase (AmpC) and a class D oxacillinase (PoxB) [79]. AmpC is a well-known β -lactamase while *PoxB* activity was only detected in lab mutants lacking AmpC. AmpC is induced by a number of β -lactam antibiotics; therefore, it contributes to the internal resistance to the number of β -lactam antibiotics. However, AmpC cannot be induced by monobactams, the anti-pseudomonal penicillin piperacillin and many of the newer cephalosporins such as cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime and then the resistance is dependent upon mutational derepression of *ampC* (in fact, mutational derepression of *ampC* is the most common mechanism of resistance to β -lactams in *P. aeruginosa*) [79].

The original β -lactamases were plasmid-encoded class A enzymes with limited-spectrum of activity that could only hydrolyze penicillin and an older narrow-spectrum of cephalosporins. However, there are

reports in the literature about the presence of acquired β -lactamases in *P. aeruginosa* with an extended-spectrum of β -lactamase (ESBL) enzymes (classes A and D) capable of hydrolyzing a broader range of β -lactams, including a broad spectrum of cephalosporins, monobactams and carbapenemases (classes A, B and D) that hydrolyze most β -lactams, including carbapenems (excluding aztreonam) [76, 79].

Because bacteria produce effective resistance mechanisms against antibiotics commonly available and in use, and in addition, this resistance can be passed between them, the focus should turn to a quest for alternative methods of inhibiting bacterial metabolic activity. If, however, in some cases chemical antibiotics could be replaced by natural substances, the phenomenon of antibiotic abuse could be overcome and the spread of the antibiotic resistance phenomenon may be stopped or at least slowed down. Plant oils are an example of such natural bacteriostatic substances. There are currently many *in vitro* studies on the mechanisms of their antimicrobial activity.

5. Essential oils from plants as a natural alternative for antibiotics

Essential oils are mixtures of many aromatic compounds. They include, among others, terpenes, terpenoids, phenols and tannins, which determine their biological functions, such as antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activity. Natural oils are found in the cells of oil plants, namely, those containing more than 0.01% oil [26]. EOs are obtained from plants by steam distillation, cold pressing or extraction with organic solvents, as well as by a combination of these methods [11–12]. They have antimicrobial activity against many pathogenic microorganisms, including food pathogens and microbes responsible for the spoilage of food products. It is believed that due to differences in the cell wall structures of Gram-positive and Gram-negative bacteria, EOs have a weaker effect against Gram-negative bacteria, but oils containing thymol and carvacrol, for example, show comparable activity in both cases. Some EOs have a comparable or stronger antimicrobial effect than chemotherapeutics and preservatives. In addition, even long-term use of oils does not induce the immunization of microorganisms, as is the case with synthetic substances [12].

5.1. Antibacterial activity of plant EOs against *Pseudomonas* spp.

Many plant EOs are known to inhibit the growth of *Pseudomonas* strains [e.g., 3, 27, 31, 48, 56, 67, 68, 74, 75, 82, 87, 94, 96]. The antibacterial activity against

some *Pseudomonas* species of oregano, rosmarinus, thymus [1], satureja [16, 74, 75] eucalyptus [74], basil, citrus, fennel, lemongrass [75] has been confirmed. Examples of the minimal inhibitory concentrations (MIC) of selected EOs with biostatic activity against bacteria from *Pseudomonas* genera are collected in Table I. A comparison of the value of MICs is impossible, because the authors used different units and in most cases the data needed to re-calculate such values are missing. However, the MIC values are generally very low. That ability of EOs to inhibit bacteria grow in low concentrations is the main advantage of using them. According to literature data, the exposure of cells to such concentrations of natural antimicrobial agents neither kills bacteria nor stops their growth and thus does not cause selective pressure or the development of resistance mechanisms in bacteria cells [74].

5.2. How EOs work on the bacteria cell

The mechanism of antimicrobial activity of EOs is closely related to the type and amount of antimicrobial-active compounds in their composition. The active ingredients of EOs are a diverse group of organic compounds with a low molecular weight [12, 34, 40, 45]. The composition of the essential oil of a given plant may vary depending on the part of the plant from which the oil was obtained (leaves, flowers, etc.), the location and conditions of cultivation, and methods of isolation [12, 33, 45]. Due to the variability of the composition of EOs, the mechanism of their action is still not fully understood [34, 40, 48].

Pseudomonas bacteria are particularly resistant to antibiotics and disinfectants because of the increased coherence of the cytoplasmic membrane, due to the higher content of lipoproteins [44, 95]. Ingredients of EOs are characterized by high lipophilicity, thanks to which they have the ability to penetrate the membrane and cell wall of microbial cells. These molecules, after penetrating the cell, disrupt its integrity [34, 45]. It should be noted that the components of EOs can eliminate bacterial plasmid antibiotic resistance by inhibiting the replication of a given plasmid, thanks to which they can also exhibit antimicrobial activity against strains resistant to previously used substances [45]. Unfortunately, several factors still limit the effectiveness of EOs on bacterial cells. It has been shown that the penetration of essential oil components into Gram-negative bacteria cells is a more complicated process than in the case of Gram-positive bacteria due to differences in the structure of their cell walls [10, 12, 34, 45]. Differences in cell structure between bacterial species and strains also determine the potency of the antimicrobial activity of a given essential oil. It has been proved that the

Table I
Minimum inhibitory concentrations of EOs against *Pseudomonas* strains

Origin of EO	Strain		Reference
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	
	MIC		
<i>Achillea millefolium</i>	> 1000 µg/ml	N/A	85
<i>Anethium graveolens</i>	N/A	> 0.8% v/v	36–37
<i>Aniba rosaeodora</i>	> 2.0% v/v	N/A	84
<i>Apium graveolens</i>		> 0.8% v/v	36–37; 84
<i>Artemisia dracunculus</i>	N/A		36–37
<i>Boswellia carterii</i>	> 2.0% v/v	N/A	84
<i>Cananga odorata</i>			
<i>Cedrus atlantica</i>			
<i>Chamæmelum nobile</i>	N/A	> 0.8% v/v	36–37
<i>Cinnamomum cassia</i>		0.05% v/v	
<i>Cinnamomum verum</i>		0.1% v/v	
<i>Cistus ladaniferus pineniferum</i>			
<i>Citrus aurantifolia</i>	> 2.0% v/v	N/A	84
<i>Citrus aurantium</i>		> 0.8% v/v	36–37; 84
<i>Citrus bergamia</i>			
<i>Citrus limetta</i>	N/A		36–37; 84
<i>Citrus limon</i>	> 2.0% v/v		36–37; 84
<i>Citrus x paradisi</i>		N/A	84
<i>Citrus reticulata</i>	N/A	> 0.8% v/v	37
<i>Citrus reticulata</i> var. <i>madurensis</i>	> 2.0% v/v	N/A	84
<i>Citrus sinensis</i>	N/A	> 0.8% v/v	36–37
<i>Commiphora myrrha</i>	> 2.0% v/v	N/A	84
<i>Coriandrum sativum</i>		0.8% v/v	36–37
<i>Corydothymus capitatus</i>	N/A	0.025% v/v	
<i>Cuminum cyminum</i>		> 0.8% v/v	
<i>Cucurbita pepo</i>	> 2.0% v/v	N/A	84
<i>Cupressus sempervirens</i>		> 0.8% v/v	36–37; 84
<i>Curcuma longa</i>	N/A		36–37
<i>Cymbopogon citratus</i>	> 2.0% v/v	0.8% v/v	
<i>Cymbopogon martinii</i>		0.2% v/v	
<i>Cymbopogon nardus</i>		0.4% v/v	
<i>Daucus carota</i>		N/A	84
<i>Eucalyptus dives</i>	N/A	> 0.8% v/v	36–37
<i>Eucalyptus polybractea</i>	> 2.0% v/v	N/A	84
<i>Eugenia caryophyllus</i>	N/A	0.1% v/v	36–37
<i>Foeniculum vulgare</i>	> 2.0% v/v	N/A	84
<i>Gaultheria procumbens</i>			
<i>Juniperus communis</i>			
<i>Laurus nobilis</i>	N/A	> 0.8% v/v	36–37
<i>Lavandula angustifolia</i>	> 2.0% v/v	N/A	84
<i>Lavandula latifolia</i>	N/A	> 0.8% v/v	36–37
<i>Macadamia integrifolia</i>	> 2.0% v/v	N/A	54
<i>Matricaria chamomilla</i>	10.0 µg/ml		54
<i>Melaleuca alternifolia</i>	> 2.0% v/v	0.8% v/v	36–37; 84
<i>Melaleuca cajuputi</i>		> 0.8% v/v	

Table I
Continued

Origin of EO	Strain		Reference	
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>		
	MIC			
<i>Mentha piperita</i>	3.0 µg/ml	N/A	54	
<i>Mentha x piperita</i>	> 2.0% v/v	N/A	84	
<i>Mentha spicata</i>				
<i>Myristica fragrans</i>	N/A	> 0.8% v/v	36–37	
<i>Myrtus communis cineoliferum</i>	> 2.0% v/v	0.4% v/v	36–37; 84	
<i>Ocimum basilicum</i>				
<i>Origanum majorana</i>				
<i>Origanum vulgare</i>			N/A	84
<i>Pelargonium graveolens</i>				
<i>Pimpinella anisum</i>	N/A	0.1% v/v	36–37	
<i>Pimenta dioica</i>				
<i>Pimenta racemosa</i>	> 2.0% v/v	N/A	84	
<i>Pinus sylvestris</i>	> 2.0% v/v	> 0.8% v/v	36–37; 84	
<i>Piper nigrum</i>		N/A	84	
<i>Plantago major</i>		> 1000 µg/ml	N/A	85
<i>Pogostemon patchouli</i>	> 2.0% v/v	84		
<i>Psidium guajava</i>	> 1000 µg/ml	85		
<i>Punica granatum</i>	> 2.0% v/v	> 0.8% v/v	36–37; 84	
<i>Rosmarinus officinalis</i>				
<i>Salvia lavandulifolia</i>	N/A	0.8% v/v	36–37	
<i>Salvia officinalis</i>	> 2.0% v/v	N/A	84	
<i>Salvia sclarea</i>				
<i>Santalum album</i>				
<i>Satureja hortensis</i>	N/A	0.05% v/v	36–37	
<i>Syzygium aromaticum</i>	> 2.0% v/v	N/A	84	
<i>Tea tree</i>	4.0% v/v		87	
<i>Thymus vulgaris</i>	> 2.0% v/v	0.05% v/v	36–37; 84	
<i>Vetiveria zizanioides</i>		N/A	84	
<i>Zingiber officinale</i>		> 0.8% v/v	36–37; 84	

formation of exopolysaccharides occurring in *Pseudomonas* species causes their greater resistance to EOs than other Gram-negative bacteria [45].

The ingredients of EOs, due to their hydrophobicity, can affect the proportion of unsaturated fatty acids in the cell membrane and change their structure. The use of concentrations of oils lower than the MIC value in relation to bacteria can cause an increase in the amount of unsaturated fatty acids responsible for the fluidity of the cell membrane, which results in structural changes of the membrane [45]. Phenolic compounds contained in EOs also have a significant influence on their antibacterial activity. Treatment with thymol, carvacrol and eugenol may increase the content of saturated fatty acids while lowering the unsaturated fatty acid content in the bacterial cell membrane. This results in

an increased stiffness of the cell membrane and eventually its degradation. Essential oil components may also affect the activity of enzymes responsible for the synthesis of fatty acids included in the outer layer of the cell [10, 12, 22].

Active substances in EOs can affect proteins in bacterial cells and affect cell division. These compounds also affect the expression of genes. They can affect the regulation and synthesis of, for example, enzymes or chaperone proteins, *inter alia* related to the thermal stress of the cell. The action of essential oil components in relation to cellular proteins completely disturbs the functioning of the bacterial cell [10, 12, 40, 45].

The production of ATP in bacterial cells takes place in the cytosol by glycolysis. There is a correlation between intracellular and extracellular ATP concentration. The

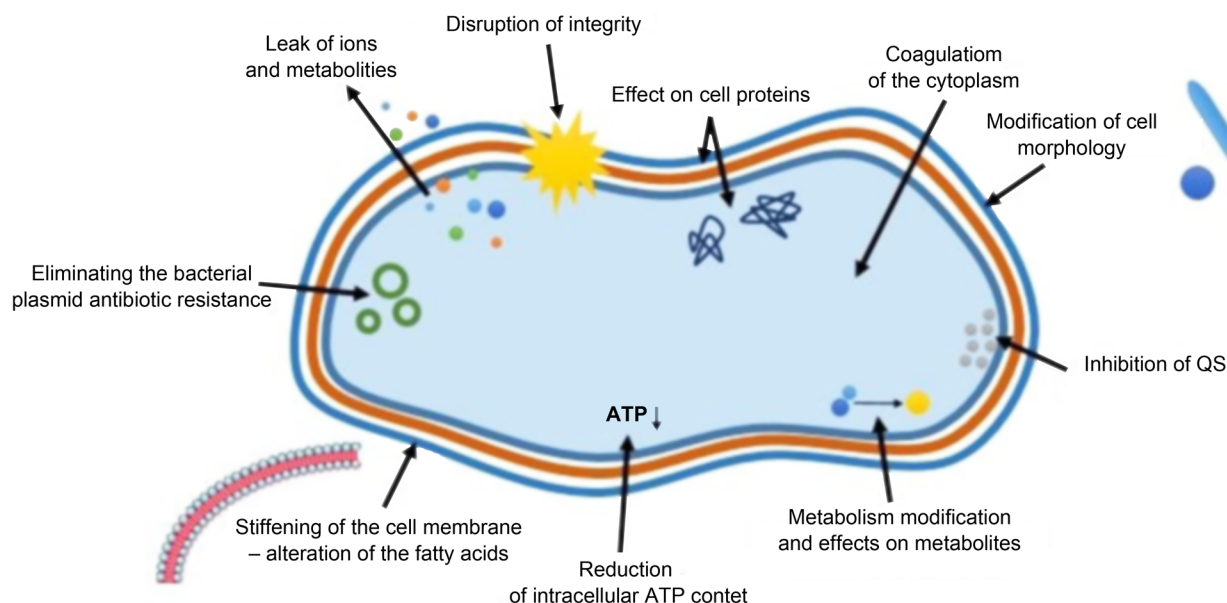


Fig. 5. The mode of antibacterial action of essential oils.

ingredients of EOs cause permeabilization of the cell membrane, thereby reducing the concentration of ATP inside the cell. Permeabilization of the cell membrane and leakage of ions (e.g. hydrogen and potassium) also causes excessive loss of inorganic phosphate, resulting in a reduction in the amount of intracellular ATP. The ATP content in the bacterial cell may also decrease due to the inhibitory activity of the oil components towards ATP-ase [10, 18, 40, 45, 48, 70]. EOs can affect bacterial cell metabolites [10, 40, 92, 95]. This effect may take place by interacting with metabolites already present in the cell or by altering metabolic pathways. This results in changes in the function of certain metabolites, as well as the synthesis of excessively small or large amounts of specific compounds. Changes in metabolic pathways may also result in the formation of new metabolites. This causes the occurrence of cellular stress and significant disturbances in the functioning of the cell [45].

EO components have the ability to modify the morphology of a bacterial cell. It has been shown that oblong-shaped cells are more sensitive to these compounds than coccoid ones. Changes in bacterial morphology are also different for Gram-positive and for Gram-negative bacteria. The action of EOs on bacteria can cause changes in the shape of cells, for example by extending or rounding them. It can be observed that bacterial cells treated with oils cease to be visibly separated from each other due to the degradation of their cell membranes. Damage to the protein-lipid membrane can lead to coagulation of the cytoplasm and a complete release of the cellular content. Changes of this type involve bacterial cell lysis [10].

The compounds included in the EOs are able to inhibit the phenomenon of Quorum Sensing (QS),

which is an intercellular communication system occurring at a sufficiently high cell density. QS regulates a number of activities, such as biofilm formation, sporulation or virulence factors [19]. The expression of genes involved in QS results in the production of signalling molecules. The inhibition of the phenomenon by the components of oils takes place by inhibiting the synthesis, transport or secretion of signalling molecules. This leads to a reduction in the formation of bacterial biofilms, proteolytic activity and to the reduction of bacterial virulence [48].

EOs have multidirectional antibacterial activity, which is associated with the diversity of their composition. Each of the biologically active compounds present in the essential oil has a different mechanism of action. There is a synergy between the compounds, which makes the oils work more comprehensively than all their components separately. In general, the activity of each essential oil consists of a series of activities of individual substances or their complexes, which results, *inter alia*, in decreasing cellular respiration and lowering intracellular pH, and eventually may lead to the inhibition of bacterial cell growth or lysis [10, 12, 40, 45].

Although there are many scientific reports documenting (*in vitro*) the strong antibacterial activity of essential oils against Gram-negative and Gram-positive bacteria, there are no reports from *in vivo* experiments. We can only find the information that some plant oils/extracts are used in the folk medicine in Brazil to treat some bacterial infections [38]. Unfortunately, there is no data available on its form of application and we do not know the concentration of oils contained in natural medicines and how effective they are.

6. Summary

Bacterial adaptation to antibiotics through the last decades has been very successful, resulting in an increase in antibiotic resistance and posing considerable medical problems. Further overuse of antibiotics will lead to serious consequences – the number of antibiotic resistant strains of different species will increase [25]. At present, throughout the world in general (including Poland) *Enterobacteriaceae* producing the New Delhi-Metallo-beta-laktam-1 gene (NDM-1) (including *Klebsiella pneumoniae* strains assigned as New Delhi) is spreading at an alarming rate. NDM belongs to the group of metal-B-lactamases (MBL), which *Pseudomonas aeruginosa* can produce, after acquiring a gene conditioning them. Now, there is an increase in the number of isolated clinical strains that are currently producing MBL in the world. Those bacteria are resistant to all β -lactam antibiotics (apart from monobactams). They are a problem not only because of the limited possibilities to treat infections caused by them, but also due to the fact that they can convey the “super resistance gene” to other bacteria, often harmless, also transforming them into superbugs resistant to many commonly used drugs. The only way to prevent the growing problem of antibiotic resistance is to rationalize the consumption of antibiotics and use them for industrial purposes. Therefore, the task for modern scientists is to find substances with bacteriostatic and bactericidal activity (with novel targets and modes of action), against which bacteria have not developed defence mechanisms. One such trend is the use of essential oils as inhibitors of bacterial growth.

Acknowledgements

This work was supported by the Grant by National Science Centre under number 2016/23/D/NZ9/00028.

References

1. Akthar M.S., Degaga B., Azam T.: Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *IBSPR*, **2**, 1–7 (2013)
2. Ali M.S., Ravikumar S., Beula J.M., Anuradha V., Yogananth N.: Insecticidal compounds from *Rhizophoraceae* mangrove plants for the management of dengue vector *Aedes aegypti*. *J. Vector Borne Dis.* **51**, 106–114 (2014)
3. Artini M., Patsilinakos A., Papa R., Božović M., Sabatino M., Garzoli S., Vrenna G., Tilotta M., Pepi F., Ragno R., Selan L.: Antimicrobial and antibiofilm activity and machine learning classification analysis of essential oils from different mediterranean plants against *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, **23**, 482–489 (2018)
4. Atarés L., Chiralt A.: Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends Food Sci. Tech.* **48**, 51–62 (2016)
5. Banu S.F., Rubini D., Rakshitaa S., Chandrasekar K., Murugan R., Wilson A., Gowrishankar R., Pandian S.K., Nithyanand P.: Antivirulent properties of underexplored *Cinnamomum tamala* essential oil and its synergistic effects with DNase against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms – an *in vitro* study. *Frontiers Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2017.01144 (2017)
6. Barrett E., Solanes R.E., Tang J.S., Palleroni N.J.: *Pseudomonas fluorescens* Biovar V: Its Resolution into distinct component groups and the relationship of these groups to other *P. fluorescens* Biovars, to *P. putida*, and to psychrotrophic *Pseudomonads* associated with food spoilage. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2709–2721 (1986)
7. Behki R.M., Khan S.U.: Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 746–749 (1986)
8. Bhatt P., Rathi K.R., Hazra S., Sharma A., Shete V.: Prevalence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in burn patients at a tertiary care centre. *IJB*, **23** (1) (2019)
9. Blair J.M.A., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J.V.: Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **42–51** (2015)
10. Burt S.: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**, 223–253 (2004)
11. Burt S.A., Reinders R.D.: Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**, 162–167 (2003)
12. Calo J.R., Crandall P.G., O'Bryan C.A., Ricke S.C.: Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*, **54**, 111–119 (2015)
13. Cannas S., Mollicotti P., Ruggeri M., Cubeddu M., Sanguinetti M., Marongiu B., Zanetti S.: Antimycotic activity of *Myrtus communis* L. towards *Candida* spp. from isolates. *J. Infect. Dev. Countr.* **7**, 295–298 (2013)
14. Cantón R., Ruiz-Garbajosa P.: Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr. Opin. Pharmacol.* **11**, 477–488 (2011)
15. Chakraborty J., Das S.: Characterization of the metabolic pathway and catabolic gene expression in biphenyl degrading marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JP-11. *Chemosph.* **144**, 1706–1714 (2016)
16. Chang S.T., Chen P.F., Chang S.C.: Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J. Ethnopharmacol.* **77**, 123–127 (2001)
17. Chebbi A., Hentati D., Zaghden H., Baccar N., Rezgui F., Chalbi M., Sayadi S., Chamkha M.: Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **122**, 128–140 (2017)
18. Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G.: The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* **88**, 170–175 (2000)
19. Defoirdt T.: *Quorum-Sensing* Systems as Targets for Antiviral Therapy. *Trends Microbiol.*, **26**(4), 312–328 (2018)
20. Doughari J.H., Ndakidemi P.A., Human I.S., Benade S.: Antioxidant, antimicrobial and antiverotoxic potentials of extracts of *Curtisia dentate*. *J. Ethnopharmacol.* **141**, 1041–1050 (2012)
21. Drenkard E., Ausubel F.M.: *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, **416**, 740–743 (2003)
22. Drenkard E.: Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microb. Infect.* **5**, 1213–1219 (2002)
23. Dzierżanowska D.: Antybiotykoterapia praktyczna. Wydawnictwo Medyczne, Polska, 2000

24. Edris A.E.: Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res.* **4**, 308–323 (2007)
25. Fair R.J., Tor Y.: Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect. Medicin. Chem.* **6**, 25–64 (2014)
26. Filipowicz N., Ochocka J.R.: Jałowiec pospolity *Juniperus communis* L. popularna lecznicza roślina olejkowa). *Borgis – Postępy Fitoterapii*, **1**, 26–31 (2008)
27. Fratianni F., De Martino L., Nazzaro F., De Feo V., Coppola R. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceutic.* **6**, 1451–1474 (2013)
28. Gillings M.R., Paulsen I.T., Tetu S.G.: Genomics and the evolution of antibiotic resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1388**, 92–108 (2016)
29. Gram L., Ravn L., Rasch M., Bruhn J.B., Christensen A.B., Givskov M.: Food spoilage – interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **78**, 79–97 (2002)
30. Guerra-Rosas M.I., Morales-Castro J., Ochoa-Martínez L.A., Salvia-Trujillo L., Martín-Belloso O.: Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocoll.* **52**, 438–446 (2016)
31. Gunes H., Gulen D., Mutlu R., Gumus A., Tas T., Topkaya A.E., Antibacterial effects of curcumin. An *in vitro* minimum inhibitory concentration study. *Toxicol. Ind. Health*, **32**, 246–250 (2016)
32. Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P.: Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiol.* **26**, 142–150 (2009)
33. Hammer K.A., Carson I and C.F., Riley T.V.: Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 985–990 (1999)
34. Hassoun A., Çoban Ö.E.: Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. *Trends Food Sci. Tech.* **68**, 26–36 (2017)
35. He Z., Spain J.C.: Studies of the Catabolic Pathway of Degradation of Nitrobenzene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45: Removal of the Amino Group from 2-Aminomuconic Semialdehyde. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4839–4843 (1997)
36. Hili P., Evans C.S., Veness R.G.: Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett. Appl. Microb.* **24**, 269–275 (1997)
37. Hocquet D., Vogne C., El Garch F., Vejux A., Gotoh N., Lee A., Lomovskaya O., Plésiat P.: MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *AAC*, **47**, 1371–1375 (2003)
38. Holetz F.B., Pessini G.L., Sanches N.R., Cortez D.A.G., Nakamura C.V., Filho B.P.D.: Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* DOI:10.1590/S0074-02762002000700017 (2002)
39. Holetz F.B., Nakamura C.V., Filho P.B.D, Cortez D.A.G., Morgado-Díaz J.A. Nakamura C.V Effect of Essential Oil of *Ocimum gratissimum* on the Trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai*. *Acta Protozool.* **42**, 269–276 (2003)
40. Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R.L.: Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol.* **3**, 12 (2012)
41. Jacoby G.A.: Mechanisms of resistance to quinolones. *CID*, **41**, 120–126 (2005)
42. Kiil K., Binnewies T.T., Willenbrock H., Hansen S.K., Yang L., Jelsbak L., Ussery D.W., Friis C.: Comparative genomics of *Pseudomonas* (in) Model *Pseudomonas* organism, pathogen, cell factory, ed. Rehm B.H.A., Wiley-VCH Verlag GmbH&Co, 2008, pp. 1–32
43. Kovalevskaya N.P.: Mobile Gene Cassettes and Integrans. *Molec. Biol.* **36**, 196–201 (2002)
44. Kręgiel D., Gutarowska B., Stobińska H., Żakowska Z.: Badania stanu higienicznego warunków produkcji (in) Mikrobiologia techniczna, ed. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., PWN SA., Warszawa, 2009, pp. 456–457
45. Król S.K., Skalicka-Woźniak K., Kandefer-Szerszeń M., Stepulak A.: Aktywność biologiczna i farmakologiczna olejków eterycznych w leczeniu i profilaktyce chorób infekcyjnych). *Postępy Hig. Med. Dośw.* **67**, 1000–1007 (2013)
46. Lach J., Stępiak L., Ociepa-Kubicka A.: Antibiotics in the environment as one of the barriers to sustainable development. *Problems of Sustainable Develop.* **1**, 197–207 (2018)
47. Lai P., Rao H., Gao Y.: Chemical composition, cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Anthriscus caucalis* M. Bieb grown in China. *Rec. Nat. Prod.* **12**, 290–294 (2018)
48. Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.-J.E.: A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 453–462 (2001)
49. Lambert P.A.: Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.R. Soc. Med.* **41**, 22–26 (2002)
50. Langsrud S., Sundheim G., Borgmann-Strahsen R.: Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas*. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 874–882 (2003)
51. Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K.S., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E.W., Lory S., Olson M.V.: Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, **406**, 959–964 (2010)
52. Lee Ventola C.: The Antibiotic Resistance Crisis. Part 1: Causes and Threats. *P&T*, **40**, 277–283 (2015)
53. Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D.: Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 582–610 (2009)
54. López P., Sánchez C., Batlle R., Nerín C.: Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *J. Agr. Food Chem.* **57**, 6939–6946 (2005)
55. Lorenz M.G., Wackernagel W.: Bacterial Gene Transfer by Natural Genetic Transformation in the Environment. *Microbiol. Rev.* **58**, 563–602 (1994)
56. Mann C.M., Cox S.D., Markham J.L.: The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 294–297 (2000)
57. Martínez J.L.: Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science*, **321**, 365–367 (2008)
58. Martinez J.L.: Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Poll.* **157**, 2893–2902 (2009)
59. Mesáros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-Delvallee M., Van Eldere J., Glupczynskif Y., Van Laethem Y., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., Tulkens P.M., Van Bambeek F.: *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 560–578 (2007)
60. Migula W.: Bacteriaceae (Stabchenbakterien) (in) Die natürlichen Pflanzenfamilien, ed. Engler A., Prantl K., Leipzig, 1985, p. 20–30
61. Migula W.: Ueber ein neues System der Bakterien. *Arb. Bakteriolog. Inst. Karlsruhe*, **1**, 235–238 (1984)
62. Mokhtarzadeh A., Alibakhshi A., Hejazi M., Omidi Y., Ezzati J., Dolatabadi N.: Bacterial-derived biopolymers: Advanced

- natural nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Trends Anal. Chem.* **82**, 367–384 (2016)
63. Mondello F.J.: Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas* strain LB400 genes encoding polychlorinated biphenyl degradation. *J. Bacteriol.* **171**, 1725–1732 (1989)
 64. Moskowitz S.M., Brannon M.K., Dasgupta N., Pier M., Sgambati N., Miller A.K., Selgrade S.E., Miller S.I., Dentos M., Conway S.P., Johansen H.K., Høiby N.: PmrB Mutations Promote Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *AAC*, **56**, 1019–1030
 65. Mundo M.A., Padilla-Zakour O.I., Worobo R.W.: Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *Int. J. Food Microbiol.* **97**, 1–8 (2004)
 66. Murray J.L., Kwon T., Marcotte E.M., Whiteley M.: Intrinsic Antimicrobial Resistance Determinants in the Superbug *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* **6**, e01603-15 (2015)
 67. Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V.: Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceutic.* **6**, 1451–1474 (2013)
 68. Nevas M., Korhonen A.R., Lindström M., Turkki P., Korkeala H.: Antibacterial efficiency of finish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *J. Food Protect.* **67**, 199–202 (2004)
 69. Nishino S.F., Spain J.C.: Degradation of Nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2520–2520 (1993)
 70. Oussalah M., Caillet S., Lacroix M.: Mechanism of action of spanish oregano, chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* **69**, 1046–1055 (2006)
 71. Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M.: Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Sci.* **73**, 236–244 (2006)
 72. Palleroni N.J.: Taxonomy of the *Pseudomonas* (in) The biology of *Pseudomonas*, ed. Sokatch J., Elsevier, 2012, pp. 3–20
 73. Parimala M., Shoba F.G.: In vitro antimicrobial activity and HPTLC analysis of hydroalcoholic seed extract of *Nymphaea nouchali* Burm. *BMC Complement Altern. Med.* **14**, 314–361 (2014)
 74. Pereira V., Dias C., Vasconcelos M.C., Rosa E., Saavedr M.J.: Antibacterial activity and synergistic effects between eucalyptus globulus leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Ind. Crops Prod.* **52**, 1–7 (2014)
 75. Pesavento G., Calónico C., Biliab A.R., Barnabei M., Calesinia F., Addona R., Mencarelli L., Carmagnini L., Martinoc M.C., Lo Nostro A.: Antibacterial activity of oregano, rosmarinus and thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Cont.* **54**, 188–199 (2015)
 76. Pfeifer Y., Cullik A., Witte W.: Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 371–379 (2010)
 77. Poole K.: Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *AAC*, **49**, 479–487 (2005)
 78. Poole K.: Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria. *AAC*, **44**, 2233–2241 (2000)
 79. Poole K.: *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front. Microbiol.* DOI:10.3389/fmicb.2011.00065 (2011)
 80. Potron A., Poirel L., Nordmann P.: Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *JAA*, **45**, 568–585 (2015)
 81. Prakash B., Kedia A., Mishra P.K., Dubey N.K.: Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. *Food Cont.* **47**, 381–391 (2015)
 82. Prakash V., Mishra P.P., Premi H. K., Walia A., Dhawan S., Kumar A.: Increasing incidence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in inpatients of a tertiary care hospital. *IJRMS*, **2**, 1202–1306 (2014)
 83. Pumbwe L., Piddock L.J.V.: Two efflux systems expressed simultaneously in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *AAC*, 2861–2864 (2000)
 84. Rothan H.A., Zulqarnain M., Ammar Y.A., Tan E.C., Rahman N.A., Yusof R.: Screening of antiviral activities in medicinal plants extracts against dengue virus using dengue NS2B-NS3 protease assay. *Trop. Biomed.* **31**, 286–296 (2014)
 85. Rydberg J., Larsson Ch., Mjörner H.: Resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Scand. J. Infect. Dis.* **26**, 317–320 (1994)
 86. Sacco L.P., Castellane T.C.L., Lopes E.M., de Macedo Lemos E.G., Alves L.M.C.: Properties of Polyhydroxyalkanoate Granules and Bioemulsifiers from *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. Isolates Growing on Glucose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **178**, 990–1001 (2016)
 87. Saeidnejad A.H., Rajaei P.: Chemical Composition, Antimicrobial Activity and Biological Properties of Essential Oils. *Int. J. Life Sci.* **2**, 9–13 (2012)
 88. Shahidi F., Ambigaipalan P.: Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J. Funct. Foods*, 820–897 (2015)
 89. Shannon E.M., Milillo S.R., Johnson M.G., Ricke S.C.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by exposure to a combination of nisin and cold-pressed terpenoleless valencia oil. *J. Food Sci.* **76**, 600–604 (2011)
 90. Sharma G., Rao S., Bansal A., Dang S., Gupta S., Gabrani R.: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals*, **42**, 1–7 (2014)
 91. Soković M., Glamočlija J., Marin P.D., Brkić D., van Griensven L.J.L.D.: Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, **15**, 7532–7546 (2010)
 92. Solórzano-Santos F., Miranda-Novales M.G.: Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 136–141 (2012)
 93. Spiers A.J., Buckling A., Rainey P.B.: The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiol.* **146**, 2345–2350 (2000)
 94. Sukphan P., Sritularak B., Mekboonsonglarp W., Lipipun V., Likhitwitayawuid K.: Chemical constituents of *Dendrobium venustum* and their antimalarial and anti-herpetic properties. *Nat. Prod. Commun.* **9**, 825–827 (2014)
 95. Turkiewicz M.: Mikroorganizmy ekstremofilne (in) Mikrobiologia techniczna, ed. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., PWN SA., Warszawa, 2013, pp. 456–457
 96. Wan J., Wilcock A., Covert M.J.: The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 152–158 (1998)
 97. Wasserfallen A., Rekić M., Harayama S.: A *Pseudomonas putida* Strain Able To Degrade M-Toluene in the Presence of 3-Chlorocatechol. *Bio/Technology*, **9**, 296–298 (1991)
 98. Wilton M., Charron-Mazenod L., Moore R., Lewenza S.: Extracellular DNA acidifies biofilms and induces aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *AAC*, **60**, 544–553 (2016)

EXOPOLYSACCHARIDE-PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA – HEALTH-PROMOTING PROPERTIES AND APPLICATION IN THE DAIRY INDUSTRY

Anna M. Berthold-Pluta¹, Antoni St. Pluta¹, Monika Garbowska¹, Lidia Stasiak-Różańska²

¹ Division of Milk Biotechnology, Department of Biotechnology, Microbiology and Food Evaluation, Faculty of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

² Division of Biotechnology and Microbiology, Department of Biotechnology, Microbiology and Food Evaluation, Faculty of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

Received in November 2018, accepted in March 2019

Abstract: Exopolysaccharides (EPS) are one of the classes of extracellular biopolymers synthesized by bacteria. Some strains of lactic acid bacteria (LAB) used in the dairy industry are able to synthesize EPS (EPS(+) strains). EPS may be secreted by a cell in the form of capsule or slime. Our review describes the factors influencing the activity of EPS production by LAB, the impact of the use of EPS(+) strains on the quality of fermented milk products (yoghurt, cheeses, etc.) and pro-health properties of EPS produced by LAB. The capability to synthesize EPS by LAB depends on many factors, e.g., affiliation to species and characteristics of strain, growth stage, composition of culture medium (type of carbon and nitrogen sources, and presence of other nutrients), temperature, pH, and presence of adjuvant microflora. The presence of EPS synthesized by LAB strains has a significant effect on changes in various properties of dairy products, including: yoghurt, kefir and many other fermented milk drinks, sour cream and cheeses. The EPS act as thickening, emulsifying and gelling agents, hence the use of EPS(+) strains may become a certain alternative to the use of thickeners in, e.g., fermented milks. During formation of a casein milk curd, EPS are able to bind water and thus reduce syneresis. The high water holding capacity of EPS has a positive effect on increasing viscosity and improving texture of low-fat cheeses. EPS are claimed to have health-promoting properties, like: anticarcinogenic, antioxidative, immunomodulatory and reducing blood cholesterol.

1. Introduction. 2. General characteristics of exopolysaccharides. 3. Factors affecting exopolysaccharides synthesis by lactic acid bacteria. 4. Effect of exopolysaccharides on the quality of fermented milk products. 4.1. Effect of EPS on the quality of yoghurts. 4.2. Effect of EPS on the quality of other fermented milk drinks. 4.3. Effect of EPS on the quality of cheeses. 5. Health-promoting properties of exopolysaccharides. 6. Conclusions

BAKTERIE MLEKOWE WYTWARZAJĄCE EGZOPOLISACHARYDY – WŁAŚCIWOŚCI PROZDROWOTNE I ZASTOSOWANIE W PRZEMYSŁE MLECZARSKIM

Streszczenie: Egzopolisacharydy (EPS) to jedna z klas biopolimerów pozakomórkowych wytwarzanych przez bakterie. Niektóre szczepy bakterii kwasu mlekowego (LAB) stosowane w przemyśle mleczarskim są w stanie syntetyzować EPS (szczepy EPS (+)). EPS mogą być wydzielane przez komórkę w postaci kapsulek lub śluzu. W niniejszym przeglądzie opisano czynniki wpływające na aktywność wytwarzania EPS przez LAB, wpływ stosowania szczepów EPS(+) na jakość fermentowanych produktów mlecznych (jogurty, sery, itp.) oraz prozdrowotne właściwości EPS wytwarzanych przez LAB. Zdolność wytwarzania EPS przez LAB zależy od wielu czynników, np. przynależności do gatunku i charakterystyki szczepu, fazy wzrostu, składu pożywki hodowlanej (rodzaj źródła węgla i azotu oraz obecność innych składników odżywczych), temperatury, pH i obecności mikroflory towarzyszącej. Obecność EPS wytwarzanych przez szczepy LAB ma istotny wpływ na zmiany różnych właściwości produktów mlecznych, w tym: jogurtów, kefirów i wielu innych mlek fermentowanych, śmietany oraz serów. EPS zachowują się jak środki zagęszczające, emulgujące i żelujące, a zatem użycie szczepów EPS(+) może stać się pewną alternatywą dla zastosowania środków zagęszczających, np. w mlekach fermentowanych. Podczas tworzenia się skrzepu kazeinowego, EPS mogą „wiązać” wodę i tym samym zmniejszać syneresę. Wysoka zdolność zatrzymywania wody przez EPS ma pozytywny wpływ na zwiększenie lepkości i poprawę tekstury serów, zwłaszcza tych o obniżonej zawartości tłuszczu. Wiadomo także, że EPS mają właściwości prozdrowotne, takie jak: przeciwnowotworowe, przeciwutleniające, immunomodulujące i obniżające poziom cholesterolu we krwi.

1. Wstęp. 2. Ogólna charakterystyka egzopolisacharydów. 3. Czynniki wpływające na wytwarzanie egzopolisacharydów przez bakterie kwasu mlekowego. 4. Wpływ egzopolisacharydów na jakość fermentowanych produktów mlecznych. 4.1. Wpływ EPS na jakość jogurtów. 4.2. Wpływ EPS na jakość innych fermentowanych napojów mlecznych. 4.3. Wpływ EPS na jakość serów. 5. Zdrowotne właściwości egzopolisacharydów. 6. Podsumowanie

Key words: EPS, LAB, fermented milk products, dairy products

Słowa kluczowe: EPS, bakterie mlekowe, mleczne produkty fermentowane, produkty mleczne

* Corresponding author: dr. Anna Berthold-Pluta, Division of Milk Biotechnology, Department of Biotechnology, Microbiology and Food Evaluation, Faculty of Food Sciences, Warsaw University of Life Sciences – SGGW, Nowoursynowska 159C St, 02-787 Warsaw, Poland; tel. +48 22 59 37 668; e-mail: anna_berthold@sggw.pl

1. Introduction

Apart from their basic metabolic activities, bacteria are also capable of synthesizing many biopolymers which differ in structure and chemical properties and thus in their functions in the cells. Considering their localization, biopolymers may be divided into intracellular (a small group with limited applications) and extracellular (a large group with wide applicability) ones. One of the classes of extracellular biopolymers includes exopolysaccharides (EPS). The EPS may be secreted outside a bacterial cell or may be produced as a capsule bound with external cellular membranes [66]. The EPS serve various functions in bacterial cells, like: protecting them against adverse effects of the environment (e.g., high or low temperature, high or low pH, and toxic metal ions) and against biological factors (e.g., phage attack), or helping them to colonize the environment (they are constituents of biofilms). It is presumed that EPS do not serve as a source of energy to bacterial cells, though some probiotic strains of lactic acid bacteria (LAB) were shown to be capable of EPS degradation [75]. Some LAB strains used in the dairy industry to produce fermented milks, e.g., yoghurt, kefir, sour milk and other fermented milk drinks, are able to synthesize EPS (the so-called EPS(+)) strains. The application of EPS(+) strains may have highly positive effects on the rheological properties and quality of the manufactured fermented products [7, 12]. The EPS produced by lactic acid bacteria during formation of the casein curd of milk are capable of water retention and thereby inhibit syneresis in fermented drinks. In addition, by reacting with proteins, they may contribute to the reinforcement of the casein network, which improves the rheological properties, quality of the final product, and cheese yield. The use of adjunct EPS(+) starter cultures improves the smoothness, viscosity and stability of a yoghurt gel and of other fermented milks [4, 22, 32]. The character of changes induced in fermented products by the presence of EPS is determined by the chemical composition and structure of these compounds, including e.g., their molecular weight, type of bonds and the presence of side chains. The rheological properties of EPS-containing food products are also affected by the time of their most active production by LAB during food manufacture [21, 22, 67, 75]. The most active LAB strains were shown to produce EPS at even 3 g/l [58]. The EPS display also some health-promoting properties. An increase in the viscosity of EPS-containing products is believed to extend the time of their gastrointestinal passage, which may be beneficial for temporary gut colonization by LAB [15]. In addition, many studies have shown the immunomodulatory, hypocholesterolemic, anti-carcinogenic, and anti-ulcerous activities of EPS [24, 26, 42, 43, 50, 56, 59].

2. General characteristics of exopolysaccharides

The EPS are high-molecular, long-chain linear biopolymers with side chains, which are constituted by carbohydrate units linked with α - and β -glycosidic bonds. They may be secreted by a cell to the extracellular space and remain bound with its surface thus forming a capsule (CPS – capsular exopolysaccharides). EPS may also be released to the external environment in the form of slime exopolysaccharides. Other types of polysaccharides include, e.g., cell wall polysaccharides (CWPS) linked with ionic or covalent bonds with the peptidoglycan layer on the cell's surface [88]. Taking into account the EPS structure, they may be divided into homopolysaccharides (HoPS) and heteropolysaccharides (HePS). Molecules of HoPS consist of successively repeated monosaccharides of one type (e.g., D-glucose or D-fructose), and include two major groups: glucans (dextran, mutan, alternan, reuteran, curdlan) and fructans (levan, inulin-type fructans) [63, 67, 88]. In turn, HePS are built of sub-units containing 3 to 8 monosaccharides: D-glucose, D-galactose, L-fructose, L-rhamnose or, alternatively, acids: D-glucuronic, L-glucuronic and D-mannuronic. The HePS may also contain amino sugars, like, e.g., N-acetyl-D-glucosamine or N-acetyl-D-galactosamine [7, 67]. Molecular weights of HePS range from 10^4 to 6×10^6 Da [7].

Glucans – being representatives of HoPS – are divided into α -D-glucans and β -D-glucans [63]. The production of α -D-glucans (e.g., dextran, mutan, alternan, reuteran) is assisted by dextransucrase which is an extracellular enzyme synthesized by, among others, bacteria of the *Leuconostoc*, *Streptococcus*, and *Lactobacillus* genera. In turn, β -D-glucans (e.g., curdlan) contain glucose residues linked with β -1,3-glycosidic bonds. The LAB capable of their production include strains from *Pediococcus*, *Oenococcus*, and *Lactobacillus* genera [7]. One of the HoPS α -D-glucans is dextran. The dextran molecule synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* has a linear structure and is built mainly of D-glucose residues (95%) linked with α -1,6-glycosidic bonds. The remaining part is constituted by side α -1,3-glycosidic bonds. Differences in the structure of dextrans isolated from various LAB include mainly: type, number and arrangement of side chains in a molecule. Bacterial strains which produce dextran include strains from *Leuconostoc*, *Streptococcus* and *Lactobacillus* genera. In the pure form, dextran is applied as a component of gel used for filtration (Sephadex) and as a blood substitute [7, 36]. Another example of α -D-glucan is mutan, which is built of D-glucose molecules linked in over 50% with α -1,3-glycosidic bonds. A high activity of the mutan-producing enzyme was reported in *Ln. mesenteroides* NRRL B-523 and B-1149 strains and in some strains from the genus *Streptococcus*. Mutan is respon-

sible for the adhesion of oral cavity microflora to teeth surface, which contributes to the formation of dental plaque and calculus [7, 63]. Alternan – which contains alternatively arranged α -1,6 and α -1,3-glycosidic bonds – is produced by an enzyme called alternansucrase. Capability for alternansucrase synthesis has so far been reported for three strains of *Ln. mesenteroides*: NRRL B-1355, NRRL B-1501, and NRRL B-1498 [63]. In turn, reuteran is an α -D-glucan produced by reuteransucrase enzyme isolated from *Lactobacillus reuteri* 121 and ATCC 55730 [44, 45]. Curdlan is a neutral, gel-forming β -D-glucan with a straight chain [48]. Curdlan and other polysaccharides belonging to this group were described as anti-carcinogens activating macrophages and leukocytes [7].

One of the most extensively described HePS is kefiran, built of mannose, glucose and galactose in approx. ratio of 1:5:7 [87]. Ability to produce kefiran was reported for: *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lb. kefirgranum*, *Lb. parakefiri*, *Lb. kefir*, *Lb. plantarum*, and *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* [3, 84].

3. Factors affecting exopolysaccharides synthesis by lactic acid bacteria

The capability to synthesize EPS by LAB varies and depends on many factors, and is species- and strain-specific. EPS production by lactic bacilli (*Lb. plantarum*) accounts for ca. 0.14 g/l [81], *Lb. bulgaricus* – 0.06–0.15 g/l [83] and *Lb. fermentum* – 0.75 g/l [41]. In turn, lactic streptococci (*S. thermophilus*) are able to produce 0.1 g/l [89]. However, the greatest production of EPS was demonstrated for *Lb. rhamnosus* RW-9595M strain (2.8 g/l), *Lb. kefiranofaciens* WT-2B strain (2.5 g/l) and *Lb. plantarum* BR2 strain (2.8 g/l) [58, 60, 79].

EPS production is determined by the growth stage of bacteria, composition of culture medium (type of carbon and nitrogen sources, and presence of other nutrients), temperature, and pH, and/or by the presence of adjuvant microflora [2, 3, 62, 72, 82, 86, 92, 93] (Tab. I). The concentration of produced EPS is largely affected by conditions of growth of bacteria which synthesize them, whereas the monosaccharide composition of most of the EPS does not depend on the available source of carbon. Interesting – especially from the perspective of practical application – seems to be the fact that the same LAB strain may produce different EPS under various growth conditions [39].

Ample studies have addressed the effect of culture medium composition on the concentration of EPS produced by LAB [69, 72, 82, 86, 92]. The *Lb. casei* and *Lb. bulgaricus* strains were shown to produce EPS in the concentration below 0.6 g/l when cultured in fermented milk, and at 1.5 g/l when grown in M17 broth

Table I
Factors affecting EPS synthesis by lactic acid bacteria

Factors affecting EPS synthesis by LAB	References
Species/strain	[41, 58, 60, 79, 81, 83, 89]
Growth stage of bacteria	[12, 13, 93]
Temperature	[12, 13, 49, 62, 72, 82, 92, 93]
pH of medium	[12, 39, 82, 93]
Time of incubation	[12–14, 53, 82, 93]
Culture medium composition (e.g., source of nitrogen and carbon)	[69, 72, 82, 83, 86, 92, 93]
Presence of adjuvant microflora	[2, 3]

enriched with various sources of carbon and nitrogen [69]. In turn, Rabha *et al.* [72] demonstrated milk to be a better medium for EPS production by *S. thermophilus* than MRS or M17 broths. Investigations on the effect of carbon source on EPS concentration have demonstrated that increased synthesis of kefiran by LAB engaged in kefir production was achieved with disaccharides used as sources of carbon. The enrichment of culture medium in saccharose or lactose enabled achieving kefiran content in kefir grains at 3.8% and 4.3%, respectively. When fructose or glucose were used in the culture medium as the source of carbon, the respective values were lower and reached 2.7% and 2.1% [92]. *Lb. fermentum* F6 produced greater amounts of EPS when glucose was used as a carbon source in the culture medium (ca. 0.035 g/l), compared to fructose > lactose > galactose [93]. *S. thermophilus* strain 23, isolated from homemade yoghurt in Bulgaria produced more EPS in the presence of sucrose (0.13 g/l) than in the presence of lactose (0.083 g/l) [83]. Results of this research show milk to be a good culture medium for EPS production by LAB, especially when the milk composition is modified by addition of a source of carbon. EPS production by LAB is also affected by the source of nitrogen in the culture medium. The highest concentration of kefiran was produced in the presence of organic nitrogen, e.g., casein (1.78 g kefiran per l), peptone (1.65 g/l), tryptone (1.64 g/l), or yeast extract (1.64 g/l), whereas a significantly lower amounts were noted when the culture medium was supplemented with inorganic nitrogen (urea – 0.89 g kefiran per l, ammonium chloride – 0.73 g/l, ammonium sulfate – 0.69 g/l) [86]. Similar results were reported by Zajšek *et al.* [92]. In their study, the content of kefiran in kefir grains was significantly lower when ammonium chloride was used as the source of nitrogen in the culture medium (1.3%), whereas its content increased to 1.8% when skim milk was used as the source of organic nitrogen (casein) [92]. Additional enrichment of the skim milk-based culture medium with peptone and yeast extract improved EPS

production also by *S. thermophilus* (2 to several times more, depending on the strain) [82].

Another factor influencing EPS synthesis by LAB is temperature. Many studies have shown the highest production of EPS at the so-called sub-optimal temperature, i.e. at few °C lower than the optimal temperature for growth of a given LAB species, by both mesophilic and thermophilic species [62, 72]. The overproduction of EPS at the sub-optimal temperature is a likely response of a bacterial cell to the physiological stress induced by the decreased temperature, especially in species or strains defective in proteolytic activity (e.g., *S. thermophilus*) [12, 72, 82]. In their research on thermophilic *S. thermophilus* BN1 with the optimal growth temperature at 42°C, Rabha *et al.* [72] demonstrated a significantly higher EPS production by this strain at a slightly lower than optimal growth temperature (37°C), irrespective of the culture medium composition. For example, in skim milk, EPS production by this strain reached 0.097 g PDM (polymer dry mass) per l at 42°C, but was by over 5-fold higher at 37°C. In their study on kefiran synthesis, Zajšek *et al.* [92] demonstrated the highest content of EPS in kefir grains at the temperature of 25°C (2.75%), and the lowest one – at 37°C (1.3%). In turn, the latter temperature turned out to be optimal for the growth of the kefir grains. In addition, the temperature of fermentation was found to influence the galactose to glucose ratio in the produced kefiran. At the temperature of 25°C, this ratio was lower (ca. 1.3) than at the temperature not facilitating EPS production (ca. 1.4). The temperature lower than the optimal growth temperature was also reported to enhance EPS production by *Lb. sake* 0–1 [13]. In turn, Zhang *et al.* [93] demonstrated that *Lb. fermentum* F6 produced the highest concentration of EPS when cultured at the optimal temperature (37°C). Likewise, strains of *Lb. fermentum* TDS030603 and *Lb. casei* CRL 870 were shown to produce the highest concentrations of EPS at the optimal temperature for their growth, i.e. 37°C [49]. Also Mende *et al.* [62] demonstrated higher EPS production by the *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081 strain at temperatures from 30°C to 40°C (optimal growth temperature for this strain is 40°C), while almost by half lower EPS production at 45°C. Thus, it may be concluded that, unlike the sub-optimal temperature, the temperature exceeding the optimal growth temperature does not enhance EPS synthesis as a form of cell response to physiological stress. Ruas-Madiedo *et al.* [76] showed no effect of temperature on EPS concentration in milk fermented by *Lc. lactis* subsp. *cremoris* strains. In turn, they observed significant differences in EPS concentrations produced in replications of the same experiment. This may result from the fact that the capability

to produce EPS is not a permanent trait, especially when strains are subjected to multiple proliferation due to the applied experimental method, which may lead to the loss of genes responsible for EPS synthesis that are located on plasmids. In addition, prolonged incubation may induce hydrolytic degradation of EPS.

Another factor influencing LAB ability to produce EPS is the time of incubation. Zhang *et al.* [93] showed the growth stage of *Lb. fermentum* F6 to be associated with EPS synthesis, the concentration of which decreased at the end of fermentation in the stationary phase of growth (after 32 h). Presumably, the *Lb. fermentum* F6 strain produces glycohydrolase which catalyzes degradation of polysaccharides, thereby decreasing EPS synthesis. EPS degradation after prolonged incubation was also observed in cultures of other LAB strains [12, 13]. Decreased EPS degradation was demonstrated when bacteria were incubated at a lower temperature and pH than the ones optimal for their growth [14, 53]. In the case of some LAB (e.g., *S. thermophilus* ST111), the concentration of EPS did not change over time, as the maximum yield of their synthesis occurred at the end of fermentation [82].

The optimal pH value for EPS production varies between species and between LAB strains, however usually reaches around 6 [12]. The intensive growth and maximum capability to produce EPS by *S. thermophilus* ST111 were determined in the culture medium with active acidity of 6.2 [82]. In turn, the optimal pH for EPS synthesis by *Lb. delbrückii* subsp. *bulgaricus* is similar to the optimal pH for their growth (ca. 6.5) [39]. Finally, Zhang *et al.* [93] demonstrated the highest EPS production by the *Lb. fermentum* F6 strain at pH 6.5, and a higher cell count of these bacteria at a slightly higher pH value (ca. 7.0).

One of the factors which influence EPS synthesis by some LAB strains is the simultaneous presence of other LAB in the culture medium. This issue is of high importance as mixed cultures constituted by several strains of the same LAB species or by different species are usually used in the industrial practice. Mechanisms of their interactions may be based on cooperation (e.g., *Lb. bulgaricus* and *S. thermophilus* in yoghurt), but also on competition or even growth inhibition (production of bacteriocins). Investigations on the effect of the mixed culture of the EPS(+) strain *Lb. kefiranofaciens* ZW3 with the EPS(–) strains: *Lb. bulgaricus* and *S. thermophilus*, demonstrated that the ZW3 strain produced EPS of a different structure compared to the EPS from a culture without yoghurt bacteria [3]. The mixed culture of EPS(+) and EPS(–) strains may, therefore, offer the possibility of changing the structure and type of the produced EPS and – indirectly – of inducing highly specified, desired changes in the final product.

4. Effect of exopolysaccharides on the quality of fermented milk products

The capability of LAB to produce EPS in milk during fermentation is an especially important trait for the dairy industry as these compounds increase the apparent viscosity and improve the texture and mouthfeel of the dairy products as well as inhibit syneresis even at their low concentrations (from 0.1 to 0.4 g/l) [17]. The presence of EPS synthesized by LAB strains has a significant effect on changes in various properties of dairy products, including: yoghurt, kefir and many other fermented milk drinks, sour cream and cheeses [15, 28, 32, 46].

The consumption of milk desserts, yoghurts and snacks is observed to successively increase in the United States and also in EU Member States. Products of this type contain additives which affect their rheological properties; but, on the other hand, they have to meet consumers demands for natural and healthy foods [54]. In Great Britain, the addition of stabilizers is regulated

by law, e.g., the addition of starch and other stabilizers to yoghurts should not exceed 1% and 0.5%, respectively. It seems that in this respect the EPS(+) strains of LAB may arise interest of the dairy industry. The use of EPS(+) starters strongly inscribes itself into the “clean label” trend which is rather a permanent and irreversible trend that needs to be taken into account by food producers [57].

The EPS(+) LAB strains are applied as adjunct starters in the manufacture of fermented products or are incorporated into mixed starters (Tab. II). The effect of EPS on the rheological properties of fermented milk is more tangible and yields better outcomes when EPS are synthesized *in situ* in the product than when they are added as one of the components [15, 46]. Such an approach responds to economic concerns but may be applied mainly in the case of fermented products.

Viscosity of milk gels formed during fermentation by the EPS(+) LAB strains depends not only on the quantity of EPS products but also, to a significant extent, on their primary structure (stiffness of the EPS

Table II
The use of EPS(+) lactic bacteria in the production of various fermented milk products

LAB species	Products
<i>Lactococcus</i>	
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	buttermilk, kefir, Nordic ropy milks
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	buttermilk, kefir, dahi, Nordic ropy milks, reduced-fat Cheddar cheeses
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	buttermilk, kefir, dahi, Nordic ropy milks
<i>Streptococcus</i>	
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	yoghurt, dahi, Nordic ropy milks, fresh cheeses, Mozzarella cheese, Feta cheese
<i>Leuconostoc</i>	
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	kefir, sour cream
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	kefir, sour cream, Nordic ropy milks
<i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	kefir, sour cream, Nordic ropy milks
<i>Lactobacillus</i>	
<i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>delbrückii</i>	fermented milks, yoghurt
<i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>lactis</i>	fermented milks
<i>Lb. delbrückii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	yoghurt, Bulgarian buttermilk, Nordic ropy milks
<i>Lb. helveticus</i>	kefir, kumys, Nordic ropy milks
<i>Lb. acidophilus</i>	acidophilus milk, kefir
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	fermented milks
<i>Lb. johnsonii</i>	probiotic yoghurt, fermented milks
<i>Lb. casei</i>	probiotic yoghurt
<i>Lb. paracasei</i>	probiotic yoghurt
<i>Lb. reuteri</i>	probiotic yoghurt
<i>Lb. rhamnosus</i>	kefir, acid-rennet cheeses
<i>Lb. plantarum</i>	kefir
<i>Lb. kefir</i>	kefir
<i>Lb. kefiranoferasciens</i>	kefir
<i>Lb. brevis</i>	kefir
<i>Lb. fermentum</i>	kefir

backbone), molecular weight, molecule rotation and charge [21, 22, 74, 75], character of bonds inside the molecule, and potential presence of side chains [21, 22, 46, 47]. At the same molecular weight, EPS molecules with a linear structure occupy a larger volume in solution compared to the branched EPS, owing to which they have a greater impact on increasing the viscosity of a solution. Also the stiffness of the EPS backbone contributes to the increase in the viscosity of the EPS-containing solutions by preventing potential deformations of the molecules. In milk gels, the presence of EPS with high molecular weight, stiff and only slightly branched has a positive impact on their viscosity and stability, and on their reduced syneresis [21]. The high degree of branching and the flexibility of the backbone leads to the “compactness” of the EPS, which results in a decreased viscosity of the solution. The microstructure of a milk gel formed with LAB strains producing EPS of this type is similar to the microstructure of a gel made with EPS(-) cultures [22].

Another factor affecting the rheological properties of milk gels produced with EPS(+) LAB strains is the charge of the EPS molecule. The use of strains synthesizing anionic EPS in starter cultures enabled achieving milk gels with higher values of the elastic modulus (G') compared to the starters containing LAB strains synthesizing neutral EPS. The improvement of milk gels elasticity is probably due to electrostatic interactions between the anionic EPS and the positively charged molecules of casein, which strengthen the casein network [22]. Apart from dynamic changes in casein micelles, colloidal calcium phosphate, whey proteins and other milk constituents which cause the formation of a protein network, the process of milk fermentation by EPS(+) bacteria involves also EPS synthesis and incorporation into the protein network. Due to the successive release of EPS by LAB, increased acidity and change in environment conditions, interactions between EPS and milk proteins are also likely. The equilibrium between repulsion/attraction of EPS and milk proteins varies throughout fermentation and depends mainly on the environment pH as the released casein micelles bear a negative charge in milk with $\text{pH} > 4.6$ – 6.65 , a neutral charge in milk with $\text{pH} 4.6$, and a positive charge in milk with pH below 4.6 , whilst the process of fermentation may terminate at different pH values. Understanding the dynamics of this phenomenon allows modifying and controlling final properties of milk gels [23, 46].

The EPS may influence the formation of a casein gel structure by acting as a “bond”, and their effect on the protein matrix and structure depends on their concentration, interactions with proteins and characteristics of a molecule [22, 70]. They may positively co-act with milk proteins, thus increasing values of the viscoelastic

moduli and firmness of milk gels [70]. This may be caused by electrostatic interactions between casein and EPS, which besides protein-protein interactions may additionally reinforce the structure of a casein gel [6, 21, 23, 70]. Interactions between milk proteins and EPS in a complicated system, like, e.g., fermented milk, are poorly recognized. Research addressing this problem need to take into account the differences in the mechanisms of formation of these compounds during fermentation compared to the process aided with stabilizers (modified starches and pectins) added to milk prior to its souring. Some studies related to the protein-EPS interactions were conducted in model systems, wherein purified EPS preparations were added to milk before fermentation [23]. However, milks produced in this way had different, less beneficial rheological properties than the fermented milks in which EPS were synthesized by LAB *in situ* during fermentation [15]. This may result from the loss of certain properties of EPS (for example ropy character) during purification and drying of their preparations [23]. Results of investigations on the interactions between proteins and EPS in skim milk media do not fully reflect the complexity of milk composition which, apart from casein and whey proteins, includes also fat, lactose and mineral salts. Ayala-Hernández *et al.* [5, 6] in their studies on interactions between whey proteins and EPS with a well-known structure produced *in situ* by *Lc. lactis* in a simplified model of milk (milk permeate) demonstrated interactions between anionic EPS and whey proteins occurring in the amount of 2–8%, at $\text{pH} 4.5$ after 12 h of fermentation at a temperature of 30°C . The interactions between EPS and proteins (both casein and whey proteins) during fermentation of a dairy model system were also confirmed by Gentés *et al.* [22].

A largely significant aspect from the practical perspective is the capability of milk gels to “recover” after stirring and pumping during production of e.g., stirred yoghurts. Studies addressing the effect of stirring milk gels produced using EPS(+) strains and for comparison using EPS(-) strains demonstrated that although the EPS-containing gels were indeed more compact, a greater decrease was noted in the value of their elastic modulus (G') after stirring than in the gels free of EPS [31, 32, 46]. The non-stirred gel formed by the EPS(+) strain showed a network of thick, continuous aggregates of milk with large void spaces, whereas the gel formed by the EPS(-) strain showed a network of fine protein strands and small void spaces around. Provided that a considerable amount of EPS is produced after the onset of aggregation of casein micelles, it would be entrapped in pockets between casein clusters and constrained around the bacteria cells. Such spatial constrain would reduce the probability of possible interactions of EPS with casein micelles and induce an inten-

sification of the mutual interactions of casein particles. Stirring changes the structure of the EPS-containing gel, causing the formation of a larger number of pores and channels and of less compact protein aggregates. In addition, it causes the formation of channels with EPS-containing serum concentrated in larger strands than those observed in the undisturbed gels. This was attributable to the intense mutual interactions and aggregation of EPS molecules in the continuous serum phase due to repulsion with casein micelles. After stirring, the microstructure of the gel formed by the EPS(+) strain showed a significantly lower connectivity between protein aggregates, most likely as a result of the void spaces filled with EPS which surrounded casein. In the EPS(-) gels, stirring resulted in a more aggregated protein network with more connectivity between protein strands and smaller pores compared to the stirred gels containing EPS. The structure of the stirred EPS(-) gel did not differ significantly from its structure before stirring, but was more dense and aggregated [31, 32, 46]. Kristo *et al.* [46] concluded that the time needed to reach the gelation point (T_{gel}) in the case of milk fermented by the EPS(+) *Lc. lactis* subsp. *cremoris* JFR1 strain and time needed to reach pH 4.6 ($T_{pH4.6}$) were longer than for the milk fermented by the EPS(-) strain. However, the presence of EPS caused no significant difference in gelation pH (pH_{gel}).

4.1. Effect of EPS on the quality of yoghurts

Yoghurt is a type of fermented milk manufactured using starter cultures: *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, usually used in the 1:1 ratio. The production of EPS by these strains ranges from 0.057 to 0.424 g/l for *Lb. bulgaricus* and from 0.030 to 0.890 g/l for *S. thermophilus* [7]. The growth of yoghurt bacteria during yoghurt manufacture and their impact on the improvement of textural properties and decrease of syneresis are described as synergistic. Lactobacilli of the *Lb. bulgaricus* species grow first and produce metabolites (mainly amino acids) needed for the growth of *S. thermophilus*, which in turn produces formic acid and CO₂ thereby stimulating the growth of *Lb. bulgaricus*. Bacilli of *Lb. bulgaricus* are mainly responsible for souring, whereas *S. thermophilus* – for the formation of a typical yoghurt flavor [7]. Maintaining the desired consistency of yoghurt is one of the major technological problems in the yoghurt production process. The two most often produced types of yoghurts include set yoghurt (intact curd) and stirred yoghurt (disrupted curd). They differ significantly in their rheological properties: the set yoghurt exhibits traits of a gel, while the stirred yoghurt is a non-Newtonian liquid and a watery, slightly elastic fluid. Unlike in the set yoghurt, damage of the curd structure in the

stirred yoghurt may occur at all stages of the production process, i.e. since the moment of curd formation (pH 4.6–4.7) till product packaging [80].

The final consistency of the natural yoghurt is a result of the effects of the milk protein complex, lactic acid, and potentially EPS produced by yoghurt cultures. Desired rheological properties of yoghurt include: hardness, firmness, cohesiveness, smoothness, viscosity, and stability, which when taken all together signify lack of susceptibility to syneresis. The set yoghurt with a high level of syneresis is usually perceived by consumers as having a defect, although this is a natural phenomenon in this product [4, 34]. In the industrial practice, syneresis is reduced through increasing contents of dry matter components in processing milk to 14% (w/w) with dry dairy ingredients (skim milk powder, whey protein isolate, whey protein concentrate, sodium- or calcium caseinates) or by using stabilizers [80]. Unfortunately, the use of these additives always increases production costs of yoghurts, and the addition of stabilizers (gelatin, modified starches, gums) may negatively affect yogurt perception by potential consumers. Some countries have imposed bans or reductions in stabilizers use in yoghurt production. Yoghurts manufactured with strains capable of EPS production are less susceptible to syneresis, have higher viscosity and water holding capacity as well as smoother and creamy texture and decreased granularity. It may be concluded that the use of EPS(+) LAB strains in the production of yoghurts offers the possibility of limiting or eliminating the necessity of applying texture-forming additives [4, 27, 32–34, 70].

The microstructure of yoghurt is built of a casein matrix with incorporated fat globules. Spaces in the gel are filled with serum and LAB cells. The cultures applied in yoghurt production synthesize both capsular EPS and EPS secreted in the form of slime outside the cell. The capsular EPS are in direct contact with cells which use them for incorporation into the protein matrix. Different EPS(+) strains have various effects on the rheological properties of yoghurts. The stirred yoghurts produced using starter cultures synthesizing slime EPS were shown to be more viscous than those produced using cultures synthesizing capsular EPS or using EPS(-) starter cultures [4]. The yoghurt cultures may be divided into three groups: cultures incapable of EPS production, cultures producing capsular EPS, and cultures capable of producing both capsular and slime EPS [16, 34]. The cultures synthesizing slime EPS are generally believed to positively affect yoghurt consistency; however, the overproduction of these EPS leads to the manufacture of products with undesired mucosity, clearly perceptible in the mouth [19, 80]. The capsular EPS are usually not produced in excessive amounts as the size of the capsule is limited by the size of the

bacterial cell. Bacterial capsules loosen gel microstructure in yoghurt, thus making its consistency smoother. Starter cultures synthesizing capsular EPS and lacking slime formation, produce yoghurts which are more viscous, more stable and less susceptible to syneresis compared to yoghurts produced by cultures incapable of synthesizing capsular EPS. In addition, the capsules retard diffusion of lactic acid from the cells, thus lead with time to the arrest of acid production by the cells. This may prevent the over-souring of yoghurt [31, 34]. A comparison of the microstructure of milk fermented using EPS(-) cultures (*S. thermophilus* CHCC 5843 and *Lb. delbrüeckii* subsp. *bulgaricus* CHCC 769), slime cultures (*S. thermophilus* CHCC 3534 and *Lb. delbrüeckii* subsp. *bulgaricus* CHCC 769), highly viscous cultures (*Lc. lactis* subsp. *cremoris* JFR1), revealed a compact protein network being formed in the milk fermented with the EPS(-) cultures, whilst a curd with an open, porous structure – in the milk fermented with EPS(+) cultures. The milk fermented using the slime strain *S. thermophilus* CHCC 3534 developed a structure with greater pores than that fermented with *Lc. lactis* subsp. *cremoris* JFR1 strain producing capsular EPS. In both cases, the EPS were separated from the protein network. In addition, more abrupt syneresis was observed in the milk fermented with EPS(-) than with EPS(+) cultures [34].

A study aimed at elucidating the role of EPS in modeling the structure of yoghurt was conducted with LAB strains capable and incapable of EPS production. Viscosity was always higher in yoghurts manufactured with EPS(+) strains. Importantly, the EPS do not impart their own taste nor aroma to the product, but only improve its texture. The use of LAB cultures producing slime EPS was shown to enable reduction of soy protein isolate or concentrate added during the production of stirred yoghurt [4]. Partial or complete substitution of EPS(-) *Lb. delbrüeckii* subsp. *bulgaricus* strain with EPS(+) *Lb. rhamnosus* JAAS8 strain during yoghurt production contributed to a 16–21% increase of viscosity and to increased water holding capacity in the fermented milk [90].

A weak correlation was demonstrated between yoghurt texture and EPS concentration [71]. The major factors which affect the texture of EPS-containing yoghurts are interactions of these compounds with casein which vary depending on the EPS structure and product acidity (pH) [7]. In turn, Ruas-Madiedo *et al.* [76] showed that the compactness and cohesiveness of yoghurt produced with EPS(+) strains decreases along with the increasing EPS concentration. The appearance of EPS before aggregation of casein micelles caused lower curd compactness.

To determine the effect of EPS addition on the microstructure and rheological properties of yoghurts,

purified EPS were added to milk intended for yoghurt production (in concentrations of 0.01–0.03%. Viscosity, water holding capacity, hardness, and microstructure of yoghurts were strongly dependent on EPS concentration. The best water holding capacity (i.e. the least syneresis) was found in the yoghurt produced with 0.01% EPS. In turn, the 0.03% addition of EPS caused greater syneresis – likewise in EPS-free yoghurt. Also in terms of rheological properties, the best turned out to be the yoghurt with 0.01% addition of EPS [91]. In turn, yoghurt produced with yoghurt cultures and the EPS(+) *Lb. kefiranofaciens* ZW3 strain had a higher viscosity compared to the traditional yoghurt. No syneresis was observed during its storage (1 month) at room temperature, which indicates the advisability of using adjunct EPS(+) cultures in traditional yoghurt starters [3].

4.2. Effect of EPS on the quality of other fermented milk drinks

Kefir is a traditional, slightly sparkled fermented milk, popular in countries of Eastern Europe. It contains ca. 0.1–1.0% ethanol, depending on the fermentation activity of yeast. In the traditional method of kefir production, kefir grains containing homo- and heterofermentative LAB, yeast and acetic acid bacteria are added to milk. Cells of bacteria constituting kefir grains are built into the EPS matrix [16]. Today, however, kefir starters are used in kefir production instead of kefir grains which were filtered from the final product after completed fermentation. Although kefir starters contain yeast, they are incapable of fermenting lactose. For this reason, modern industrial kefirs are slightly saturated with CO₂ and contain trace amounts of alcohol. A recent trend assumes simplification of production technologies of fermented milk drinks, e.g., kefir or buttermilk, mainly owing to the concerns for their stability and economy. These practices may, however, lead to the deterioration of flavor and biodiversity of these products. A few of EPS(+) LAB strains, e.g., *Lb. plantarum* KF5 synthesizing an EPS composed of mannose, glucose and galactose [87], as well as *Lb. kefiranofaciens* ZW3, producing a heteropolysaccharide constituted by only glucose and galactose [85, 86], were isolated from kefir. The EPS isolated during fermentation of cow's milk with kefir grains consisted of glucose and galactose monomers (in the ratio of 1:0.43), whereas that isolated during soybean milk fermentation was composed of the same type of monomers but in the ratio of 1:1.14 [55]. In turn, EPS isolated from kefir produced based on soybean milk by Botelho *et al.* [9] contained only glucose monomers.

The EPS(+) cultures are also applied for the production of dahi – a traditional yoghurt made based on buf-

falo, cow or goat milk, popular throughout South Asian countries, such as, Bangladesh, India, Nepal, Pakistan, Sri Lanka, etc. [66]. The fat content of dahi is usually between 3.5–8%, but dahi assortment includes also its low-fat milk versions. Unfortunately, like for yoghurt and other dairy products, the low fat content of dahi has a negative effect on its quality, including lack of flavor, weak body and unstable texture [80]. The use of EPS(+) *Lc. lactis* subsp. *lactis* PM23, *S. thermophilus* ST and *Lc. lactis* NCDC 191 for the production of low-fat dahi was reported to improve its texture and flavor [8].

Selected strains of mesophilic LAB (*Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, and *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*) and thermophilic LAB (*S. thermophilus*, *Lb. delbrüeckii* subsp. *bulgaricus*, and *Lb. helveticus*), synthesizing slime EPS, and alternatively strains of yeast and molds are used in the Scandinavian countries to manufacture Nordic ropy milk type products, e.g., Långfil, tette, and viili. To manufacture these drinks, milk inoculated with the starter culture is fermented at relatively low temperature of 15–25°C even for several dozen hours. The low fermentation temperature needed to produce these drinks facilitates better EPS synthesis at the temperature significantly lower than the optimal growth temperature and the sub-optimal temperature as well [62, 72]. These types of fermented milks are also popular in Russia and Mongolia [16]. Viili is manufactured with the use of *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* and mold *Geotrichum candidum*, which grows on the product's surface. The EPS isolated from viili contains rhamnose, glucose and galactose in the molar ratio of 1:1.45:1.75, and a phosphate group attached to a D-galactopyranosyl residue [16].

4.3. Effect of EPS on the quality of cheeses

Results of studies conducted so far have demonstrated the use of EPS(+) LAB strains to be a good alternative for the production of low-fat cheeses [12, 82]. The high water holding capacity of EPS has a positive effect on increasing viscosity and improving the texture and consistency of such cheeses [16, 25]. In many countries, some varieties of ripening rennet cheeses are produced in the low-fat version to meet demands of consumers who prefer low-caloric foods. A frequent defect of these cheeses is their little intense taste and rubbery, dry and grainy texture. A challenge faced by producers is to maintain their mouthfeel and texture similar to these of the full-fat cheeses, by modifying the production technology. Such attempts have been described in literature and involved the use of EPS(+) LAB [16, 20].

Traditional fresh Egyptian cheese (Karish) manufactured by acid coagulation of skim milk often shows

texture defects typical of low-fat cheeses. In the microscope image, Karish cheese produced with the addition of EPS(+) cultures of LAB had a strongly porous structure and EPS were visible as clusters of fibers inside large pores. In turn, cheeses made using mutants of the same strains but incapable of producing EPS had a compact structure with small pores. The curd formed with the use of EPS(+) cultures was less rigid and more susceptible to deformations, compared to the curd formed using EPS(–) cultures [1, 31–33]. Fresh cheeses made with the use of EPS(+) cultures had smoother consistency than those produced without the addition of these cultures. Such improvement of textural properties may increase consumer acceptance of low-fat products. In addition, the use of EPS(+) cultures for the manufacture of fresh cheeses may increase consumer acceptance of cheeses containing fruits or vegetables owing to their improved spreadability and smoothness [1]. Hahn *et al.* [27] reported that the use of EPS(+) strains for the production of fresh cheeses may successfully reduce the formation of rough particles, thereby allowing to avoid the addition of hydrocolloids. Fresh cheeses are highly susceptible to syneresis owing to their high water content. The use of *S. thermophilus* synthesizing slime EPS in the manufacture of Mexican Panela cheese caused increased water retention in the cheese matrix. This enabled increasing production yield and reducing syneresis, as well as manufacturing cheeses with a smoother, creamy structure [38]. The use of EPS(+) *Lb. rhamnosus* CRL 1808 strain to manufacture spreadable acid-rennet goat cheeses improved their texture without the addition of gums or stabilizers [18].

Mozzarella cheese is manufactured with the use of thermophilic starter cultures including *S. thermophilus* and *Lb. helveticus* or *Lb. delbrüeckii* subsp. *bulgaricus*. It is the most common cheese topping on pizza, and therefore should satisfy highly specific functional requirements, including sufficient melting, adequate stretchability, and easy shredding, in particular. Unfortunately, low-fat Mozzarella cheeses do not develop good melting properties. Among the solutions to this quality problem is the use of EPS(+) starters. The low-fat Mozzarella cheeses manufactured with EPS(+) starters showed from 2 to 7% higher moisture, good consistency and better functional properties (melting) than these produced without EPS(+) cultures. It was also demonstrated that the use of strains synthesizing ropy EPS allowed obtaining higher water content in cheeses than the use of strains producing capsular EPS. The use of the first causes significant EPS diffusion in whey and an increase in whey viscosity, which may pose problems during its further processing (evaporation, drying) [68].

The application of LAB synthesizing EPS may be a potential means for increasing the water content and improving the textural properties of low-fat Cheddar

type cheeses. Considering that LAB have the GRAS status (i.e. are Generally Recognized As Safe for health on the basis of use for a long time), the use of an EPS(+) strain for the production of fermented foods is more propitious than the use of polysaccharides synthesized by other bacteria (e.g., dextran, gellan, pullulan, xanthan, alginates) [11]. Costa *et al.* [10] demonstrated that slime EPS synthesized by an adjunct culture of *Lc. lactis* subsp. *cremoris* DPC 6532 used in the manufacture of a semi-fat Cheddar cheese did not interfere with the milk coagulation process, but significantly affected syneresis reduction shortly after curd cutting. The EPS were uniformly distributed throughout the cheese matrix and specifically located near the aqueous pores, probably binding the moisture and causing the observed decrease in syneresis. This was reflected in the chemical composition of the cheeses with EPS, which were characterized by a higher water content but lower contents of protein and calcium, and by a higher yield.

Feta cheese manufactured using the EPS(+) cultures has an open microstructure with large pores which are partly or completely filled with a crosslinked structure, e.g., water with suspended EPS. In turn, Feta cheese produced with EPS(-) cultures has a compact structure. Aggregates of casein micelles in the cheese made with EPS-producing culture appeared to be more fused than these in the cheese made with the EPS-non-producing cultures [31, 32]. In earlier studies, Hassan *et al.* [30] also observed that the structure of Feta cheese produced with EPS(-) cultures had larger casein agglomerates than the cheese without EPS, and noticed a lower number of fat globules in the cheese made with EPS(+) cultures.

Investigations on the effect of EPS on the quality of cheeses were mainly conducted with products having a reduced or low fat content, while little is known about EPS effect on the quality of full-fat cheeses. Most likely, this effect was not investigated as the full-fat cheeses are soft and smooth enough, and free of defects typical of the reduced-fat cheeses.

5. Health-promoting properties of exopolysaccharides

Apart from the sensory benefits stemming from the EPS presence in dairy products, many EPS(+) LAB strains exhibit traits of probiotics [12, 16]. The probiotic activity of LAB strains is believed to be partly associated with the activity of biopolymers they produce [84]. The probiotic effect is then due not only to the activity of viable microorganisms, but also to the activity of their metabolites, including EPS (the so-called postbiotics). Beside the prebiotic effect of EPS [78], they are also claimed to have antibacterial activities

[35, 41] and many health-promoting properties like: anti-carcinogenic, antioxidative, immunomodulatory, and reducing blood cholesterol [24, 26, 42, 43, 50, 51, 56, 59, 64, 65, 79, 84].

The mechanism of the anti-carcinogenic activity of EPS has not been fully elucidated, yet. According to one of the theories, EPS induce apoptosis of cancer cells by removing reactive oxygen species from their mitochondria [24, 51, 94]. The oxidative stress plays a key role in cancer pathogenesis. Levels of antioxidants and reactive oxygen species are correlated with the development and malignant transformation of cancer cells [37, 51]. Given that the EPS are capable of promoting antioxidative transformations and removing reactive oxygen species in cancer cells, they may as well inhibit their proliferation [51]. An EPS isolated from *Lb. helveticus* MB2-1 and built of three fractions: LHEPS-1, LHEPS-2 and LHEPS-3, inhibited the proliferation of human stomach cancer cells (cell line BGC-823). This activity was revealed for crude EPS (non-purified) and for all its three fractions. All of the three fractions were also capable of scavenging free radicals and chelating iron ions [50–52]. Liu *et al.* [56] demonstrated that EPS produced by *Lb. casei* 01, in the concentration from 0.005 to 0.050 g/l, exhibited a high antiproliferative against HT-29 human colon cancer cells, but simultaneously had no adverse effect on enteric cells. It is speculated that this activity involves both regulating enteric cells work and reducing cytotoxicity of procarcinogens. EPS of the probiotic *Lb. plantarum* NRRL B-4496 was active *in vitro* against tumor cell lines: Caco (intestinal carcinoma cell line), HeLa (cervical carcinoma cell line), HCT116 (colon carcinoma cell line), Hep-G2 (liver carcinoma cell line), MCF-7 (breast carcinoma cell line), and HEp2 (larynx carcinoma cell line) [29]. Results of the above-cited works allow hypothesizing that the anti-carcinogenic properties of EPS are ascribed to their activity as effectors inducing the immune response of the host body.

The slime EPS produced by *Lb. paraplantarum* BGCG11 was shown to exhibit anti-inflammatory and anti-suppressive properties [64]. This *in vitro* study demonstrated that during stimulation of peripheral blood mononuclear cells with purified EPS, the cytokine profile was similar to that induced by stimulation with viable cells of *Lb. paraplantarum* BGCG11.

Furthermore, EPS isolated from *Lc. lactis* subsp. *lactis*, and its derivative with selenium (Se-EPS) were capable of scavenging free superoxide anions (O_2^-) and hydroxyl radicals. In addition, they enhanced the activity of selected enzymes, e.g., catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase, while reducing the level of malondialdehyde (MDA; an indicator of adverse lipid peroxidation) in blood serum and liver, and displaying immunomodulatory properties [26].

The hydrogen peroxide radical scavenging activity was also reported for EPS produced by *S. thermophilus* CC30 [40]. Investigations on the immunomodulatory properties of EPS produced by LAB (*Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lb. delbrüeckii* subsp. *bulgaricus*, and *Ln. mesenteroides*) demonstrated some EPS to be capable of inducing cytokine synthesis [84] and modifying selected functions of macrophages and splenocytes [42]. EPS derived from yogurt obtained by fermentation using *Lb. delbrüeckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 exerted immunostimulatory effects in mice [61]. Yogurt and semi-hard cheeses represent suitable food matrices for the delivery of the hypocholesterolemic EPS-producer strain *Lb. mucosae* DPC 6426 [77]. Works addressing kefir indicate its antibacterial properties, ability to accelerate wound healing [73], and its potential to reduce blood pressure and cholesterol level in blood serum [59].

Apart from the longstanding health benefits resulting from the use of EPS(+) strains in the manufacture of dairy products, the EPS may also beneficially affect consumer physiology. Presumably, increased viscosity of EPS-containing fermented milk may prolong the time of its retention in the gastrointestinal tract, which is beneficial for, e.g., temporary gut colonization by probiotic bacteria. Another example of the putative health benefits of some EPS is their degradation in the colon to short-chain fatty acids (SCFAs) by enteric microflora. The SCFAs, and butyric acid in particular, provide energy to intestinal epithelium cells, and some of them prevent colon cancer [95].

6. Conclusions

In the food industry, the role of LAB capable of producing EPS may increase considering their effects on the rheological and textural properties of fermented food products. The EPS synthesized by LAB differ in their chemical composition and structure. Their production is relatively low (up to 0.1%), however they improve the consistency, stability and the widely understood quality of the final product. LAB capable of EPS production may find application in the manufacture of fermented milk products in countries in which the use of stabilizers is either limited or banned by law. The application of adjunct EPS(+) cultures in the production of fermented milks allows reducing the addition of milk powder and other thickening agents and offers vast possibilities for diversifying production, inscribing into the “clean label” trend, and meeting consumer demands for health-promoting and/or dedicated foods. EPS(+) cultures could also be applied in cheesemaking, especially in the case of low-fat fresh cheeses. Such a solution would prevent whey syneresis, but simulta-

neously give the sensation of some “fatness”. Besides technological benefits, the use of EPS(+) LAB for the manufacture of fermented dairy products has a positive effect on human health, involving mainly elongation of fermented milk retention in the gastrointestinal tract and thereby promoting gut colonization by probiotic bacteria. The EPS are usually prebiotics, however they also exhibit anti-ulcer, immunomodulatory, anti-carcinogenic activities and reduce blood cholesterol.

References

1. Ahmed N.H., El Soda M., Hassan A.N., Frank J.: Improving the textural properties of an acid-coagulated (Karish) cheese using exopolysaccharide producing cultures. *LWT – Food Sci. Technol.* **38**, 843–847 (2005)
2. Ahmed Z., Wang Y., Anjum N., Ahmad H., Ahmad A., Raza M.: Characterization of new exopolysaccharides produced by coculturing of *L. kefirifaciens* with yoghurt strains. *Int. J. Biol. Macromol.* **59**, 377–383 (2013)
3. Ahmed Z., Wang Y., Anjum N., Ahmed A., Khan S.: Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir – Part II. *Food Hydrocolloid.* **30**, 343–350 (2013)
4. Amatayakul T., Halmos A.L., Sherkat F., Shah N.P.: Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide-producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. *Int. Dairy J.* **16**, 40–51 (2006)
5. Ayala-Hernández I., Goff H.D., Corredig M.: Interactions between milk proteins and exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* observed by scanning electron microscopy. *J. Dairy Sci.* **91**, 2583–2590 (2008)
6. Ayala-Hernández I., Hassan A.N., Goff H.D., Corredig M.: Effect of protein supplementation on the rheological characteristics of milk permeates fermented with exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Food Hydrocolloid.* **23**, 1299–1304 (2009)
7. Badel S., Bernardi T., Michaud P.: New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **29**, 54–66 (2011)
8. Behare P., Singh R., Singh R.P.: Exopolysaccharide-producing mesophilic lactic cultures for preparation of fat-free Dahi – an Indian fermented milk. *J. Dairy Res.* **76**, 90–97 (2009)
9. Botelho P.S., Maciel M.I.S., Bueno L.A., Marques M.F., Marques D.N., Sarmiento Silva T.M.: Characterisation of a new exopolysaccharide obtained from fermented kefir grains in soymilk. *Carbohydr. Polym.* **107**, 1–6 (2014)
10. Costa N., O’Callaghan D., Mateo M., Chaurin V., Castillo M., Hannon J., McSweeney P., Beresford T.: Influence of an exopolysaccharide produced by a starter on milk coagulation and curd syneresis. *Int. Dairy J.* **22**, 48–57 (2012)
11. Dabour N., Kheadr E.E., Fliss I., LaPointe G.: Impact of rop and capsular exopolysaccharide – producing strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on reduced-fat Cheddar cheese production and whey composition. *Int. Dairy J.* **15**, 459–471 (2005)
12. De Vuyst L., De Vin F., Vaninglgem F., Degeest B.: Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **11**, 687–707 (2001)
13. Degeest B., Janssens B., De Vuyst L.: Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0–1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 470–477 (2001)

14. Degeest B., Mozzi F., De Vuyst L.: Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **79**, 161–174 (2002)
15. Doleyres Y., Schaub L., Lacroix C.: Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties. *J. Dairy Sci.* **88**, 4146–4156 (2005)
16. Duboc P., Mollet B.: Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J.* **11**, 759–818 (2001)
17. Feldmane J., Semjonovs P., Ciprovica I.: Potential of exopolysaccharides in yoghurt production. *Int. J. Nutr. Food Eng.* **7**, 767–770 (2013)
18. Florencia F.S.: Rheology of spreadable goat cheese made with autochthonous lactic cultures differing in their ability to produce exopolysaccharides. *Food Sci. Technol.* **33**, 233–238 (2013)
19. Folkenberg D.M., Dejmeek P., Skriver A., Ipsen R.: Interactions between EPS-producing *Streptococcus thermophilus* strains in mixed yoghurt cultures. *J. Dairy Res.* **73**, 385–393 (2006)
20. Garbowska M., Pluta A., Berthold-Pluta A.: Changes during ripening of reduced-fat Dutch-type cheeses produced with low temperature and long time (LTLT) heat-treated adjunct starter culture. *LWT – Food Sci. Technol.* **69**, 287–294 (2016)
21. Gentès M.C., St-Gelais D., Turgeon S.L.: Exopolysaccharide-milk protein interactions in a dairy model system simulating yoghurt conditions. *Dairy Sci. Technol.* **93**, 255–271 (2013)
22. Gentès M.C., St-Gelais D., Turgeon S.L.: Gel formation and rheological properties of fermented milk with in situ exopolysaccharide production by lactic acid bacteria. *Dairy Sci. Technol.* **91**, 645–661 (2011)
23. Girard M., Schaffer-Lequart C.: Attractive interactions between selected anionic exopolysaccharides and milk proteins. *Food Hydrocolloid.* **22**, 1425–1434 (2008)
24. Goodarzi N., Varshochian R., Kamalinia G., Atyabi F., Dinarvand R.: A review of polysaccharide cytotoxic drug conjugates for cancer therapy. *Carbohydr. Polym.* **92**, 1280–1293 (2013)
25. Grattepanche F., Audet P., Lacroix C.: Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in a fresh cheese model. *Int. Dairy J.* **17**, 123–132 (2007)
26. Guo Y., Pan D., Li H., Sun Y., Zeng X., Yan B.: Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Food Chem.* **138**, 84–89 (2013)
27. Hahn C., Müller E., Wille S., Weiss J., Atamer Z., Hinrichs J.: Control of microgel particle growth in fresh cheese (concentrated fermented milk) with an exopolysaccharide-producing starter culture. *Int. Dairy J.* **36**, 46–54 (2014)
28. Haque A., Richardson R., Morris E.: Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yoghurt. *Food Hydrocolloid.* **15**, 593–602 (2001)
29. Haroun B.M., Refaat B.M., El-Menoufy H.A., Amin H.A., El-Waseif A.A.: Structure analysis and antitumor activity of the exopolysaccharide from probiotic *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 *in vitro* and *in vivo*. *J. Appl. Sci. Res.* **9**, 425–434 (2013)
30. Hassan A.N., Frank J., Correding M.: Microstructure of Feta cheese made using different cultures as determined by confocal scanning laser microscopy. *J. Food Sci.* **67**, 2750–2753 (2002)
31. Hassan A.N., Frank J., El Soda M.: Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. *Int. Dairy J.* **13**, 755–762 (2003)
32. Hassan A.N., Frank J.F., Qvist K.B.: Direct observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using confocal scanning laser microscopy. *J. Dairy Sci.* **85**, 1705–1708 (2002)
33. Hassan A.N., Frank J.F.: Starter Cultures and Their Use (in) Applied Dairy Microbiology, red. E.H. Marth, J.L. Steele, Marcel Dekker Inc., New York, 2001, pp. 165–167
34. Hassan A.N., Ipsen R., Janzen T., Qvist K.B.: Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *J. Dairy Sci.* **86**, 1632–1638 (2003)
35. Huang J., Kao C., Liu W., Fang T.: Characterization of high exopolysaccharide producing *Lactobacillus* strains isolated from mustard pickles for potential probiotic applications. *Int. Microbiol.* **20**, 75–84 (2017)
36. Iliev I., Ivanova I., Ignatova C.: Glucansucrases from lactic acid bacteria. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **20**, 15–20 (2006)
37. Jiang C., Wang M., Liu J., Gan D., Zeng X.: Extraction, preliminary characterization, antioxidant and anticancer activities *in vitro* of polysaccharides from *Cyclina sinensis*. *Carbohydr. Polym.* **84**, 851–857 (2011)
38. Jiménez-Guzmán J., Flores-Nájera A., Cruz-Guerrero A.E., García-Garibay M.: Use of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Mexican Panela cheese. *LWT – Food Sci. Technol.* **42**, 1508–1512 (2009)
39. Jolly L., Vincent S.J.F., Duboc P., Neeser J.: Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**, 367–374 (2002)
40. Kanamarlapudi S.L.R.K., Muddada S.: Characterization of exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. *BioMed Res. Int.* DOI: 10.1155/2017/4201809 (2017)
41. Khalil E.S., Manap M.Y., Shuhaimi Mustafa S., Amid M., Alhelli A.M., Aljoubori A.: Probiotic characteristics of exopolysaccharides-producing *Lactobacillus* isolated from some traditional Malaysian fermented foods. *CyTA – J. Food* **16**, 287–298 (2018)
42. Kitazawa H., Ishii Y., Uemura J., Kawai Y., Saito T., Kaneko T., Noda K., Itoh T.: Augmentation of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrückii* ssp. *bulgaricus*. *Food Microbiol.* **17**, 109–118 (2000)
43. Korcz E., Kerényi Z., Varga L.: Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. *Food Funct.* **9**, 3057–3068 (2018)
44. Kralj S., Stripling E., Sanders P., van Geel-Schutten G.H., Dijkhuizen L.: Highly hydrolytic reuteransucrase from probiotic *Lactobacillus reuteri* strain ATCC 55730. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3942–3950 (2005)
45. Kralj S., van Geel-Schutten G.H., van der Maarel M.J.E.C., Dijkhuizen L.: Biochemical and molecular characterization of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase. *Microbiol.* **150**, 2099–2112 (2004)
46. Kristo E., Miao Z., Correding M.: The role of exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in structure formation and recovery of acid milk gels. *Int. Dairy J.* **21**, 656–662 (2011)
47. Laneville S.I., Turgeon S.L.: Microstructure and stability of skim milk acid gels containing an anionic bacterial exopolysaccharide and commercial polysaccharides. *Int. Dairy J.* **37**, 5–15 (2014)
48. Lee I.Y.: Curdlan. (in) Polysaccharides I: Polysaccharides from prokaryotes., red. E.J. Vandamme, S. De Baets, A. Steinbuchel, Wiley, London, 2002, pp. 135–458.
49. Leo F., Hashida S., Kumagai D., Uchida K., Motoshima H., Arai I., Asakuma S., Fukuda K., Urashima T.: Studies on a neutral exopolysaccharide of *Lactobacillus fermentum* TDS030603. *J. Appl. Glycosci.* **54**, 223–229 (2007)
50. Li W., Ji J., Chen X., Jiang M., Rui X., Dong M.: Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides

- from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydr. Polym.* **102**, 351–359 (2014)
51. Li W., Ji J., Tang W., Rui X., Chen X., Jiang M., Dong M.: Characterization of an antiproliferative exopolysaccharide (LHEPS-2) from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydr. Polym.* **105**, 334–340 (2014)
 52. Li W., Xia X., Tang W., Ji J., Rui X., Chen X., Jiang M., Zhou J., Zhang Q., Dong M.: Structural characterization and anticancer activity of cell-bound exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3454–3463 (2015)
 53. Lin T.Y., Chang Chien M.F.: Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chem.* **100**, 1419–1423 (2007)
 54. Linares D.M., Gómez C., Renes E., Fresno J.M., Tornadijo M.E., Ross R.P., Stanton C.: Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. *Front. Microbiol.* **8**, 846 (2017)
 55. Liu C., Chu F., Chou C., Yu R.: Antiproliferative and anti-cytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. *Mutat. Res.* **721**, 157–162 (2011)
 56. Liu J.R., Chen M.J., Lin C.W.: Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. *J. Food Sci.* **67**, 104–108 (2002)
 57. Lynch K.M., Zannini E., Coffey A., Arendt E.K.: Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annu. Rev. Food Sci. T.* **9**, 155–176 (2018)
 58. Macedo M.G., Lacroix C., Gardner N.J., Champagne C.P.: Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595 M in whey permeate. *Int. Dairy J.* **12**, 419–426 (2002)
 59. Maeda H., Zhu X., Omura K., Suzuki S., Kitamura S.: Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *BioFactors.* **22**, 197–200 (2004)
 60. Maeda H., Zhu X., Suzuki S., Suzuki K., Kitamura S.: Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B^T. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5533–5538 (2004)
 61. Makino S., Sato A., Goto A., Nakamura M., Ogawa M., Chiba Y., Hemmi J., Kano H., Takeda K., Okumura K., Asami Y.: Enhanced natural killer cell activation by exopolysaccharides derived from yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1. *J. Dairy Sci.* **99**, 915–923 (2016)
 62. Mende S., Krzyzanowski L., Weber J., Jaros D., Rohm H.: Growth and exopolysaccharide yield of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* DSM 20081 in batch and continuous bioreactor experiments at constant pH. *J. Biosci. Bioeng.* **113**, 185–191 (2012)
 63. Monsan P., Bozonnet S., Albenne C., Joucla G., Willemot R., Remaud-Simeon M.: Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **11**, 675–685 (2001)
 64. Nikolic M., López P., Strahinic I., Suárez A., Kojic M., Fernández-García M., Topisirovic L., Golic N., Ruas-Madiedo P.: Characterization of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **158**, 155–162 (2012)
 65. Pan D., Mei X.: Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. *Carbohydr. Polym.* **80**, 908–914 (2010)
 66. Patel A., Prajapati J.: Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Adv. Dairy Res.* **1**, 107–114 (2013)
 67. Patel S., Majumder A., Goyal A.: Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian J. Microbiol.* **52**, 3–12 (2012)
 68. Petersen B., Dave R., McMahon D., Oberg C., Broadbert J.: Influence of capsular and ropy exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* on Mozzarella cheese and cheese whey. *J. Dairy Sci.* **83**, 1952–1956 (2000)
 69. Petry S., Furlan S., Crepeau M.J., Cerning J., Desmazaud M.: Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3427–3431 (2000)
 70. Prasanna P.H.P., Grandison A.S., Charalampopoulos D.: Microbiological, chemical and rheological properties of low fat set yoghurt produced with exopolysaccharide (EPS) producing *Bifidobacterium* strains. *Food Res. Int.* **51**, 15–22 (2013)
 71. Purwandari U., Shah N.P., Vasiljevic T.: Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. *Int. Dairy J.* **17**, 1344–1352 (2007)
 72. Rabha B., Rechidi-Sidhoum N., Bensoltane A.: Effect of some fermentation substrates and growth temperature on exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* BN1. *Int. J. Biosci. Biochem. Bioinforma.* **2**, 44–47 (2012)
 73. Rodrigues K.L., Caputo L.R., Carvalho J.C., Evangelista J., Schneedorf J.M.: Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **25**, 404–408 (2005)
 74. Ruas-Madiedo P., Altung A.C., Zoon P.: Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains on the viscosity and structure of fermented milks. *Int. Dairy J.* **15**, 155–164 (2005)
 75. Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P.: An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **12**, 163–171 (2002)
 76. Ruas-Madiedo P., Tuinier R., Kanning M., Zoon P.: Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *Int. Dairy J.* **12**, 689–695 (2002)
 77. Ryan P.M., Guinane C.M., London L.E., Kelleher P.R., Fitzgerald G.F., Caplice N.M., Ross R.P., Stanton C.: Genome sequence of the heteropolysaccharide-producing strain *Lactobacillus mucosae* DPC 6426. *Genome Announc.* **3**, e01350-14. (2015)
 78. Salazar N., Gueimonde M., de Los Reyes-Gavilán C.G., Ruas-Madiedo P.: Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and bifidobacteria as fermentable substrates by the intestinal microbiota. *Crit. Rev. Food Sci.* **56**, 1440–1453 (2016)
 79. Sasikumar K., Vaikkath D.K., Devendra L., Nampoothiri K.M.: An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bio-resource Technol.* **241**, 1152–1156 (2017)
 80. Tamime A.Y., Robinson R.K.: *Yoghurt. Science and Technology.* Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2002
 81. Tsuda H., Miyamoto T.: Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Sci. Technol. Res.* **16**, 87–92 (2010)
 82. Vaningelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J., De Vuyst L.: Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 900–912 (2004)
 83. Velikova P., Petrov K., Lozanov V., Tsvetanova F., Stoyanov A., Wu Z., Liu Z., Petrova P.: Microbial diversity and health-promoting properties of the traditional Bulgarian yogurt. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* DOI: 10.1080/13102818.2018.1475255 (2018)
 84. Vinderola G., Perdígón G., Duarte J., Farnworth E., Matar C.: Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, **36**, 254–260 (2006)

85. Wang M., Bi J.: Modification of characteristics of kefiran by changing the carbon source of *Lactobacillus kefiranofaciens*. *J. Sci. Food Agr.* **88**, 763–769 (2008)
86. Wang Y., Ahmed Z., Feng W., Li C., Song S.: Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *Int. J. Biol. Macromol.* **43**, 283–288 (2008)
87. Wang Y., Li C., Liu P., Ahmed Z., Xiao P., Bai X.: Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr. Polym.* **82**, 895–903 (2010)
88. Welman A.D., Maddox I.S.: Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: prospective and challenges. *Trends Biotechnol.* **21**, 269–274 (2003)
89. Xu Z., Guo Q., Zhang H., Wu Y., Hang X., Ai L.: Exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S-3: Molecular, partial structural and rheological properties. *Carbohydr. Polym.* **194**, 132–138 (2018)
90. Yang T., Wu K., Wang F., Liang X., Liu Q., Li G., Li Q.: Effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria on the texture and microstructure of buffalo yoghurt. *Int. Dairy J.* **34**, 252–256 (2014)
91. Yang Z., Li S., Zhang X., Zeng X., Li D., Zhao Y., Zhang J.: Capsular and slime-polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* JAAS8 isolated from Chinese sauerkraut: Potential application in fermented milk products. *J. Biosci. Bioeng.* **10**, 53–57 (2010)
92. Zajšek K., Goršek A., Kolar M.: Cultivating conditions effects on kefiran production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food Chem.* **139**, 970–977 (2013)
93. Zhang J., Cao Y., Wang J., Guo X., Zheng Y., Zhao W., Mei X., Guo T., Yang Z.: Physicochemical characteristics and bioactivities of the exopolysaccharide and its sulphated polymer from *Streptococcus thermophilus* GST-6. *Carbohydr. Polym.* **146**, 368–375 (2016)
94. Zhang Y., Li S., Zhang C., Luo Y., Zhang H., Yang Z.: Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* F6 in skim milk. *Afr. J. Biotechnol.* **10**, 2080–2091 (2011)
95. Zhong L., Zhang X., Covasa M.: Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **20**, 7878–7886 (2014)

ZAPEWNIENIE JAKOŚCI W MEDYCZNYM LABORATORIUM MIKROBIOLOGICZNYM

Ewa Młodzińska^{1*}, Waleria Hryniewicz^{1,2}

¹Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej

²Narodowy Instytut Leków

Wpłynęło w marcu, zaakceptowano w maju 2019 r.

Streszczenie: W każdym laboratorium powinien być opracowany program zapewnienia jakości w celu uzyskiwania przez nie wiarygodnych wyników badań oraz spełnienia wymogów standardów jakości w zakresie mikrobiologicznych badań laboratoryjnych. Diagnostyka mikrobiologiczna umożliwia ustalenie czynnika etiologicznego zakażenia i pozwala na dobór odpowiedniej terapii. Na jakość wyników badań mają wpływ czynności przedlaboratoryjne, laboratoryjne i polaboratoryjne, które powinny być poddawane regularnej kontroli. Prowadzenie w laboratorium stałej wewnętrznej kontroli jakości badań i uczestnictwo w programach kontroli zewnątrzlaboratoryjnej umożliwia zapewnienie jakości wyników. Wewnętrzna kontrola jakości badań to kontrola wszystkich etapów rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej w laboratorium, która pozwala na stałe monitorowanie jakości oznaczeń. Udział w programach międzylaboratoryjnej kontroli zewnętrznej pozwala na ocenę jakości badań rutynowo wykonywanych w laboratorium.

1. Wprowadzenie. 2. Program zapewnienia jakości. 2.1. Czynniki wpływające na jakość. 3. Kontrola wewnątrzlaboratoryjna. 3.1. Kontrola testów identyfikacyjnych. 3.2. Wewnętrzna kontrola jakości oznaczania lekowrażliwości i wykrywania mechanizmów oporności. 3.3. Kontrola wewnętrzna systemów automatycznych do identyfikacji i oznaczania lekowrażliwości. 4. Kontrola zewnątrzlaboratoryjna. 4.1. Zasady uczestnictwa w programie kontroli zewnętrznej. 5. Podsumowanie

QUALITY ASSURANCE IN THE MEDICAL MICROBIOLOGY LABORATORY

Abstract: In each laboratory, a quality assurance programme should be developed in order to obtain reliable results and to fulfil the requirements of quality standards in the field of microbiological laboratory tests. Microbiological diagnostics makes it possible to determine the etiological agent of infection and allow the selection of appropriate therapy. The quality of test results are affected by pre-laboratory, laboratory and post-laboratory steps, which should be checked regularly. Permanent internal quality control of performance in the laboratory and participation in interlaboratory control programs allow ensuring the quality of results. Internal quality control of the tests at all stages of routine microbiological diagnostics in the laboratory which allows constant monitoring of the quality of results. Participation in inter-laboratory external quality control programs permits to assess the quality of performance of tests routinely used in a laboratory.

1. Introduction. 2. Quality assurance programme. 2.1. Factors affecting quality. 3. Internal quality control. 3.1. Quality control of identification tests. 3.2. Internal quality control of antimicrobial susceptibility testing and mechanism of resistance detecting. 3.3. Internal quality control of automated systems for identification and susceptibility testing. 4. External quality control. 4.1. External quality assurance programme participation rules. 5. Summary

Słowa kluczowe: akredytacja, lekowrażliwość, wewnętrzna kontrola jakości, kontrola zewnątrzlaboratoryjna, zapewnienie jakości

Key words: accreditation, antimicrobial susceptibility testing, external quality control, internal quality control, quality assurance

1. Wprowadzenie

Zapewnienie jakości w diagnostyce mikrobiologicznej jest sumą wszystkich działań w laboratorium w celu zapewnienia wiarygodności uzyskiwanych wyników. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO World Health Organization) określiła zapewnienie jakości jako „całkowity proces, dzięki któremu można zagwarantować

jakość wyników laboratoryjnych”. Oznacza to właściwy wynik, we właściwym czasie, na właściwym i odpowiednio pobranym materiale, od właściwego pacjenta, zinterpretowany zgodnie z aktualnymi zaleceniami i uzyskany za odpowiednią cenę [20].

Zgodnie z Dobrą Praktyką Laboratoryjną – GLP (Good Laboratory Practice) wszystkie czynności w laboratorium należy wykonywać w najlepszy możliwy

* Autor korespondencyjny: Mgr Ewa Młodzińska, Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa; tel. 22 841 58 34; e-mail: emlodzinska@polmicro.edu.pl

sposób, tak aby uzyskane wyniki były możliwie jak najbardziej dokładne. Prowadzenie badania mikrobiologicznego służy ustaleniu czynnika etiologicznego zakażenia i pozwala na wybór optymalnego leczenia. Umożliwia także gromadzenie, a następnie analizowanie danych dla celów epidemiologicznych. Uzyskiwanie wiarygodnych, powtarzalnych wyników badań diagnostycznych przeprowadzonych w możliwie najkrótszym czasie, pozwala również na podejmowanie odpowiednich decyzji w zakresie terapii celowanej i profilaktyki, służy także optymalizacji terapii empirycznej (mapa mikrobiologiczna). Zapewnienie wysokiej jakości usług laboratoryjnych gwarantuje dobrej jakości medycynę.

Wytyczne w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych zawarte w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r. (Dz. U. z 2016 r. poz. 1665 z późniejszymi zmianami) w załączniku numer 2 do rozporządzenia określają standardy jakości w zakresie mikrobiologicznych badań laboratoryjnych, oceny ich jakości i wartości diagnostycznej oraz laboratoryjnej interpretacji i autoryzacji wyników badań. Punkt 7 załącznika nr 2 zawiera wymagania odnośnie zapewnienia jakości badań laboratoryjnych [18, 19]. Laboratorium jest zobowiązane do prowadzenia stałej wewnętrznej kontroli jakości badań, zgodnie z opartą na dowodach naukowych wiedzą, z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi kontrolnych dla wszystkich rodzajów badań wykonywanych w laboratorium. W myśl zapisów obowiązkiem laboratorium jest także stały udział w programie zewnętrznej oceny w ramach międzylaboratoryjnej kontroli jakości badań.

Laboratoria wykonujące badania mikrobiologiczne mogą ubiegać się o akredytację. Zgodnie z normą PN-EN ISO 15189:2012 akredytacja to procedura, w wyniku której upoważniona jednostka formalnie potwierdza, że organizacja jest kompetentna do wykonywania określonych zadań [12]. Akredytacja służy budowaniu i umacnianiu zaufania do wyników wzorcowań, badań, certyfikowanych wyrobów i usług, kwalifikacji certyfikowanych osób oraz certyfikowanych systemów zarządzania. Polskie Centrum Akredytacji (PCA) jest krajową jednostką akredytującą. PCA prowadzi procesy akredytacji i sprawuje nadzór nad różnymi jednostkami, w tym laboratoriami badawczymi i wzorcującymi oraz laboratoriami medycznymi [9, 17].

Podstawą do akredytacji medycznych laboratoriów diagnostycznych są dwie główne normy: PN-EN ISO 17025:2018 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących” norma dla laboratoriów badawczych i wzorcujących (bez względu na profil) i PN-EN ISO 15189:2013 „Laboratoria medyczne – Wymagania dotyczące jakości i kompetencji” norma dla laboratoriów medycznych [11, 12]. Jednym z kluczowych wymagań norm jest zapewnienie

jakości wyników badań w laboratorium poprzez prowadzenie programów wewnętrznej kontroli jakości i udziału w programach oceny zewnętrznej laboratoryjnej. Laboratoria występujące o akredytację muszą spełnić wszystkie wymagania normy. Zgodnie z dokumentem PCA „Akredytacja Laboratoriów Medycznych” DAM-01 wyd. 3 z dnia 16.07.2015, ocena laboratorium w procesie akredytacji polega na przeglądzie dokumentacji oraz ocenie na miejscu kompetencji laboratorium do realizacji działalności zgłoszonej do akredytacji. Obserwacja działalności zgłoszonej do akredytacji dotyczy realizacji badań wykonywanych na rzeczywistych obiektach i w rzeczywistych warunkach oraz realizacji procesów przedanalizacyjnych. Kompetencje laboratorium w zakresie realizacji procesów poanalizacyjnych są również sprawdzane w trakcie oceny [9, 16].

2. Program zapewnienia jakości

Laboratorium powinno opracować odpowiedni program zapewnienia jakości w celu uzyskiwania dokładnych i rzetelnych wyników badań oraz spełnienia wymogów standardów jakości w zakresie mikrobiologicznych badań laboratoryjnych. Program zapewnienia jakości jest istotnym elementem systemu zarządzania laboratorium. Wg normy PN-EN ISO 9000 zarządzanie jakością to: „skoordynowane działania dotyczące kierowania organizacją i jej nadzorowania, które decydują o polityce jakości, celach i odpowiedzialności, a także o ich realizacji za pomocą takich środków jak: planowanie jakości, sterowanie jakością, zapewnienie jakości i doskonalenie jakości” [15]. System zarządzania jakością to indywidualne rozwiązanie dla danego laboratorium. Zawiera on wiele składowych, ale szczególnie ważne jest ustalenie odpowiedzialności personelu, opracowanie zasad postępowania oraz zwalidowanie procedur diagnostycznych i ich realizacja, a także przestrzeganie zasad bezpieczeństwa i higieny pracy. Laboratorium musi zastosować się do wymogów aktów normatywnych i prawnych, zaleceń i rekomendacji oraz wymagań i potrzeb klientów laboratorium. Zapewnienie jakości badań to również prowadzenie w laboratorium wewnętrznej kontroli jakości badań i udział w zewnętrznych programach kontroli jakości pozwalające na stałe monitorowanie pracy laboratorium i utrzymywanie wysokiej jakości rutynowej diagnostyki [1, 8].

2.1. Czynniki wpływające na jakość

Wiarygodna diagnostyka zakażeń umożliwia podejmowanie odpowiednich decyzji terapeutycznych i działań związanych z kontrolą zakażeń i stanowi

ważny element zapewnienia bezpieczeństwa pacjentów. Wszystkie badania wykonywane w laboratorium powinny podlegać stałej codziennej kontroli oceniającej ich jakość. Służy temu m.in. wdrożenie w laboratorium programu zapewnienia jakości badań. Ważnym elementem jest charakterystyka poszczególnych etapów badania: od pobrania próbki, przeprowadzenia badania, interpretacji wyniku i wydania sprawozdania z badania [7]. W rozporządzeniu dotyczącym standardów jakości w zakresie mikrobiologicznych badań laboratoryjnych zawarto szczegółowe wymagania dotyczące opracowania, wdrażania i stosowania procedur, które zebrano w Tabeli I [18].

Faza przedlaboratoryjna obejmuje odpowiedzialność laboratorium za przygotowanie odpowiednich procedur dotyczących metod pobrania, oznakowania i transportu próbek do laboratorium oraz przeprowadzenia szkoleń personelu pobierającego i transportującego materiał kliniczny, zgodnie z zasadami bezpieczeństwa postępowania z materiałem zakaźnym.

W fazie laboratoryjnej laboratorium sprawdza zgodność ze zleceniem badania tj. rodzaj próbki i jej oznakowanie, ocenia przydatność materiału do badania, dokonuje wyboru właściwej metody badania, opracowuje szczegółowe procedury badania różnych materiałów z uwzględnieniem materiałów zleczanych w trybie „CITO”, pozwalające na osiągnięcie wiarygodnego wyniku. Laboratorium przygotowuje również procedury wewnętrznej kontroli jakości oznaczeń z uwzględnieniem szkoleń personelu i najnowszych rekomendacji diagnostycznych.

Faza polaboratoryjna obejmuje interpretację wyników, sporządzenie sprawozdania z badania, właściwe sformułowanie sprawozdania z badania, które musi być zrozumiałe dla zleceniodawcy (lekarz, zespół zaka-

żeń szpitalnych itp.). Ważne jest także, aby wynik badania był wydany w czasie, który pozwala go optymalnie wykorzystać.

Czynności przedlaboratoryjne, laboratoryjne i polaboratoryjne wpływają na jakość wyników badań i powinny być poddawane regularnej kontroli zarówno wewnątrzlaboratoryjnej jak i zewnątrzlaboratoryjnej. Prowadzenie wewnętrznej kontroli jakości pozwala na stałe monitorowanie jakości oznaczeń a jej uzupełnieniem jest kontrola zewnętrzna, która pozwala na ocenę jakości badań rutynowo wykonywanych w laboratorium.

3. Kontrola wewnątrzlaboratoryjna

Podstawowym elementem programu zapewnienia jakości jest wewnątrzlaboratoryjna kontrola badań. Laboratorium tworząc program wewnętrznej kontroli jakości powinno uwzględnić wszystkie etapy badań składających się na diagnostykę mikrobiologiczną tj. izolację, identyfikację drobnoustrojów, oznaczanie lekowrażliwości drobnoustrojów oraz wykrywanie mechanizmów oporności i ich interpretację. Do tego celu należy stosować odpowiednie materiały kontrolne oraz szczepy kontrolne (szczepy referencyjne, odniesienia, wzorcowe) pochodzące z uznanych krajowych i międzynarodowych kolekcji kultur. W zaleceniach Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości – EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) oprócz szczepów kontrolnych pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych – ATCC wymienione są szczepy z innych kolekcji: – kolekcja ATCC (American Type Culture Collection) <http://www.atcc.org>

Tabela I

Wymagania dotyczące opracowania, wdrażania i stosowania procedur zawarte w rozporządzeniu dotyczącym standardów jakości

Procedura	Etap badania
1. Zlecenia badania laboratoryjnego 2. Pobieranie materiału do badań laboratoryjnych 3. Transport materiału do badań laboratoryjnych 4. Przyjmowanie materiału do badań laboratoryjnych 5. Przechowywanie materiału do badań laboratoryjnych	Faza przedlaboratoryjna
6. Metody badawcze 6.1. Laboratorium stosuje metody badawcze, które odpowiadają aktualnej wiedzy medycznej 6.2. Metody badawcze stosowane w laboratorium są zwalidowane 6.3. Laboratorium ustala listę wykonywanych badań i udostępnia ją zleceniodawcom 6.4. Laboratorium opracowuje, wdraża i stosuje procedury stosowanych metod badawczych 6.5. Przechowywanie szczepów drobnoustrojów po zakończeniu badania oraz szczepów wzorcowych i innych traktowanych jako szczepy odniesienia 7. Zapewnienie jakości badań laboratoryjnych 7.1. Laboratorium prowadzi stałą wewnętrzną kontrolę jakości badań 7.8. Laboratorium bierze stały udział w programach międzylaboratoryjnej kontroli jakości badań	Faza laboratoryjna
8. Przedstawianie i wydawanie sprawozdań z badań laboratoryjnych	Faza polaboratoryjna

- kolekcja angielska – NCTC (National Collection of Type Cultures) <http://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/nctc>
- kolekcja francuska – CIP (Collection de Institut Pasteur) <http://www.pasteur.fr/en/public-health/crbip/collections/collection-institut-pasteur-cip>
- kolekcja niemiecka – DSM (Bacterial cultures from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ) <https://www.dsmz.de>
- kolekcja szwedzka – CCUG (Culture Collection University of Gothenburg) <http://www.ccug.se>
- kolekcja hiszpańska – CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) <http://www.cect.org>. Szczepy kontrolne w poszczególnych kolekcjach mają nadawane numery, które mogą mieć odpowiedniki w innych kolekcjach. W zaleceniach EUCAST „Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion” (Wersja 9.0, 2019) do rutynowej i rozszerzonej wewnętrznej kontroli jakości lekowrażliwości zalecane szczepy kontrolne mają wymienione numery poszczególnych kolekcji np.: *Escherichia coli* ATCC 25922 (NCTC 12241, CIP 76.24, DSM 1103, CCUG 17620, CECT 434) [5].

Zestaw szczepów kontrolnych do kontroli wewnętrznej powinien być dopasowany do zakresu diagnostyki prowadzonej przez laboratorium, powinien umożliwiać przeprowadzenie kontroli jakości wszystkich etapów rutynowej pracy laboratorium. Laboratorium powinno posiadać szczepy referencyjne do kontroli jakości testów identyfikacyjnych, preparatów mikroskopowych, podłoży mikrobiologicznych, oznaczania lekowrażliwości, identyfikacji i wykrywania mechanizmów oporności, automatycznych systemów do identyfikacji i oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów. Bardzo ważne jest przygotowanie procedur określających zasady postępowania ze szczepami kontrolnymi, ustalenie osób odpowiedzialnych za przestrzeganie tych zasad i utrzymywanie zapisów potwierdzających ich nadzorowanie.

3.1. Kontrola testów identyfikacyjnych

Przygotowanie uniwersalnego programu kontroli wewnętrznej testów identyfikacyjnych nie jest proste. Procedury identyfikacyjne w laboratoriach mogą być bardzo różne, a ich zakres jest uzależniony od diagnostycznych potrzeb i możliwości oraz doświadczenia laboratorium. Schematy identyfikacji mogą wykorzystywać różne dostępne metody manualne (płytki izolacyjno-wybiórcze, podłoża chromogenne, szeregi biochemiczne), badania mikroskopowe, testy biochemiczne, testy serologiczne, standaryzowane zestawy komercyjne, automatyczne metody identyfikacyjne oraz nowoczesne technologie do identyfikacji (spektrometria mas) czy zaawansowane techniki z wykorzystaniem metod molekularnych.

W identyfikacji drobnoustrojów podstawowe testy dla pojedynczych cech mogą być stosowane jako badania przesiewowe (np. hydroliza mocznika, katalaza, indol, oksydaza) lub jako testy kluczowe (np. koagulaza). W celu potwierdzenia wiarygodności pojedynczego wyniku testu należy stosować kontrolę dodatnią i ujemną. Drobnoustroje zalecane do kontroli jakości poszczególnych testów powinny być wskazane przez ich producenta. Najtrudniejsze do spełnienia jest jednoczesne stosowanie odpowiednich organizmów do kontroli dodatniej i ujemnej wraz ze szczepami badanymi. Brak kontroli jakości wykonywanego oznaczenia jest zagrożeniem dla uzyskania prawidłowego wyniku identyfikacji.

3.2. Wewnętrzna kontrola jakości oznaczania lekowrażliwości i wykrywania mechanizmów oporności

Oznaczanie lekowrażliwości jest ważnym etapem rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej i zwykle przeprowadza się je dla zidentyfikowanych czynników etiologicznych zakażeń, wyjątek stanowi dopuszczona niedawno metoda bezpośredniego oznaczania wrażliwości na leki z dodatnich hodowli krwi [4]. Wynik jej musi być zawsze zweryfikowany nastawieniem badań dla wyizolowanego szczepu (patrz poniżej). Badanie wrażliwości na leki wymaga stosowania wystandaryzowanych procedur. Do oznaczania lekowrażliwości stosuje się różne metody: ilościowe i jakościowe. Podstawową i powszechnie stosowaną metodą jakościową jest metoda dyfuzji antybiotyku z krążka w żelu agarowym opracowana na początku lat 60-tych. W metodzie tej wykorzystuje się zjawisko powstawania gradientu stężeń w trakcie dyfuzji substancji w podłożu, a ostatecznie uzyskiwany wynik to określenie szczepu jako wrażliwy lub oporny na dany lek. Metoda dyfuzyjno-krążkowa wraz z wymaganiami kontroli jakości przedstawiona jest na stronie internetowej EUCAST w dokumencie „Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method” (Wersja 7.0, 2019) [2, 10].

Metody ilościowe pozwalają określić najmniejsze stężenie hamujące leku MIC (minimal inhibitory concentration) (mg/L). Są to metody rozcieńczeniowe w bulionie lub w agarze, gdzie na podłożu z antybiotykiem w malejących stężeniach posiewana jest zawiesina bakteryjna o określonej gęstości. Metoda mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym jest metodą referencyjną oznaczania *in vitro* aktywności leków przeciwbakteryjnych wobec szybko rosnących tlenowych bakterii wywołujących choroby zakaźne (PN-EN ISO 20776-1: 2007) [14]. Oznaczenie wartości MIC leków stosowanych w terapii, szczególnie w przypadku zakażeń inwazyjnych, umożliwia dobranie odpowiedniej dawki leku uwzględniającej parametry farmakokinetyki i farmakodynamiki. W przypadku niektórych

leków (np. wankomycyna) określenie wartości MIC jest jedyną wiarygodną metodą oznaczania lekowrażliwości. Na podstawie MIC leku można przydzielić szczep do odpowiedniej kategorii wrażliwości na dany lek. W 2019 roku w rekomendacjach EUCAST „The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>” definicje poszczególnych kategorii zostały zmodyfikowane i aktualnie obowiązują trzy kategorie wrażliwości:

S – wrażliwy. Drobnoustroj oznaczany jest jako wrażliwy, co oznacza wrażliwość szczepu na standardowe dawki leku i wysokie prawdopodobieństwo sukcesu terapeutycznego przy użyciu standardowego schematu dawkowania danego leku.

I – wrażliwy, zwiększona ekspozycja. Drobnoustroj oznaczany jest jako wrażliwy, zwiększona ekspozycja kiedy istnieje wysokie prawdopodobieństwo sukcesu terapeutycznego przy zwiększeniu ekspozycji na dany lek poprzez dostosowania schematu dawkowania lub zwiększenie jego stężenia w miejscu zakażenia.

R – oporny. Drobnoustroj oznaczany jest jako oporny kiedy istnieje wysokie prawdopodobieństwo niepowodzenia terapeutycznego, nawet przy zastosowaniu wysokich dawek leku [3].

Prawidłowa ocena lekowrażliwości drobnoustroju jest zatem bardzo istotna, a uzyskanie wiarygodnych wyników nie jest możliwe bez wewnętrznej kontroli jakości oznaczeń w laboratorium. Zgodnie z rekomendacjami EUCAST należy przeprowadzać kontrolę jakości każdego badania wrażliwości szczepu bakteryjnego na leki. Podstawą jej jest każdorazowe oznaczenie wrażliwości odpowiednich szczepów wzorcowych w dniu, w którym przeprowadzamy badanie.

Szczepy kontrolne zalecane do wewnętrznej kontroli jakości lekowrażliwości tj. rutynowej i rozszerzonej wraz z oczekiwanymi wynikami i zakresami (strefy zahamowania wzrostu i wartości MIC) zawarte są w zaleceniach EUCAST (Wersja 9.0, 2019). W rozszerzonej kontroli jakości rekomendowane są szczepy kontrolne do wykrywania obecności mechanizmów oporności (ESBL, MRSA, VRE czy HLGR): *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (NCTC 13368, CCUG 45421, CECT 7787), *Staphylococcus aureus* NCTC 12493 (CCUG 67181), *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (NCTC 13379, CIP 104676, CCUG 34289) [5]. Szczepy kontrolne ze znanymi mechanizmami oporności mogą również służyć do potwierdzania rutynowych testów oznaczania lekowrażliwości, co pozwala na uzyskiwanie prawidłowych wyników w kategorii innej niż wrażliwy. Szczepy przeznaczone do rutynowej kontroli jakości oznaczeń lekowrażliwości to w większości szczepy dzikie o fenotypie wrażliwości bez mechanizmów oporności.

Dostępna jest także powyżej wspomniana metoda szybkiego oznaczania lekowrażliwości bezpośrednio z dodatknych hodowli krwi – RAST (rapid antimicrobial susceptibility testing) EUCAST „Methodology – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles” [4]. Metoda ta jest oparta na metodzie dyfuzyjno-krajkowej i została zwalidowana dla butelek do hodowli krwi w systemach BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (bioMerieux) i VersaTREK (Thermo Fisher). W procedurze zmodyfikowano sposób przygotowywania zawiesiny (pobiera się 100–150 µl nierozcieńczonej krwi z dodatknej butelki i nanosi na podłoże antybiogramowe), skrócono czas inkubacji – odczytu można dokonać po 4, 6 lub po 8 godzinach maksymalnie, zmieniono zasady odczytywania wyników i przygotowano specyficzne punkty odcięcia wraz z kryteriami kontroli jakości dla metody RAST. „The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Zone diameter breakpoints for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from blood culture bottles” [6]. Do sprawdzenia procedury RAST w tabelach EUCAST przygotowano trzy szczepy do kontroli jakości: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213 i *S. pneumoniae* ATCC 49619 z zakresami stref zahamowania wzrostu i punktami odcięcia dla różnych antybiotyków po 4, 6 i 8 godzinnej inkubacji [4, 6]. Prowadzenie kontroli jakości jest istotne w momencie wprowadzania tej metody do rutynowego zastosowania w laboratorium do walidacji metody oraz do przeszkolenia personelu w tym zakresie, a także w momencie zmiany systemu do hodowli krwi.

3.3. Kontrola wewnętrzna systemów automatycznych do identyfikacji i oznaczania lekowrażliwości

Producenci systemów automatycznych są odpowiedzialni za stworzenie i prowadzenie odpowiedniej kontroli jakości, aby zapewnić bezpieczeństwo i skuteczność systemu do identyfikacji. Obejmuje to sprawdzenie pozytywnych i negatywnych wyników dla każdego odczynnika czy substratu w celu zapewnienia właściwej aktywności wszystkich komponentów danej karty czy panelu do identyfikacji drobnoustrojów. Nie zwalnia to jednak użytkownika systemu z przeprowadzania wewnętrznej kontroli jakości. W instrukcji użytkownika systemu, paneli czy kart powinna znaleźć się informacja o kontroli jakości, wraz ze wskazaniem szczepów kontrolnych i oczekiwanych wyników kontroli jakości oraz zalecenia dotyczące częstości prowadzenia kontroli.

Szczepy referencyjne do kontroli jakości oznaczania lekowrażliwości metodami automatycznymi powinny

być stosowane zgodnie z zaleceniami producenta, który jest odpowiedzialny za opracowanie i przeprowadzenie odpowiedniej kontroli jakości – poprzez sprawdzenie wyników dla każdego antybiotyku/chemioterapeutyku w celu zapewnienia właściwej aktywności wszystkich składników danego panelu czy karty antybiogramowej. Szczepy zalecane do kontroli jakości w większości są wspólne dla wszystkich metod oznaczania wrażliwości na leki. Dodatkowo w zestawach do kontroli paneli/kart antybiogramowych mogą znajdować się inne drobnoustroje kontrolne, których cechy pozwolą na pełną kontrolę antybiogramu. Laboratorium samo decyduje o częstotliwości kontroli wewnętrznej, najczęściej zalecana jest kontrola jakości nowej serii bądź testów z nowej dostawy do laboratorium.

Zagadnienia wewnętrznej kontroli jakości badań w laboratorium mikrobiologicznym nie są ograniczone wyłącznie do stosowania szczepów kontrolnych i sposobu postępowania z nimi w celu utrzymania i potwierdzania ich cech charakterystycznych. Kontrola wewnętrzna to także ocena skuteczności procedur laboratoryjnych, nadzór nad metodami, wyposażeniem, testami i odczynnikami stosowanymi w laboratorium, zapewnienie warunków przechowywania odczynników i testów, stosowanie ich zgodnie z przeznaczeniem w sposób zalecany przez producenta. Nadzorowanie wszelkich zapisów prowadzonych w laboratorium dotyczących przeprowadzanych badań, stosowane podłoża, gęstość zawiesiny, czas i warunki inkubacji i sprawdzanie zgodności z aktualnymi zaleceniami to również część kontroli wewnątrzlaboratoryjnej.

4. Kontrola zewnątrzlaboratoryjna

Zewnętrzne programy kontroli jakości pozwalają na sprawdzenie skuteczności procedur kontroli wewnętrznej i utrzymanie odpowiedniej jakości pracy laboratorium. Wszystkie badania wykonywane w laboratorium powinny być podane ocenie w programie kontroli zewnętrznej (ocena każdego etapu badania). Udział w kontroli zewnętrznej umożliwia porównanie poziomu diagnostyki uczestnika względem innych laboratoriów uczestniczących w danym programie. Celem zewnętrznej oceny jakości jest także promowanie wysokich standardów dobrych praktyk laboratoryjnych, zachęcanie do korzystania z wystandaryzowanych metod, szkoleń personelu, zapewnienia mechanizmów naprawczych stwierdzonych błędów i ich zapobieganiu.

W standardach jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych określono, że obowiązkiem laboratorium jest stały udział w programach międzylaboratoryjnej kontroli jakości badań organizowanych przez m.in. Centralny Ośrodek Badań

Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej – COBJwDM (www.polmicro.edu.pl). Dla badań nieobjętych programami Centralnego Ośrodka laboratorium powinno brać udział w programach międzylaboratoryjnej oceny jakości badań organizowanych przez inne krajowe lub renomowane instytucje na całym świecie np. programy UK NEQAS, INSTAND czy Labquality. COBJwDM jest organizatorem Ogólnopolskiego Sprawdzianu Wiarygodności Badań w Diagnostyce Mikrobiologicznej – POLMICRO, którego zaletą jest dostosowanie doboru materiałów kontrolnych do bieżącej sytuacji epidemiologicznej. Program POLMICRO umożliwia laboratorium poddawać kontroli zewnętrznej różne etapy diagnostyki mikrobiologicznej. Coroczne edycje programu poświęcane są wstępnemu etapowi diagnostyki jakim jest ocena preparatów mikroskopowych, identyfikacji do poziomu gatunku różnych izolatów i oznaczaniu fenotypów wrażliwości na leki, jak i wykrywaniu mechanizmów oporności na antybiotyki. Celem programu jest edukacja i ocena kompetencji laboratoriów mikrobiologicznych w zakresie identyfikacji, oznaczania lekowrażliwości i wykrywania mechanizmów oporności. Ocena poszczególnych edycji Programu POLMICRO przeprowadzana jest zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17043:2011 „Ocena zgodności. Ogólne wymagania dotyczące badań biegłości” [13]. Na podstawie wyników uzyskanych we wszystkich rundach programu POLMICRO laboratorium przyznawane są Świadectwa uzyskania pozytywnych wyników w Ogólnopolskim Sprawdzianie Wiarygodności Badań Mikrobiologicznych POLMICRO. Laboratoria które nie przystąpiły do wszystkich rund programu POLMICRO w cyklu rocznym lub uzyskały co najmniej jedną ocenę negatywną otrzymują zaświadczenia o uczestnictwie i uzyskanych wynikach [19, 21].

4.1. Zasady uczestnictwa w programie kontroli zewnętrznej

Laboratorium powinno postępować z otrzymaną próbką tak jak z materiałem diagnostycznym badanym rutynowo, otrzymywanym od pacjentów, bez stosowania szczególnych metod, odczynników, badań dodatkowych lub zaangażowania bardziej wykwalifikowanego personelu. W postępowaniu z próbką laboratorium powinno uwzględnić instrukcję otrzymaną z ośrodka organizującego program.

Wyniki kontroli zewnątrzlaboratoryjnej powinny być zawsze przeanalizowane przez laboratorium i omówione z personelem, a każdy nieprawidłowy wynik powinien być rozpatrzony w celu weryfikacji działań zapobiegających powstawaniu niezgodności. W celu wyeliminowania powstałych niezgodności laboratorium powinno wprowadzić działania korygujące.

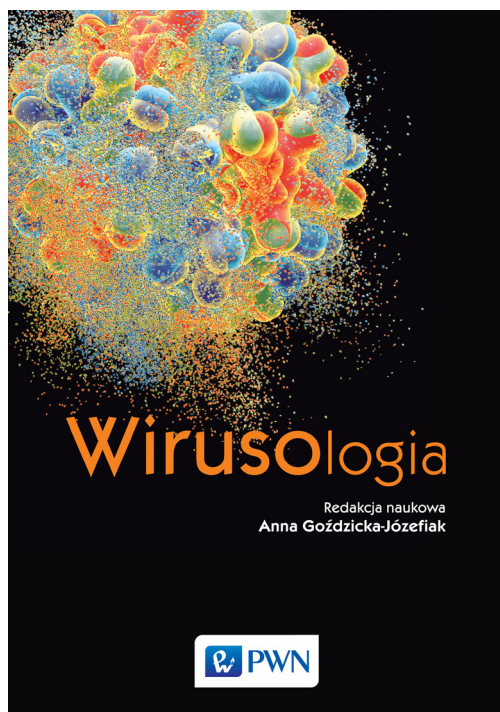
5. Podsumowanie

Informacje przedstawione w niniejszym opracowaniu wskazują, że laboratoria mikrobiologiczne są zobowiązane do przygotowania i realizowania programu zapewnienia jakości. Obowiązujące akty prawne, aktualne rekomendacje i zalecenia jasno precyzują obowiązki medycznych laboratoriów w zakresie zapewnienia jakości badań mikrobiologicznych z uwzględnieniem wszystkich etapów diagnostyki tj. fazy przedlaboratoryjnej, laboratoryjnej i polaboratoryjnej. Wymagania dotyczą wszystkich laboratoriów, nie tylko tych starających się o akredytację.

Systematyczna kontrola jakości poprzez realizowanie procedur wewnętrznej kontroli jakości badań rutynowo przeprowadzanych w laboratorium i ocena jakości badań poprzez uczestnictwo w programach kontroli zewnętrznej jest podstawą do uzyskiwania wiarygodnych wyników badań mikrobiologicznych.

Piśmiennictwo

- Carey R.B., Bhattacharyya S., Kehl S.C., Matukas L.M., Penttella M.A., Salfinger M., Schuetz A.N.: Implementing a quality management system in the medical microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, e00062-17. (2018)
- Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method, http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Manual_v_7.0_EUCAST_Disk_Test_2019.pdf (25.03.2019)
- Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf (25.03.2019)
- Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Methodology – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles, http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/Methodology_EUCAST_RAST_v1_20181126.pdf (25.03.2019)
- Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion EUCAST, http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_9.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf (25.03.2019)
- Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Zone diameter breakpoints for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from blood culture bottles. Version 1.0, 2018. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/EUCAST_RAST_Breakpoint_Table_v_1.0_final_PDF.pdf (25.03.2019)
- Heczko P., Wróblewska M., Pietrzyk A.: Diagnostyka zakażeń bakteryjnych (w) Mikrobiologia Lekarska, PZWL, Warszawa, 2014, s. 657–666
- Leber Amy L., editor, Quality Assessment and Improvement (Quality Assurance) (w) Clinical microbiology procedures handbook, ASM Press, 2016, DOI: 10.1128/9781555818814.ch14.1
- Eleftheriadou M. Tsimillis K.C.: Eurachem guide: Accreditation for Microbiological Laboratories, wyd. 2, ISBN: 978-91-87017-92-6 (2013)
- Matuschek E., Brown D.E., Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, O255–O256 (2014)
- PN-EN ISO 17025:2018-02, Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących, Polski Komitet Normalizacyjny
- PN-EN ISO 15189:2013-05, Laboratoria medyczne – Wymagania dotyczące jakości i kompetencji, Polski Komitet Normalizacyjny
- PN-EN ISO/IEC 17043:2011, Ocena zgodności. Ogólne wymagania dotyczące badań biegłości, Polski Komitet Normalizacyjny
- PN-EN ISO 20776-1:2007, Kliniczne badania laboratoryjne i metody badań diagnostycznych *in vitro*. Oznaczanie wrażliwości drobnoustrojów i ocena przydatności gotowych testów do oznaczania wrażliwości na leki przeciwbakteryjne. Część 1: Referencyjna metoda oznaczania *in vitro* aktywności leków przeciwbakteryjnych wobec szybko rosnących tlenowych bakterii wywołujących choroby zakaźne, Polski Komitet Normalizacyjny
- PN-EN ISO 9000:2015-10, Systemy zarządzania jakością – Podstawy i terminologia, Polski Komitet Normalizacyjny
- Polskie Centrum Akredytacji: Akredytacja Laboratoriów Medycznych, dokument PCA DAM-01 wyd. 3 z dnia 16.07.2015
- Polskie Centrum Akredytacji: Rola akredytacji, <https://www.pca.gov.pl/akredytacja/akredytacja/rola-akredytacji/> (25.03.2019)
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 r., Standardy jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych Załącznik 2: Standardy jakości w zakresie mikrobiologicznych badań laboratoryjnych, w tym badań technikami biologii molekularnej, oceny ich jakości i wartości diagnostycznej oraz laboratoryjnej interpretacji i autoryzacji wyniku badań, (Dz. U. z 2016 r. poz. 1665),
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 grudnia 2017 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych, (Dz. U. z 2017 r. poz. 2394)
- World Health Organization Handbook: good laboratory practice (GLP): quality practices for regulated non-clinical research and development. Good Laboratory Practice Training wyd. 2., 2009, s. 9–56
- Zarządzenie Ministra Zdrowia z dnia 31 sierpnia 2017 r. zmieniające zarządzenie w sprawie Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej (Dz. Urz. Min. Zdr. z dnia 31 sierpnia 2017 r. Poz. 89)



Autor: praca zbiorowa pod redakcją naukową
Redakcja naukowa: **Anna Goździcka-Józefiak**
Tytuł: **Wirusologia**
Redaktor PWN: **Małgorzata Nawrot**
Projektant okładki: **Lidia Michalak**
Wydawnictwo Naukowe PWN S.A.
Warszawa, 2019
ISBN 978-83-01-20471-6

Niniejszy podręcznik, dotyczący Wirusologii, dedykowany jest przede wszystkim studentom kierunków Biologia, Medycyna, a także Biotechnologia. Polecam go jednak także wszystkim tym, którzy pragną, nawet ze względów hobbystycznych, poznać biologię wirusów. Podręcznik zapełnia pewną lukę na rynku wydawniczym, plasując się pomiędzy ogólnymi opracowaniami dotyczącymi mikrobiologii, w których zazwyczaj wspomniane są wirusy, a bardzo szczegółowymi podręcznikami dotyczącymi biologii

molekularnej i skomplikowanych procesów dotyczących wirusów. W tym aspekcie, podręcznik jest uzupełnieniem wcześniejszych pozycji PWN o tematyce Wirusologii. Najnowszy podręcznik PWN stanowi kompendium aktualnej wiedzy na temat wirusów, pozwalając na szybkie uzupełnienie informacji o zróżnicowanych rodzinach wirusów, atakujących różnych gospodarzy: ssaki (w tym człowieka), rośliny, owady, grzyby, bakterie itp. Omówione zostały ogólne aspekty wirusów: ich budowa, strategie kodowania i ekspresji wirusowych genów oraz replikacji materiału genetycznego. Ponadto przedstawiono aktualną klasyfikację wirusów, tzw. klasyfikację Baltimore'a, zaakceptowaną przez Międzynarodowy Komitet Taksonomii wirusów (ICTV). Opisano także ogólny przebieg cyklu namnażania wirusów od absorpcji do opuszczenia komórki gospodarza. Jednakże większą część podręcznika poświęcono bardziej szczegółowemu omówieniu poszczególnych grup wirusowych: najważniejszych wirusów zwierzęcych, wybranych grup wirusów o znaczeniu klinicznym (wirusy wątroby, wirusy wywołujące gorączki krwotoczne, wirusy atakujące centralny układ nerwowy, wirusy indukujące kancerogenezę), wirusów roślinnych, wirusy grzybów i glonów oraz bakteriofagów. Każdy rozdział opisujący poszczególne grupy, poprzedzony jest ryciną zawierającą podstawowe informacje dotyczące danej grupy wirusów, co jest bardzo pomocne w zrozumieniu dalszych informacji. Duża część opracowania omawia aspekty interakcji wirus-gospodarz: przede wszystkim obrony komórek i organizmów zwierzęcych, ale także organizmów prokariotycznych przed infekcją wirusową. Poruszony jest także aspekt zwalczania zagrożenia wirusowego w XXI wieku: przedstawiono strategie profilaktyki antywirusowej (szczepionki) jak i aktualnych możliwości leczenia nielicznymi, celowanymi lekami o aktywności przeciwwirusowej. Ostatnia część podręcznika porusza różnorodne ciekawe tematy, które stanowią aktualnie główne trendy badań naukowych: wykorzystanie wirusów w biotechnologii i zastosowanie wirusów w bakteriofagoterapii jako alternatywy dla antybiotykoterapii w zwalczaniu patogennych antybiotykoopornych bakterii.

W podręczniku nie zabrakło także słowniczka, co stanowi dużą pomoc dla czytelnika. Staranna szata graficzna: liczne ryciny, proste i zrozumiałe, oraz starannie dobierane polskie nazewnictwo ułatwiają przyswojenie trudnych czasami mechanizmów związanych z replikacją, infekcją i patogenezą wirusów.

Jestem przekonana, że niniejszy podręcznik zostanie bardzo entuzjastycznie przyjęty na rynku czytelniczym, jako wyjściowe źródło informacji o jednej z najciekawszych tematów biologicznych: Wirusologii.

Monika Adamczyk-Popławska

ERRATA

W opublikowanym w Tomie 58, rok 2019, Zeszycie 1 *Postępów Mikrobiologii*,
znalazł się błąd w afiliacji pracy autorstwa:
Wiesław Kurzątkowski, Paulina Górską, Małgorzata Główska,
Katarzyna Woźnica, Aleksandra Zasada,
zatytułowanej:

NEW DATA ON ISOPENICILLIN N SYNTHASE AND PEROXISOME CO-LOCATION
IN THE HYPHAL CELLS OF *PENICILLIUM CHRYSOGENUM* PQ-96
– PEXOPHAGY AND EXOCYTOSIS

omyłkowo podano

Zakład Epidemiologii (Department of Epidemiology),

zamiast

Zakład Badania Surowic i Szczepionek (Department of Sera and Vaccines Evaluation).



INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

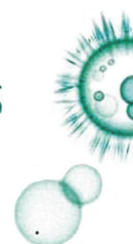
KONFERENCJA POD PATRONATEM PTM



**Konferencja międzynarodowa:
8 Międzynarodowa Konferencja Weiglowska
Łódź, 26–28.06.2019**



**8th International Weigl Conference:
HUMAN WELFARE, CANCERS, SYSTEMIC AND INFECTIOUS DISEASES**
Microorganisms in industrial and medical biotechnology
26-28.06.2019 Venue: Faculty of Management, University of Lodz



**Konferencja organizowana jest przez Instytut Biologii Medycznej PAN,
Uniwersytet Łódzki oraz Uniwersytet Medyczny w Łodzi**

The planned Conference is the eighth conference to commemorate the outstanding Polish microbiologist Prof. Rudolf Weigl, the creator of the first effective vaccine against typhus. The conference is devoted to selected medical, microbiological and biotechnology issues. As part of the conference, thematic sessions will be devoted to (i) Reinvention of bacteriophage therapy. Bacteriophages in control of infectious diseases (ii) From single cell to microbial communities studies, molecular basis of virulence in the complexity of microbiome, (iii) Medical and industrial biotechnology – research and development. Novel therapeutic strategies and practical applications. The conference will be a unique platform for meetings and discussions for researchers dealing with the molecular basis of selected diseases, for microbiologists investigating these processes at the level of virulence factor, but also for clinicians involved in everyday diagnostics and treatment of diseases. The conference will also create a unique opportunity to familiarize participants of the session, including students and doctoral students, with different perspectives of research on the same processes, from the human body to pathogenic or saprophytic microorganisms and their mutual interactions.

<http://grupamedica.pl/8th-international-weigl-conference-26-28-06-2019/>
www.twitter/grupamedica ; <https://web.facebook.com/8thweiglconferene/>

**W dniu 25.03.2019 r. odbyło się trzecie zebranie
Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów kadencji 2016–2020**

Poniżej w punktach, w formie skrótowej przedstawiono omawiane sprawy

1. Prezes PTM – prof. Stefan Tyski powitał zebranych – przybyli wszyscy członkowie ZG PTM (z wyjątkiem przedstawiciela Oddziału Puławy), a także 9 zaproszonych gości (dr Kamila Korzekwa, wiceprzewodnicząca Oddziału Wrocław, dr Elżbieta Stefaniuk – przewodnicząca Głównej Komisji Rewizyjnej, prof. dr hab. Jacek Bielecki – redaktor naczelny Postępów Mikrobiologii, dr Radosław Stachowiak – z-ca redaktora naczelnego PM, Pani Mariola Machowska-Kacprzak – księgowa PTM, dr Tomasz Zaręba, przewodniczący Sekcji Mikrobiologia Farmaceutyczna, dr Szymon Walter de Welthoffen, diagnosta laboratoryjny, Pan Zbigniew Kowal, Prezes firmy Global Congress oraz Panie Barbara Tutak i Joanna Stasiszyn również z firmy Global Congress. Firma ta będzie pomagać w organizacji XXIX Zjazdu PTM w 2020 r. w Warszawie.

Po przyjęciu programu zebrania nastąpiła prezentacja wszystkich uczestników spotkania.

2. Wybrano 2 osobową Komisję Skrutacyjną.
3. Minutą ciszy uczczono zmarłych zasłużonych członków PTM: prof. Marię Koziół-Montewkę, prof. Józefa F. Kubicę, dr Wandę Michalską i dr Andrzeja Kasprowicza.
4. Prezes PTM przedstawił informację o działalności Prezydium PTM od poprzedniego zebrania ZG PTM w dniu 19.03.2018 r.:
 - omówiono Uchwały nr 26–45 z 2018 r., które poddano głosowaniu drogą elektroniczną na kilku wirtualnych zebraniach Prezydium ZG PTM w 2018 r. i **Uchwałą nr 1-2019** zaakceptowano działalność Prezydium ZG PTM w okresie 19.03.2018 r. – 25.03.2019 r.
 - przypomniano, że informacje o bieżącej działalności PTM zamieszczano we wszystkich kolejnych numerach czasopism Postępy Mikrobiologii (PM) i Polish Journal of Microbiology (PJM), a także na facebooku PTM,
 - podano informację o złożeniu wniosku do MNiSW na działalność upowszechniającą naukę (DUN), dotyczącym organizacji konferencji 70 lat Oddziału PTM w Warszawie, jednakże wniosek ten nie uzyskał finansowania,
 - przedstawiono informację o dofinansowaniu z DUN czasopism PM i PJM w latach 2018–2019. Redakcje obu czasopism dokładają starań, aby podnieść ich poziom. Maszynopisy prac przesyłane do PM są tłumaczone za język angielski z dofinansowania MNiSW w 2019 r. Od przyszłego roku autorzy będą zobowiązani do przysyłania wersji angielskojęzycznych manuskryptów, ponieważ takie będą zamieszczane on-line na stronie wydawnictwa Exeley Inc.
5. Omówiono sprawę powołanych sekcji PTM, które w zasadzie nie działają. Pan dr Tomasz Zaręba przedstawił Sekcję Mikrobiologii Farmaceutycznej i konferencję, która miała się odbyć w maju, natomiast Pan dr Szymon Walter de Walthoffen przedstawił swoją wizję działalności Sekcji Diagnostów Laboratoryjnych.
6. Księgowa PTM Pani Mariola Machowska-Kasprzak przedstawiła informację o stanie finansowym PTM oraz bilans finansowy PTM za 2018 r.
7. Pani dr Elżbieta Stefaniuk Przewodnicząca Głównej Komisji Rewizyjnej PTM przedstawiła pozytywną opinię Komisji Rewizyjnej na temat bilansu finansowego PTM za 2018 r.
8. Omawiano sprawę możliwości przekazania pewnych środków finansowych do wydatkowania przez Oddziały PTM.
 - Prezes PTM poddał pod głosowanie **Uchwałę nr 2-2019** zmieniająca Uchwałę nr 33-2017 z dnia 30.08.2017 r. ZG PTM w sprawie udostępnienia Oddziałom Terenowym PTM od stycznia 2019 r., 50% kwoty uzyskanej z tytułu pozyskania sponsora, Członka Wspierającego PTM, darowizny, lub innej dodatkowej kwoty, na rzecz PTM, przez dany Oddział, na pokrycie kosztów prowadzenia działalności statutowej przez ten Oddział. Obecnie przyjęto **Uchwałę 2-2019** w brzmieniu: „Kwota środków przekazana na konto PTM z tytułu sponsorowania konkretnego wydarzenia w całości jest do dyspozycji Oddziału, który pozyskał takiego sponsora. W pozostałych przypadkach 50% kwoty uzyskanej z tytułu pozyskania; sponsora przekazującego środki na ogólne cele statutowe Towarzystwa, Członka Wspierającego PTM, darowizny na ogólne cele statutowe Towarzystwa, innej dodatkowej kwoty, pozyskanej na rzecz Towarzystwa, przez dany Oddział, udostępniane jest temu Oddziałowi. Zasady wydatkowania i rozliczania wszystkich pozyskanych funduszy przez Oddział Terenowy PTM muszą być zgodne z Regulaminem wydatkowania i rozliczania środków pieniężnych przez Oddziały PTM”.
 - Sekretarz ZG PTM mówiła opracowany „Regulamin wydatkowania i rozliczania środków pieniężnych przez Oddziały Terenowe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów”.
 - **Uchwałą nr 3-2019** zatwierdzono w/w Regulamin do stosowania począwszy od początku 2019 r. Tym samym Oddziały uzyskają możliwość wydatkowania środków finansowych, których wysokość uzależniona jest od liczby członków w Oddziale, na prowadzona przez siebie działalność statutową.
9. Przyjęto **Uchwałę nr 4-2019** w sprawie przyjęcia 35 nowych członków zwyczajnych.
10. Przyjęto **Uchwałę nr 5-2019** w sprawie usunięcia z grona członków PTM 78 osób oraz firmę Aesculap Chifa Sp. z o.o. – członka grupy B. Brown, z powodu nieopłacenia składki członkowskiej za 2018 r.

Podsumowując, składkę członkowską w PTM w 2018 r. opłaciło 856 osób, a przynależność do PTM w oddziałach kształtowała się następująco:

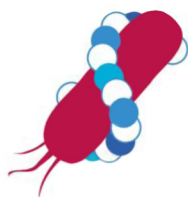
Oddział Terenowy PTM	Liczba			
	Członek Zwyczajny	Członek Zwyczajny, emeryt	Członek Honorowy	SUMA
Białystok	33	0	1	34
Bydgoszcz	70	1	0	71
Gdańska	47	2	2	51
Katowice	89	3	0	92
Kielce	23	0	0	23
Kraków	117	7	0	124
Lublin	55	0	1	56
Łódź	40	1	0	41
Olsztyn	28	2	1	31
Poznań	64	4	0	68
Puławy	15	1	2	18
Szczecin	56	1	2	59
Warszawa	157	8	7	172
Wrocław	31	1	1	33
Ogółem	825	31	17	873

11. Przewodniczący Zarządów Oddziałów Terenowych PTM przedstawili informacje z działalności swoich Oddziałów w okresie od 19.03.2018 r. do 25.03.2019 r. w tym o odbytych konferencjach pod patronatem PTM. Przedstawili również plany działalności Oddziałów w najbliższych latach.
12. Prezes PTM poinformował o planowanych konferencjach pod patronatem PTM:
 - VII Konferencji Naukowo-Szkoleniowej „Mikrobiologia Farmaceutyczna 2019”, Gdańsk, 22–24 maj 2019 r.,
 - VIII Międzynarodowej Konferencji Weigłowskiej, Łódź, 26–28 czerwiec 2019 r.,
 - **Uchwałą nr 6-2019** udzielono poparcia IV Ogólnopolskiemu Sympozjum Mikrobiologicznemu „Metagenomy Różnych Środowisk”, Lublin, 27–28 czerwiec 2019 r.
13. Przedstawiono wstępne informacje o XXIX Zjeździe PTM, planowanym na wrzesień 2020 r. w Warszawie. **Uchwałą nr 7-2019** na przewodniczącego Komitetu Organizacyjnego Zjazdu powołano Prezesa PTM – prof. S. Tyskiego, a na zastępcę Wiceprezesa PTM – prof. E. Augustynowicz-Kopec. Na przewodniczącą Komitetu Naukowego Zjazdu powołano prof. E. Augustynowicz-Kopec, a na wiceprzewodniczącą – prof. S. Tyskiego. W skład Komitetu Naukowego Zjazdu wchodzi wszyscy członkowie ZG PTM. Logistycznie zjazd będzie wspierać firma Global Congress.
14. Prezes PTM, a jednocześnie delegat PTM do FEMS oraz IUMS – prof. S. Tyski podsumował 45 spotkanie „FEMS Council” organizowane po raz pierwszy w naszym kraju przez PTM, w dniach 7–8 września 2018 r. w Warszawie. Na nasze zaproszenie przyjechali przedstawiciele 35 europejskich towarzystw mikrobiologicznych przyjechał również cały zarząd FEMS – Prezydent FEMS prof. Bauke Oudega z Holandii oraz 7 dyrektorów FEMS wraz z 12 pracownikami FEMS. Wysokość składek do FEMS – 1,4 Euro i IUMS – 1,4 USD od członka PTM nie ulegają zmianie. Dużą stratą jest brak zgłoszeń osób na FEMS Research Grant na wyjazdy do naukowych ośrodków zagranicznych. Poinformowano o kongresie „8th Congress of European Microbiologists – FEMS2019”, który odbędzie się w Glasgow, Szkocja 7–11 lipca 2019 r. Międzynarodowa konferencja „4th Congress of Baltic Microbiologists”, organizowana 10–12.09.2018 r. w Gdańsku otrzymała dofinansowanie FEMS w wysokości 7.000 Euro. W **Uchwale nr 8-2019** wyrażono zgodę na pokrycie kosztów uczestnictwa prof. S. Tyskiego w FEMS Council 2019 w Mediolanie.
15. W tym roku kończy się kadencja Sekretarza Generalnego FEMS, jest to jedno z głównych stanowisk w Zarządzie Głównym FEMS. Pan prof. dr hab. Grzegorz Węgrzyn z Uniwersytetu Gdańskiego wyraził zgodę na kandydowanie na stanowisko Sekretarza Generalnego FEMS. W głosowaniu tajnym przyjęto **Uchwałę nr 9-2019** popierającą kandydaturę Pana profesora na stanowisko Sekretarza Generalnego FEMS.
16. W związku z różnym podejściem stosowanym w Oddziałach do przyznawania punktów edukacyjnych, powołano Komisję w składzie prof. dr hab. Ewa Augustynowicz-Kopec, dr hab. Edyta Podsiadły i dr Elżbieta Stefaniuk, do określania zasad przyznawania punktów edukacyjnych za uczestnictwo w zebraniach i seminariach organizowanych przez Oddziały PTM – **Uchwałą nr 10-2019**.
17. Prezes PTM przedstawił informację o Konferencji Prezesów Towarzystw Lekarskich (nie należy mylić z Federacją Polskich Towarzystw Medycznych). Podjęto **Uchwałę nr 11-2019** o podpisaniu deklaracji o przystąpieniu PTM do KPTEL.

18. W związku z pojawieniem się zachowań „nieliczących z dobrym imieniem członka PTM”, przy braku statutowej komisji dyscyplinarnej, postanowiono powołać „Komisję do spraw etyki członków PTM” o składzie osobowym podobnym do Komisji konkursowej oceniającej materiały do nagrody naukowej PTM im. prof. Edmunda Mikulaszka, pod przewodnictwem Pani prof. dr hab. Stefanii Giedrys-Kalemby – **Uchwała nr 12-2019**.
19. W **Uchwale nr 13-2019** podjęto decyzje w sprawie przedłużenia zatrudnienia Pana mgr Adama Guśpiela jako Sekretarza Redakcji PJM do 30.09.2020 r.
20. Informacje o wydawanych czasopismach PTM i sytuacji w redakcjach przedstawili redaktorzy naczelni: PJM – Pani prof. dr hab. Elżbieta Anna Trafny i PM – Pan prof. dr hab. Jacek Bielecki. Omawiano problemy i plany związane z wydawaniem czasopism przez wydawnictwo amerykańskie Exeley Inc.
21. W związku z dużymi kosztami wydawania czasopism, podjęto **Uchwałę nr 14-2019** w sprawie zwiększenia opłat redakcyjnych za publikacje w PJM z 250 USD do 350 USD dla autorów korespondencyjnych – członków PTM i z 500 USD do 700 USD dla autorów korespondencyjnych nie będących członkami PTM. Zwiększona opłata dotyczyć będzie manuskryptów przysłanych do Redakcji PJM po 30.06.2019 r.
22. Dyskutowano nad informacją o stanowisku Konsultanta Krajowego w dziedzinie Diagnostyki Laboratoryjnej Pana prof. dr hab. Macieja Szmikowskiego w sprawie absolwentów studiów na kierunku mikrobiologia. Stanowisko to jest sprzeczne ze stanowiskiem PTM opracowanym w ubiegłym roku i zamieszczonym na stronie PTM. Pani dr hab. Beata Anna Sadowska zobowiązała się do przygotowania odpowiedzi dla Pana prof. dr hab. M. Szmikowskiego.

Po zebraniu Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, w kolejnych miesiącach Prezydium ZG PTM zajmowało się następującymi sprawami:

1. Podjęto **Uchwałę nr 15-2019** w sprawie objęcia honorowym patronatem seminarium naukowego pt. „III Sesja Młodych Mikrobiologów Środowiska Łódzkiego”, które odbędzie się w dniu 7 czerwca 2019 r. na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.
2. Podjęto **Uchwałę nr 16-2019** w sprawie przyjęcia firmy BART Sp. z o.o. Sp. K. do grona członków wspierających PTM, jako Członka Zwyczajnego.
3. Podjęto **Uchwałę nr 17-2019** w sprawie przyjęcia 6 nowych członków zwyczajnych PTM.
4. Informujemy, że PTM podpisało umowę z firmą EBSCO Publishing Inc. ze Stanów Zjednoczonych dotyczącą współpracy i umieszczenia czasopisma Polish Journal of Microbiology w międzynarodowych bazach naukowych EBSCO. Współpraca z firmą EBSCO powinna zapewnić wzrost popularności czasopisma (IF, punktacja) i jego umiędzynarodowienia, a także rozpoznawalności PJM i PTM. Bazy EBSCO są używane przez ponad 130 000 bibliotek akademickich, instytutów i szpitali na całym świecie (w tym Harvard Medical College, UCLA itp.).
5. Informujemy również, że Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego Pan dr Jarosław Gowin powołał Pana prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna z Uniwersytetu Gdańskiego, **członka PTM** na stanowisko Przewodniczącego Rady Doskonałości Naukowej (RDN) w kadencji 2019–2023. RDN zastępuje dotychczasową Centralną Komisję do spraw Stopni i Tytułów.
Pan prof. Grzegorz Węgrzyn do RDN został wybrany w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauk biologicznych. Zainteresowania badawcze Pana profesora to mechanizmy replikacji DNA plazmidów i bakteriofagów, regulacja ekspresji genów w komórkach bakteryjnych oraz zastosowanie elektrycznych bio-chipów.
6. Ustalono, że **XXIX Zjazd PTM odbędzie się w dniach 15–18 września 2020 r., w Warszawie w Centrum Konferencyjno-Szkoleniowym przy ul. Bobrowieckiej 9**. Prosimy o zarezerwowanie tego terminu i przygotowanie ciekawych oraz wartościowych prac.



**XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
MIKROBIOLOGÓW**

15-18 WRZEŚNIA 2020,
WARSZAWA

SEKRETARZ
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

A. Laudy
dr hab. n. farm. Agnieszka E. Laudy

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

S. Tyski
prof. dr hab. Stefan Tyski

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM

Członek Wspierający PTM – Złoty
od 27.03.2017 r.



HCS Europe – Hygiene & Cleaning Solutions
ul. Warszawska 9a, 32-086 Węgrzce k. Krakowa
tel. (12) 414 00 60, 506 184 673, fax (12) 414 00 66
www.hcseurope.pl

Firma projektuje profesjonalne systemy utrzymania czystości i higieny dla klientów o szczególnych wymaganiach higienicznych, m.in. kompleksowe systemy mycia, dezynfekcji, osuszania rąk dla pracowników służby zdrowia, preparaty do dezynfekcji powierzchni dla służby zdrowia, systemy sterylizacji narzędzi.

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.09.2017 r.



Firma Ecolab Sp. z o.o. zapewnia: najlepszą ochronę środowiska pracy przed patogenami powodującymi zakażenia podczas leczenia pacjentów, bezpieczeństwo i wygodę personelu, funkcjonalność posiadanego sprzętu i urządzeń. Firma jest partnerem dla przemysłów farmaceutycznego, biotechnologicznego i kosmetycznego.

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.12.2017 r.



Od ponad 100 lat siedziba Wodociągów Krakowskich mieści się przy ul. Senatorskiej. Budowę obiektu ukończono w 1913 roku. W 2016 r. do sieci wodociągowej wtłoczono ponad 56 mln m³ wody. Szacuje się, że ponad 99,5% mieszkańców Gminy Miejskiej Kraków posiada możliwość korzystania z istniejącej sieci wodociągowej.

Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 12.09.2017 r.



Merck Sp. z o.o. jest częścią międzynarodowej grupy Merck KGaA z siedzibą w Darmstadt, Niemcy i dostarcza na rynek polski od roku 1992 wysokiej jakości produkty farmaceutyczne i chemiczne, w tym podłoża mikrobiologiczne

**Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 06.06.2019 r.**



BART Spółka z o.o. Sp. K
ul. Norwida 4, 05-250 Słupno
NIP: 1180741884, KRS: 0000573068
<https://bart.pl/>, email: info@bart.pl

Firma BART jest producentem i dystrybutorem surowców oraz dodatków dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego. Specjalizujemy się w probiotykach oraz surowcach uzyskiwanych metodami biotechnologicznymi. Współpracujemy z renomowanymi producentami: Probiotal, Gnosis, Lesaffre

SPIS TREŚCI

Profesor Stefan Kryński, uczeń Rudolfa Weigla	123
J. Berdychowska, J. Boniecka, G.B. Dąbrowska – Odpowiedź ścisła i jej zaangażowanie w reakcje komórek bakteryjnych na stresy	127
M. Turniak, B. Sobieszcańska – <i>Escherichia coli</i> o rozsianym typie adhezji	143
P. Gałązka, P. Kaczor, K. Leis, K. Grzelakowska – Lyssavirus spp. – wirusy wścieklizny jako wciąż aktualny problem	153
D. Łagowski, S. Gnat, A. Nowakiewicz, M. Osińska, P. Zięba – Prewalencja symptomatycznych dermatofitoz u psów i kotów oraz patomechanizm infekcji dermatofitowych	165
K. Leja, K. Szudera-Kończal, K. Myszką, K. Czaczyk – Przeciwdrobnoustrojowa aktywność olejków eterycznych szansą rozwiązania problemu antybiotykoodporności na przykładzie bakterii <i>Pseudomonas</i> spp.	177
A.M. Berthold-Pluta, A.S. Pluta, M. Garbowska, L. Stasiak-Różańska – Bakterie mlekowe wytwarzające egzopolisacharydy – właściwości prozdrowotne i zastosowanie w przemyśle mleczarskim	191
PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY	
E. Młodzińska, W. Hryniewicz – Zapewnienie jakości w medycznym laboratorium mikrobiologicznym	205
RECENZJE	213
KOMUNIKATY, INFORMACJE	215

CONTENTS

Profesor Stefan Kryński, uczeń Rudolfa Weigla	123
J. Berdychowska, J. Boniecka, G.B. Dąbrowska – The stringent response and its involvement in the reactions of bacterial cells to stresses	127
M. Turniak, B. Sobieszcańska – Diffusely adhering <i>Escherichia coli</i>	143
P. Gałązka, P. Kaczor, K. Leis, K. Grzelakowska – Lyssavirus spp. – rabies viruses as a still-present problem	153
D. Łagowski, S. Gnat, A. Nowakiewicz, M. Osińska, P. Zięba – Prevalence of symptomatic dermatophytoses in dogs and cats and the pathomechanism of dermatophyte infections	165
K. Leja, K. Szudera-Kończal, K. Myszką, K. Czaczyk – Antibacterial effect of natural oils – an opportunity to solve the problem of antibiotic resistance on the example of <i>Pseudomonas</i> spp.	177
A.M. Berthold-Pluta, A. St. Pluta, M. Garbowska, L. Stasiak-Różańska – Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria – health-promoting properties and application in the dairy industry	191
METHODS AND STANDARDS	
E. Młodzińska, W. Hryniewicz – Quality assurance in the medical microbiology laboratory	205
REVIEW	213
NEW REPORTS, INFORMATION	215

