

Quarterly

Volume 62

Issue 1•2023

JANUARY – MARCH

CODEN:

PMKMAV 62 (1)

2023

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Advancements of Microbiology

formerly Postępy Mikrobiologii

Impact Factor = 1,118 (2021)

Punktacja MNiSW = 20,00 (2019)

<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 RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki),
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOSŁAW 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

ELIGIA M. SZEWCZYK (Redaktorka Naczelna)

ANNA BIAŁECKA (Sekretarz)

ADRES REDAKCJI

Sławkowska 17, 31-016 Kraków, Polska
e-mail: editorial-office@am-online.org
telefon: (+48) 885 191 121

REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPŁAWSKA (Uniwersytet Warszawski), GABRIELA BUGLA-PŁOSKOŃSKA (Uniwersytet Wrocławski),
KATARZYNA GRUDLEWSKA-BUDA (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu)
AGNIESZKA KWIATEK (Uniwersytet Warszawski), BOŻENA NEJMAN-FALEŃCZYK (Uniwersytet Gdański),
RENATA MATLAKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), EDYTA PODSIADŁY (Uniwersyteckie Centrum Kliniczne WUM),
ADRIANNA RACZKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), KRZYSZTOF SKOWRON (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),
AGNIESZKA SZCZEPANKOWSKA (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN),

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

***Staphylococcus carnosus* opłaszczony nanocząstkami złota**

Preparatyka: mgr Dorota Ochońska (hodowla), Zakład Molekularnej Mikrobiologii Medycznej, Katedra Mikrobiologii,
Wydział Lekarski CMUJ, dr Wojciech Pajerski (utrwalanie próbek), Grupa Chemii Powierzchni i Materiałów,
Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Chemii UJ.

Cwiklik's lab, Department of Computational Chemistry, J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry,
The Czech Academy of Sciences Olga Woźnicka (cięcie mikrotomem oraz obrazowanie TEM),
Zakład Biologii i Obrazowania Komórki, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii UJ

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.: 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: Jerzy Grzegorkiewicz

THE HIGH PENETRABILITY OF NANOPARTICLES INTO BACTERIAL MEMBRANES: A KEY OF A POTENTIAL APPLICATION

Amina Meliani^{1*}, Fatima Zohra Amel Khelil², Samira Nair¹

¹Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mustapha Stambouli, Mascara, Algeria

²Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Oran 1 Ahmed Ben Bella, Algeria

Submitted in January 2021, accepted in June 2021

Abstract: Currently, nanoparticles have gained considerable attention for the treatment of bacterial infectious diseases. The possibility for using this technology as an alternative therapeutic strategy for controlling microbial biofilms, colonizations and infections has been the subject of intense investigations. Even though, the potential toxicity and disadvantage of using nanoparticles, researchers focused on their high penetrability into bacterial membranes, capabilities to disrupt biofilm formation and the role of chemotaxis in this interaction. Face to this significant debate, we discuss the link between metal resistance, bacterial chemotaxis and the promising use of nanoparticles (NP). *P. aeruginosa* has emerged as a model organism for biofilm studies, the aim of this review is to provide a concise and comprehensive survey of certain relevant aspects related to the research on nanoparticles and these bacteria.

1. Introduction. 2. Chemotaxis in *Pseudomonas* species. 3. Heavy metal ions, nanoparticles *vis a vis Pseudomonas aeruginosa*. 4. Mode action of nanoparticles in bacterial cell. 4.1. Direct interaction with the bacterial cell wall. 4.2. Inhibition of biofilm formation. 4.3. Generation of reactive oxygen species (ROS). 4.4. Induction of intracellular effects. 5. Conclusion

Key words: biofilm, chemotaxis, metal, nanoparticles

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a major nosocomial pathogen representing a critical threat for human health [74] because of its tolerance and rapid development of resistance towards almost all current antimicrobial therapies [47]. In humans, their infections tend to occur in association with epithelial cell damage to the skin, eye or medical devices such as catheters, ventilators or in immune compromised individuals. In addition to these illnesses, *P. aeruginosa* lung infections are common in individuals with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), ventilator-associated pneumonia (VAP), and cystic fibrosis (CF) [83]. It has been recognized that this bacterium can also modulate the immune response, reminiscent of helminth parasites, and antibiotic resistance due to the production of extracellular enzymes (e.g. β -lactamase) [60].

Furthermore, its survival in the host in the early stages of infection is supported by the secretion of toxins and virulence factors, including pyocyanin and its proteases elastase and alkaline protease (AprA) [49]. *Pseudomonas aeruginosa* has been recognized as an opportunistic pathogen that is the most common

bacterium associated with nosocomial infections and ventilator-associated pneumonia [62].

It may turn out that recent studies have reported several innovative therapeutic technologies. Research studies have demonstrated pronounced effectiveness in fighting these biofilms, which are responsible for microbial resistance [62] and persistent infections [14]. However, with an acquired resistance to antibiotics or biocides, *P. aeruginosa* persist and are difficult to treat or eradicate. Notably, its adaptability and high intrinsic antibiotic resistance enable it to survive in a wide range of other natural and artificial settings, including surfaces in medical facilities [49]. Peterson and Kaur [65] reported that all known mechanisms of antibiotics resistances can be displayed by this bacterium (intrinsic, acquired, and adaptive); sometimes all within the same isolate.

The widespread use of broad-spectrum antibiotics has led to the appearance of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas* spp. Thus, the continuous emergence of bacterial resistance has challenged the research community to develop novel antibiotic agents; there is a pressing need to identify alternate drugs. Among the most promising of these novel antibiotic agents or drugs

* Corresponding author: Amina Meliani, Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Mustapha Stambouli University, Sidi Saïd, 29000 Mascara, Algeria; phone: +213 770509024; e-mail: amina.meliani@univ-mascara.dz; ameliani2003@yahoo.fr
© 2023 Amina Meliani et al.

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution NonCommercial-NoDerivs License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

are metal NPs. These particles used as innovative tools for combating the high rates of antimicrobial resistance have shown promising uses. Furthermore, recent studies have been carried out on the use of nanoparticles (NPs) and offer new prospects to develop novel formulations, based on their distinct types of sizes, shapes and flexible antimicrobial properties [77]. These authors mentioned that nanoparticles (e.g., metallic, organic, carbon nanotubes, etc.) may circumvent drug resistance mechanisms in bacteria and, associated with their antimicrobial potential, inhibit biofilm formation or other important processes.

On the other hand, NPs are more toxic to human health in comparison to large-sized particles of the same chemical substance, and it is usually suggested that toxicities are inversely proportional to the size of the NPs [91]. Silver nanoparticles (NPs) are toxic to bacteria, and are currently used in everything from medical devices to sport socks and washing machines to deter microbial growth. Silver is a particularly toxic heavy metal as it interferes with the electron transport chain and binds to DNA [79].

However, the use of nanoparticles still presents a challenge to therapy and much more research is needed in order to overcome bacteria-nanoparticles interaction. Nanoparticles often have interesting characteristics, including toxicity, that may attract or deter motile bacteria from encountering them. Nanomaterials could potentially act as chemoattractants by creating favorable environments for hydrogenotrophic microorganisms, or could be chemorepellents because of the release of toxic ions [37]. Since a long time, mechanisms of chemotaxis remain unclear because of the complex chemotaxis systems in certain bacteria species.

In this review, we will summarize the current research on nanoparticles and how these one can be applied in the future to fight multidrug resistant *Pseudomonas* spp. A better understanding of this chemotaxis signaling pathways is necessary for the development of innovative nanoparticles therapeutic strategies to fight against this extremely problematic human or environmental pathogen.

2. Chemotaxis in *Pseudomonas* species

Bacterial chemotaxis is a biased movement towards higher concentrations of life-sustaining nutrients and lower concentrations of toxins. It involves sensing a gradient of chemicals as small as a few molecules [84]. Interestingly, the bacterial movement and under the influence of a chemical gradient, either toward (positive chemotaxis) or away (negative chemotaxis) from the gradient helps bacteria to find optimum conditions for their growth and survival [29]. This is achieved

through a variety of signal transduction pathways that most commonly include one-component systems, two-component systems, and chemoreceptor-based signaling cascades [57], also referred to as chemotaxis or chemosensory systems [84].

Chemotaxis in *Pseudomonas* species is one of the most diversified and best-understood signal transduction networks. It is interesting to point out that most strains possess one or two sets of the chemotaxis genes. Interestingly, genome analysis reveals that a large number of environmental motile bacteria possess several genes involved in chemosensing and chemotactic signal transduction. Motile bacteria sense changes in the concentration of chemicals in their environment and respond in a behavioral manner [1]. They have the ability to sense changes in the concentration of chemicals in the environment and respond by altering their pattern of motility using the two chemotaxis pathways [54] reviewed clearly by Ortega et al. [57].

Furthermore, the chemoeffector repertoire of *Pseudomonads* is very diverse and includes organic and amino acids, aromatic hydrocarbons, sugars, fatty acids, peptides, bivalent metal ions, inorganic anions, herbicides, morphine, as well as purine and pyrimidine bases [72]. *Pseudomonas* strains have extraordinary metabolic versatility and a large number of chemoreceptors. Ortega et al. [58] concluded that three chemosensory pathways in *P. aeruginosa* utilize one chemoreceptor per pathway, whereas the fourth pathway, which is the main system controlling chemotaxis, utilizes the other 23 chemoreceptors. As mentioned by Ortega et al. [58] the three model strains analyzed contain 26 chemoreceptors (PAO1), 27 chemoreceptors (KT2440), and 37 chemoreceptors (Pfl0-1).

For instance, when a toxic compound is present in the environment, bacteria can detect it and swim away [52]. *Via* this response researcher could understand the tolerance or resistance to certain metals, used as nanoparticles. It has been well established that essential metals, such as, iron and zinc, control diverse cellular metabolisms and biofilm formation in *P. aeruginosa* [78]. Furthermore, biofilm cells of *P. aeruginosa* are much more resistant to heavy metal stress than their planktonic counterparts [78, 53].

Harrison et al. [28] has also shown that ions of several metals, such as, silver, copper, and gallium, exert bactericidal and antibiofilm activities against *P. aeruginosa*. Meliani and bensoltane [54] reported that when a toxic compound is present in the environment such as Cadmium nitrate ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) or lead acetate ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$), bacteria can detect it and swim or swarm away. The motility patterns seems to be dependent or correlated to the heavy metal either chemoattractant or chemorepellent. Assessing the application nanoparticles requires on understanding of

the mobility, the reactivity and specially the chemotactic response of the pathogen or engineered microorganism [54].

3. Heavy metal ions, nanoparticles *vis a vis Pseudomonas aeruginosa*

Metal contamination has been linked to birth defects, cancer, skin lesions, mental and physical retardation, learning disabilities, liver and kidney damage and a host of other diseases [75]. Thus, heavy metals pose a critical concern to human health and environmental issues due to their high occurrence as a contaminant, low solubility in biota and the classification of several heavy metals as carcinogenic and mutagenic [17].

Heavy metals are the primary inorganic contaminants, which include cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel and zinc etc. It was observed that some bacteria could survive and grow even at high metal ion concentrations such as *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa* [25]. If one accepts that zinc oxide nanoparticles (NPs) are also considered for use as new antimicrobial agents generation, the ability of using other heavy metal can be possible, the question of Why and How? Still remains.

It quickly became apparent that the effects of heavy metal ions on *P. aeruginosa* have been well studied with regard to toxicity and metal resistance [78, 27]. In the case of *Pseudomonas aeruginosa* their resistance mechanisms include the mer operon that reduces toxic Hg^{2+} to volatile Hg^0 , which then diffuses out of the cell [59]. Moreover, bacterial biofilm tolerance to antimicrobials, including metals, is currently regarded as a multifactorial phenomenon [27]. Several researchers have reported that biofilms are capable of removing heavy metal ions from bulk liquid [39] and the use of biofilms to remove heavy metals from wastewater has been investigated [88]. It was determined that biofilms were anywhere from 2 to 600 times more resistant to heavy metal stress than free-swimming cells [78].

It is also interesting to note that the structure dependent metabolic heterogeneity may also explain, in part, the tolerance of bacterial biofilms to metal ions. In *P. aeruginosa* biofilms that are less than 100 μm thick, the cells that are nearest to the substratum are in anoxic zones and are slow growing, which leads to an intrinsic tolerance to killing by antibiotics relative to the aerobic fast growers in the outer biofilm layers [53].

As reported by Wagner-Döbler et al. [85] electron microscopy revealed that a *P. aeruginosa* biofilm was capable of sequestering heavy metals and that there was surface-associated precipitation of lanthanum by biofilm cells, while mercury-reducing *Pseudomonas putida* biofilms were found to accumulate elemental mercury on the exterior of the biofilms.

Another line of research is devoted to nanotechnology, which produced materials of various types at nanoscale level. The continuous emergence of bacterial resistance has challenged the research community to develop novel antibiotic agents. Among the most promising of these novel antibiotic agents are metal NPs, which have shown strong antibacterial activity in an overwhelming number of studies [76]. Nanoparticles (NPs) are wide class of materials that include particulate substances, which have one dimension less than 100 nm at least [40]. These inorganic particles of either simple or complex nature, display unique, physical and chemical properties and represent an increasingly important material in the development of novel nanodevices which can be used in numerous physical, biological, biomedical and pharmaceutical applications [48]. It is also noteworthy that nanoparticles (NPs) show unique and considerably changed chemical, physical, and biological properties compared to bulk of the same chemical composition, due to their high surface-to volume ratio. NPs exhibit size and shape-dependent properties which are of interest for applications ranging from biosensing, catalysts to optics and antimicrobial activity [33]. With an antimicrobial one, nanoparticles are used for their high penetrability into bacterial membranes. They can disrupt biofilm formation, possess multiple antimicrobial mechanisms, and are good carriers of antibiotics [86]. The metallic and antimicrobial agent-loaded nanoparticles have been extensively studied, the nanocomposite films displayed a significant antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [95]. In chemotaxis experiments of Kirschling [37], it was demonstrated that while *V. gazogenes* did not see silver as a chemorepellant, the silver resistant *Pseudomonas* sp. was repelled by 50 nm silver nanoparticles.

Furthermore, AshaRani et al. [4] reported that AgNPs are being used increasingly in wound dressings, catheters and various households products due to their antimicrobial activity. Antimicrobial agents are extremely vital in textile, medicine, water disinfection and food packaging. Therefore, the antimicrobial characteristics of inorganic NPs add more potency to this important aspect, as compared to organic compounds, which are relatively toxic to the biological systems [26]. On the other hand, understanding these phenomena will allow researchers to explain the application of nanotherapy.

4. Mode action of nanoparticles in bacterial cell

Nowadays, it is known the disadvantage of using nanoparticles and their potential toxicity, but these tiny materials presented a great antimicrobial activity and

have been used in a variety of chemical, biological and biomedical applications [34]. NPs have a number of features, which make them favorable as vectors for drugs to combat disease-causing pathogens. These include their enhancement of drug solubility and stability [32]; their ease of synthesis [22] and their modulated release [77] or biocompatibility with target components cells. Slavina et al. [76] reported that the most effective NPs *vis a vis* bacteria, are those containing Ag, Au, Al, Cu, Ce, Cd, Mg, Ni, Se, Pd, Ti, Zn, and super-paramagnetic Fe. Other NPs such as CuONPs, TiONPs, AuNPs, and Fe₃O₂NPs, have also demonstrated bactericidal effects [30]. Among the metal-containing NPs, Au NPs have moderate antibacterial activity unless their surface is modified. Ag NPs are the most effective nano-weapon against bacterial infections [70].

It is worth noting that the mode of action of NPs is direct contact with the bacterial cell wall, without the need to penetrate the cell. Ma and Lin [50] mentioned that once NPs come into contact with cell surfaces, they may be adsorbed on the cell walls or membranes by multiple forces, and then it is likely that they will enter the cells through various routes. The biophysicochemical interactions at the interfaces between the NPs and cells, in conclusion, mainly include adsorption and internalization.

Thus, NPs need to be in contact with bacterial cells to achieve their antibacterial function *via* the known accepted forms of electrostatic attraction, van der Waals forces, receptor-ligand and hydrophobic interactions. Ma and Lin [50] summarize schematically the main adsorption mechanisms at the NP cell interfaces. They mentioned that the NPs with bio interfaces can be combined by van der Waals forces, a common attracting force. NPs with hydrophobic surfaces would be adsorbed on the hydrophobic surface zones of the cells through hydrophobic forces. In addition, Qiu et al. [66] reported that the electrostatic attraction, as another important and general adsorption mechanism can cause the charged NPs to become adsorbed on the cell surfaces with opposite charges. Gram positive bacteria have a highly negative charge on the surface of the cell wall. For example, LPS provides negatively charged regions on the cell wall of Gram-negative bacteria that attracts NPs; and, since teichoic acid is only expressed in Gram-positive bacteria, the NPs are distributed along the phosphate chain. As such, the antimicrobial effect is more foreshadowed in Gram positive than negative bacteria [86]. Other specific interactions are also included like the hydrogen bonding and receptor ligand interactions, depending on the surface properties of both NPs and cells [70].

NPs do not present the same mechanisms of action of standard antibiotics but they can exert a multitude of mechanisms (Fig. 1).

4.1. Direct interaction with the bacterial cell wall

Both Gram-positive and negative bacteria have a negatively charged cell wall, a characteristic that is hypothesized to influence the interactions between the cell walls of the bacteria and NPs or ions released from them. The components of the cell membrane produce different adsorption pathways for NPs and Gram-positive and Gram-negative bacteria [43]. Studies performed in Gram-negative bacteria such as *Salmonella typhimurium* showed that the cell wall is populated with a mosaic of anionic surfaces domains rather than a continuous layer [51].

Moreover, Gram-negative bacteria, such as *Escherichia coli*, bacterial cells are covered by a layer of lipopolysaccharides (1–3 μm thick) and peptidoglycans (~8 nm thick). In the case of Gram-positive bacteria like *Staphylococcus aureus* possess a peptidoglycan layer much thicker than Gram-negative bacteria, spanning over 80 nm with covalently attached teichoic and teichuronic acids [76]. Baek and An [5] reported that Gram-negative bacteria *Escherichia coli* are highly susceptible whereas Gram-positive *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* are less susceptible to CuO NPs, a trend that corresponds with Khan et al. [36] findings on silver and cobalt nanoparticles. For example, Ag and ZnO NPs have been reported to exert antibacterial activity by release of Ag⁺ and Zn⁺⁺ that disrupt the membrane [15, 18].

4.2. Inhibition of biofilm formation

NPs have emerged as alternative antimicrobial approach to combat biofilms and for treating severe bacterial infections [56]. The antibacterial activity of NPs against multidrug-resistant (MDR) bacteria and biofilms depends on a number of factors, namely, their large surface area in contact with bacteria through the mentioned interactions; on the nanoparticle size and stability; together with the drug concentration [46]. The molecular mechanisms, by which metal-based NPs annihilate MDR bacteria, resulting in disturbance in respiration and inhibition of cellular growth, have been extensively reviewed [15, 18]. Fabrega et al. [19] results suggested that *Pseudomonas putida* biofilms are impacted by the treatment with AgNPs. Furthermore, Kalishwaralal et al. [35] concluded that AgNPs are able to induce the detachment of *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* with rapidity and efficiency, opening clinical possibilities of alternative therapies. Antibiofilm action of AgNPs of 8.3 nm in diameter stabilized by hydrolyzed casein peptides on Gram-negative bacteria (*E. coli*, *P. aeruginosa* and *Serratia proteamaculans*) was investigated by Radzig et al. [69]. Gurunathan et al.

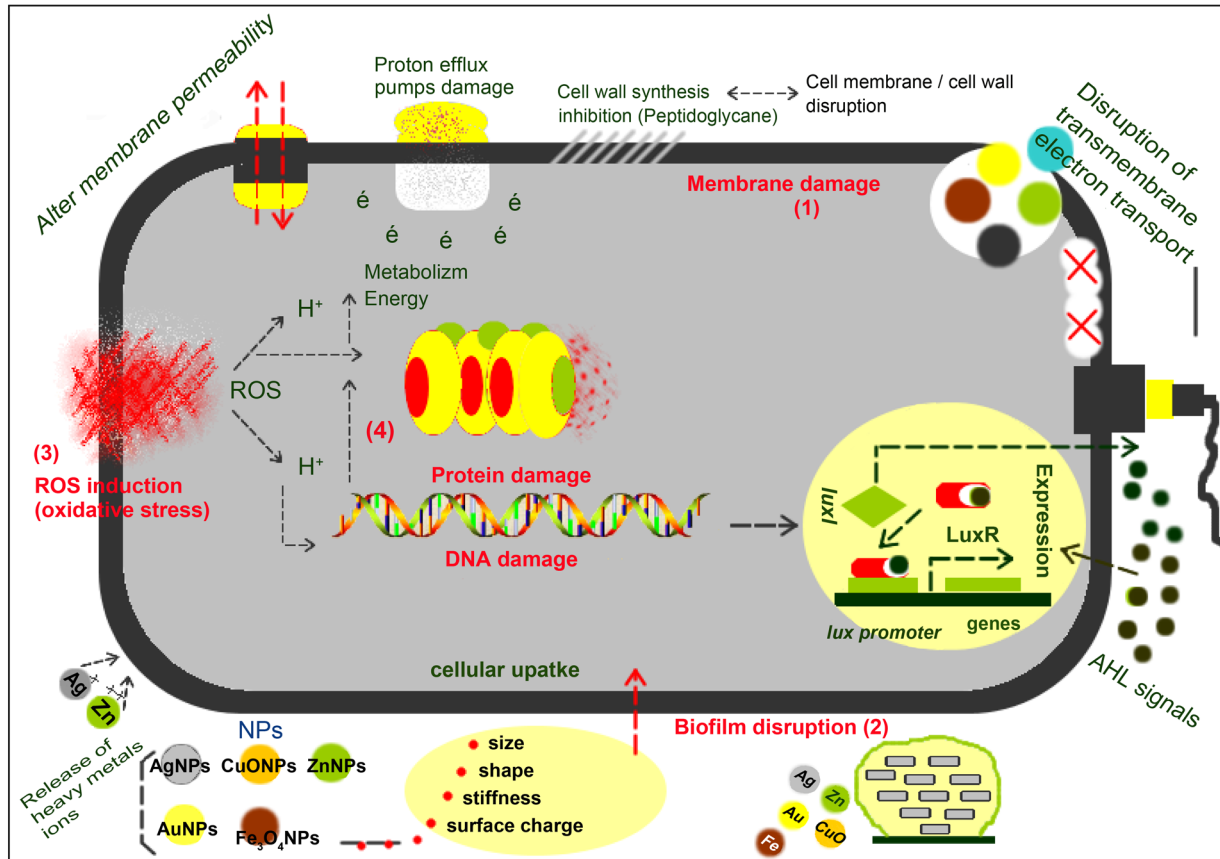


Fig.1. Different actions of NPs in bacterial cells [1, 2, 3, 4]

With different size, shape, stiffness and surface charge NPs cross the bacterial membrane and disrupt cell membrane and wall, influencing several pathways. NPs trigger a generation of oxidative stress (ROS) that damage cellular proteins and cell's basic components (DNA, ribosomes, enzymes), leading to changes in cell membrane permeability, metabolism pathways and biofilm disruption.

[24] analyzed the antibacterial and antibiofilm activity of antibiotics these nanoparticles, or combinations of both against *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *S. aureus*, and *Streptococcus pneumoniae*. The anti-biofilm activity of silver nanoparticles was also demonstrated in Ansari et al. [2] study. These authors reported that biofilms from clinical isolates of *P. aeruginosa* treated with gum arabic capped silver nanoparticles (GA-AgNPs) showed a concentration dependent inhibition of bacterial growth and treatment of catheters with GA-AgNPs at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resulted in 95% inhibition of bacterial colonization of the plastic catheter surface. In another interesting study, it was proved a synergistic activity of chitosan and AgNPs to reduce the growth of *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* strains and to disrupt mature biofilms [71].

Furthermore, and in another report, thirty-six metal ions have been investigated to identify antivirulence and antibiofilm metal ions. Zinc ions and ZnO nanoparticles were found to markedly inhibit biofilm formation and the production of pyocyanin, *Pseudomonas* quinolone signals (PQS), pyochelin, and hemolytic activity of *P. aeruginosa* without affecting the growth of planktonic cells [41]. TiO_2 , ZnO, BiVO_4 , Cu- and

Ni-based NPs have been utilized for this purpose due to their suitable antibacterial efficacies [63, 67]. Fabrega et al. [19] demonstrated the inhibition of marine biofilm by Ag NPs, and reported a concentration dependent reduction in biofilm formation. ZnO NPs [41] are also documented to inhibit the microbial biofilm formation. YF_2 [42] and Se NPs [23] restrain growth and biofilm formation of *E. coli* and *S. aureus*. TiO_2 [89] CdS [16] KMgF_2 [42] and Bi NPs [31] have also been reported to disrupt bacterial biofilms.

Another engineered nanoparticle was found to improve the survival rate and the bacterial clearance in a mouse model of *P. aeruginosa* lung infection [41]. In addition, attachment of antibiotics to nanoparticle surfaces has been found to significantly enhance the efficacy of both antibiotics and nanoparticles. In this regard, silver nanoparticles attached to ampicillin have a higher killing rate of ampicillin resistant *P. aeruginosa* isolates in vitro compared to the silver nanoparticles without ampicillin bound [10].

Previous studies have shown that, Zinc ions and ZnO nanoparticles were found to markedly inhibit biofilm formation and the production of pyocyanin, *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), pyochelin, and

hemolytic activity of *P. aeruginosa* without affecting the growth of planktonic cells. Transcriptome analyses showed that ZnO nanoparticles induce the zinc cation efflux pump *czc* operon and several important transcriptional regulators (porin gene *opdT* and type III repressor *ptrA*) [41].

4.3. Generation of reactive oxygen species (ROS)

The interaction of NPs with bacteria generally triggers oxidative stress mechanisms, enzymatic inhibition, protein deactivation and changes in gene expression. Still, the most common antibacterial mechanisms are related to oxidative stress, metal ion release, and non-oxidative mechanisms [86]. As reported by these authors, ROS is a generic term for molecules and reactive intermediates that have strong positive redox potential, and different types of NPs produce different types of ROS by reducing oxygen molecules. Reactive oxygen species (ROS) are natural by products of cellular oxidative metabolism and play important roles in the modulation of cell survival, cell death, differentiation, cell signaling, and inflammation-related factor production [55]. Different NPs may generate distinctive ROS, such as superoxide (O_2^-) or hydroxyl radical ($\cdot OH$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and $1[O_2]$ [86]. Umamaheswari et al. [81] demonstrated that the antibacterial activity of AuNPs against *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* were due to oxidative stress caused by increased intracellular ROS. In another important study using different metal NPs, AgNPs were shown to generate superoxide radicals and hydroxyl radicals, whereas Au, Ni, and Si NPs generated only singlet oxygen, which upon entering the cell produced an antibacterial effect [94].

Under high levels of stress, the levels of ROS can increase significantly and it is hypothesized that their generation is one of the focal NP mechanisms of action that inhibit bacterial growth [61, 45]. Compared with microparticles or their bulk of origin, NPs possess unique physicochemical properties (size, surface area, shape, solubility, and aggregation status) that correlate with their potential to generate ROS [87]. Previous reports illustrated the impact of reactive surfaces of NPs in ROS production [82]. Excessive ROS caused lipid peroxidation, membrane permeability augmentation, and oxidation damage of DNA, RNA, and proteins in bacteria. Bao et al [6] also found that AgNPs could inhibit new DNA synthesis in the cells.

Furthermore, several research reports evidenced the role of oxidative stress in NP-induced antimicrobial activity. Biologically-synthesized AgNPs showed potent antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. The significant antimicrobial effect of AgNP is attributed to

its potential up-regulation of ROS and reactive nitrogen intermediates that eventually leads to killing of the bacteria [68]. In the same way, nanosilver ions are used as the center of catalytic activity to activate the oxygen in air or water, leading to the production of hydroxyl radicals and reactive oxygen ions, which prevent the proliferation of bacteria or kill them [92]. Furthermore, ROS are beneficial to increasing the gene expression levels of oxidative proteins, which is a key mechanism in bacterial cell apoptosis [90].

These authors reported the significant antimicrobial effect of AgNP, which is attributed to its potential up-regulation of ROS and reactive nitrogen intermediates that eventually leads to killing of the bacteria. Iron oxide NP (IONPs) that coated with the positively charged chitosan possesses special interface that showed significant production of ROS, which is involved in its significant antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [3].

4.4. Induction of intracellular effects

As mentioned above AgNPs are potent inducers of reactive oxygen species. The augmented reactive species levels are known to affect and damage the major bio-molecules, such as nucleic acids and proteins [93]. This nanoparticle-generated oxidative stress, in turn, may also affect the cellular metabolic systems, thereby resulting in increased productivity of certain metabolites [8]. The entry of AgNPs induces ROS that will inhibit ATP production and DNA replication [15]. Feng et al. [21] reported the presence of silver ions and sulfur in the electron-dense granules observed after silver ions treatment in the cytoplasm of bacterial cells suggests an interaction with nucleic acids that probably results in impairment of DNA replication.

Others researchers reported that the plausible mechanism of action of TiO_2 NPs against the bacteria could be ROS generation, DNA damage after internalization, peroxidation of membrane phospholipids and inhibition of respiration [38, 80]. Additionally, it has been described that iron oxide NPs can damage macromolecules, including DNA and proteins, through the formation of ROS [44]. Sarwar et al. [73] data demonstrated that nanosized ZnO caused significant oxidative stress to *Vibrio cholerae*, the damage inflicted was DNA degradation, protein leakage, membrane depolarization and fluidity.

Another study observed that copper oxide NPs generate ROS that often leads to chromosomal DNA degradation, which seems to highlight a "particle-specific" action rather than resulting from the release of metallic ions [12].

Inhibition of DNA replication and DNA degradation has also been reported with Cu NPs in Chatterjee

et al. [13] study. Thus, the potentials of NPs for use as tags of DNA, proteins, microbes, and other cellular molecules make them promising materials for various diagnostic applications [11].

5. Conclusion

Beside certain toxicities associated with nanoparticles, there has been growing interest in the development of their use in medical applications; they are suitable candidates for the treatment of various bacterial infections. This review provided a proposed hypothesis of the application of metals in another positive way of nanotechnology. However, future studies that utilize nanoparticles need to focus on understanding the bacterial chemotaxis to optimize their functioning in medical applications.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Adler J.: Chemotaxis in bacteria. *Science*, **153**, 708–716 (1966)
- Ansari M.A., Khan H.M., Khan A.A., Cameotra S.S., Alzohairy M.A.: Anti-biofilm efficacy of silver nanoparticles against MRSA and MRSE isolated from wounds in a tertiary care hospital. *Indian J. Med. Microbiol.* **33**, 101–109 (2015)
- Arakha M., Pal S., Samantarrai D., Panigrahi T.K., Mallick B.C., Pramanik K., Mallick B., Jha S.: Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. *Sci. Rep.* **5**, 14813 (2015)
- AshaRani P.V., Low KahMun G., Hande M.P., Valiyaveetil S.: Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, **3**, 279–290 (2009)
- Baek Y.W., An Y.J.: Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Sci. Total. Environ.* **409**, 1603–1608 (2011)
- Bao H., Yu X., Xu C., Li X., Li Z., Wei D., Liu Y.: New toxicity mechanism of silver nanoparticles: promoting apoptosis and inhibiting proliferation. *PLoS One*, **10**, e122535 (2015)
- Barbier F., Andremont A., Wolff M., Bouadma L.: Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: recent advances in epidemiology and management. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **19**, 216–228 (2013)
- Bhalla P., Rengaswamy R., Karunakaran D., Suraishkumar G.K., Sahoo S.: Silver nanoparticle induced oxidative stress augments anticancer gut bacterial metabolites production. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/658609> (2019)
- Bleves S., Viarre V., Salacha R., Michel G.P., Filloux A., Voulhoux R.: Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 534–543 (2010)
- Brown A.N., Smith K., Samuels T.A., Lu J., Obare S.O., Scott M.E.: Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2768–2774 (2012)
- Cao Y.C., Jin R., Mirkin C.A.: Nanoparticles with raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, **297**, 1536–1540 (2002)
- Chakraborty R., Sarkar R.K., Chatterjee A.K., Manju U., Chattopadhyay A.P., and Basu T.: A simple, fast and cost-effective method of synthesis of cupric oxide nanoparticle with promising antibacterial potency: unraveling the biological and chemical modes of action. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1850**, 845–856 (2015)
- Chatterjee A.K., Chakraborty R., Basu T.: Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology*, **25**, 135101 (2014)
- Ciofu O., Tolker-Nielsen T.: Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front. Microbiol.* **10**, 913 (2019)
- Dakal T.C., Kumar A., Majumdar R.S., Yadav V.: Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front. Microbiol.* **7**, 1831 (2016)
- Dhanabalan K., Gurunathan K.: Microemulsion mediated synthesis and characterization of CdS nanoparticles and its antibiofilm efficacy against *Escherichia coli* ATCC 25922. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **15**, 4200–4204 (2015)
- Diels L., van der Lelie N., Bastiaens L.: New development in treatment of heavy metal contaminated soils. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **1**, 75–82 (2002)
- Durán N., Durán M., de Jesus M.B., Seabra A.B., Fávaro W.J., Nakazato G.: Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine*, **12**, 789–799 (2016)
- Fabrega J., Renshaw J.C., Lead J.R.: Interactions of silver nanoparticles with *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 9004–9009 (2009)
- Fabrega J., Zhang R., Renshaw J.C., Liu W.T., Lead J.R.: Impact of silver nanoparticles on natural marine biofilm bacteria. *Chemosphere*, **85**, 961–966 (2011)
- Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O.: A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 1097–4636 (2000)
- Gholipourmalekabadi M., Mobaraki M., Ghaffari M., Zarebkohan A., Omrani V., Urbanska A., Seifalian A.: Targeted drug delivery based on gold nanoparticle derivatives. *Curr. Pharm. Des.* **23**, 2918–2929 (2017)
- Guisbiers G., Wang Q., Khachatryan E., Mimun L.C., Mendozacruz R., Larese-Casanova P., Webster T.J., Nash K.L.: Inhibition of *E. coli* and *S. aureus* with selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in deionized water. *Int. J. Nanomedicine*, **11**, 3731–3736 (2016)
- Gurunathan S., Han J.W., Kwon D.N., Kim J.H.: Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale Res. Lett.* **9**, 373 (2014)
- Haefeli C., Franklin C., Hardy K.: Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine. *J. Bacteriol.* **158**, 389–392 (1984)
- Hajipour M.J., Fromm K.M., Ashkarran A., Akbar, de Aberasturi D., Jimenez de Larramendi I.R., Rojo T., Serpooshan V., Parak W.J., Mahmoudi M.: Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **30**, 499–511 (2012)
- Harrison J.J., Turner R.J., Ceri H.: Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 928–938 (2007)
- Harrison J.J., Turner R.J., Ceri H.: Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **7**, 981–994 (2005)

29. Harwood C.S., Parales R.E., Dispensa M.: Chemotaxis of *Pseudomonas putida* toward chlorinated benzoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 501–1503 (1990)
30. Hemeg H.A.: Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *Int. J. Nanomed.* **12**, 8211–8225 (2017)
31. Hernandez-Delgadillo R., Velasco-Arias D., Diaz D., et al.: Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 2109–2113 (2012)
32. Huh A.J., and Kwon Y.J.: “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J. Control. Release*, **156**, 128–145 (2011)
33. Iravani S.: Bacteria in Nanoparticle Synthesis: Current status and future prospects. *Int. Sch. Res. Notices*, doi: 10.1155/2014/359316(2014)
34. Jeevanandam J., Barhoum A., Chan Y.S., Dufresne A., Danquah M.K.: Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* **9**, 1050–1074 (2018)
35. Kalishwaralal K., BarathManiKanth S., Pandian S.R., Deepak V., Gurunathan S.: Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. **79**, 340–344 (2010)
36. Khan S.T., Wahab R., Ahmad J., Saquib Q., Mussarat J.: CoO thin nanosheets exhibit higher antimicrobial activity against tested Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria. *Korean J. Chem. Eng.* **53**, 565–569 (2015)
37. Kirschling T.L.: Nanoparticle Interactions with Bacteria: Toxicity and Chemotaxis. Carnegie Mellon Department of Chemical Engineering MBL Microbial Diversity Course, 1–20 (2009)
38. Kumar A., Pandey A.K., Singh S.S., Shanker R., Dhawan A.: Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*. *Free Radical. Biol. Med.* **51**, 1872–1881 (2011)
39. Labrenz M., Banfield J.F., et al.: Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria. *Science*, **290**, 1744–1747 (2000)
40. Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander Elst L., Muller RN.: Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* **110**, 2574 (2010)
41. Lee J-H., Kim Y-G., Cho M.H., Lee J.: ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiol. Res.* **169**, 888–896 (2014)
42. Lellouche J., Friedman A., Gedanken A., Banin E.: Antibacterial and antibiofilm properties of yttrium fluoride nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 5611–5624 (2012)
43. Lesniak A., Salvati A., Santos-Martinez M.J., Radomski M.W., Dawson K.A., Åberg C.: Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1438–1444 (2013)
44. Leuba K.D., Durmus N.G., Taylor E.N., and Webster T.J. Short communication: carboxylate functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) for the reduction of *S. aureus* growth post biofilm formation. *Int. J. Nanomedicine*, **8**, 731–736 (2013)
45. Leung Y.H., Leung F.C.C., et al.: Mechanisms of antibacterial activity of MgO: non-ROS mediated toxicity of MgO nanoparticles towards *Escherichia coli*. *Small*, **10**, 1171–1183 (2014)
46. Li H., Chen Q., Zhao J., and Urmila K.: Enhancing the antimicrobial activity of natural extraction using the synthetic ultra-small metal nanoparticles. *Sci. Rep.* **5**, 11033 (2015)
47. Livermore D.M.: Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J. Intern. Med.* **27**, 128–142 (2012)
48. Loureiro A., Azoia N.G., Gomes A.C.: Cavaco-Paulo A. Albumin-based nanodevices as drug carriers. *Curr. Pharm. Des.* **22**, 1371–1390 (2016)
49. Lyczak J.B., Cannon C.L., Pier G.B.: Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbiol. Infect.* **2**, 1051–1060 (2000)
50. Ma S., Lin D.: The biophysicochemical interactions at the interfaces between nanoparticles and aquatic organisms: adsorption and internalization. *Environ. Sci. Processes Impacts*. **15**, 145–160 (2013)
51. Magnusson K.E., Bayer M.E.: Anionic sites on the envelope of *Salmonella typhimurium* mapped with cationized ferritin. *Cell Biophys.* **41**, 163–175 (1982)
52. Matias Barrionuevo R., Vullo D.L.: Bacterial swimming, swarming and chemotactic response to heavy metal presence: which could be the influence on wastewater biotreatment efficiency? *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 2813–2825 (2012)
53. Meliani A., Bensoltane A.: Biofilm-mediated heavy metals bioremediation in PGPR *Pseudomonas*. *J. Bioremediat. Biodegrad.* **7**, 370 (2016)
54. Meliani A., Bensoltane A.: Chemotaxis behavior of *Pseudomonas* species and biodegradation of pollutants. *Sustainable Agriculture Reviews*, **31**, 351–383 (2018)
55. Mueller C.F., Laude K., McNally J.S., Harrison D.G.: Redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 274–278 (2005)
56. Oktar F.N., Yetmez M., Fikai D., Fikai A., Dumitru F., Pica A.: Molecular mechanism and targets of the antimicrobial activity of metal nanoparticles. *Curr. Top. Med. Chem.* **15**, 1583–1588 (2015)
57. Ortega Á., Zhulin I.B., Krell T.: Sensory repertoire of bacterial chemoreceptors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **81**, e00033-17 (2017)
58. Ortega D.R., Fleetwood A.D., Krell T., Harwood C.S.L., Jensen G.J.L., Zhulin I.B.: Assigning chemoreceptors to chemosensory pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 12809–12814 (2017)
59. Outten F.W., Outten C.E., O’Halloran T.: Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance. (in) *Bacterial Stress Responses*, ed. G. Storz, ASM Press, Washington, 2000, pp. 45–157
60. Overhage J., Bains M., Brazas M.D., Hancock R.E.W.: Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **190**, 2671–2679 (2008)
61. Padmavathy N., Vijayaraghavan R.: Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles- an antimicrobial study. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **9**, 35004 (2008)
62. Pang Z., Raudonis R., Glick B.R., Lin T.J., Cheng Z.: Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **37**, 177–192 (2019)
63. Pant H.R., Pant B., Sharma R.K., Amarjargal A., Kim H.J., Park C.H., Tijing L.D., Kim C.S.: Antibacterial and photocatalytic properties of Ag/TiO₂/Zn Onano-flowers prepared by facile one-pot hydrothermal process. *Ceram. Int.* **39**, 1503–1510 (2013)
64. Pelgriff R.Y., Friedman A.J.: Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1803–1815 (2013)
65. Peterson E., Kaur P.: Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front. Microbiol.* **9**, 2928 (2018)
66. Qiu Z., Yu Y., Chen Z., Jin M., Yang D., Zhao Z., Wang J., Shen Z., Wang X., Qian D., Huang A., Zhang B., Li J.W.: Nanoaluminapromotes the horizontal transfer of multiresistance genes medi-

- ated by plasmids across genera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4944–4949 (2012)
67. Qu Z., Liu P., Yang X., Wang F., Zhang W., Fei C.: Microstructure and characteristic of BiVO₄ prepared under different pH values: photocatalytic efficiency and antibacterial activity. *Materials*, **9**, 129 (2016)
 68. Quinteros M.A., Cano Aristizábal V., Dalmasso P.R., Paraje M.G., Páez P.L., Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicol. In Vitro*, **36**, 216–223 (2016)
 69. Radzig M.A., Nadtochenko V.A., Koksharova O.A., Kiwi J., Lipasova V.A., Khmel I.A.: Antibacterial effects of silver nanoparticles on Gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **102**, 300–306 (2013)
 70. Rai M.K., Deshmukh S.D., Ingle A.P., Gade A.K.: Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 841–852 (2012)
 71. Sacco P., Travan A., Borgogna M., Paoletti S., Marsich E.: Silver-containing antimicrobial membrane based on chitosan-TPP hydrogel for the treatment of wounds. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **26**, DOI:10.1007/s10856-015-5474-7 (2015)
 72. Sampedro I., Parales R.E., Krell T., Hill J.E., *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 17–46 (2015)
 73. Sarwar S., Chakraborti S., Bera S., Sheikh I.A., Hoque K.M., and Chakrabarti P.: The antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against *Vibrio cholerae*: variation in response depends on biotype. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**, 1499–1509 (2016)
 74. Shaan L., Gellatly R., Hancock E.W.: *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* **67**, 159–173 (2013)
 75. Singh P., Cameotra S.S.: Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 291–297 (2004)
 76. Slavin Y.N., Asnis J., Häfeli U.O., Bach H.: Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J. Nanobiotechnol.* **15**, DOI:10.1186/s12951-017-0308-z (2017)
 77. Spirescu V.A., Chircov C., Grumezescu A.M., Vasile B.S., Andronesu E.: Inorganic nanoparticles and composite films for antimicrobial therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4595 (2021)
 78. Teitzel G.M., Parsek M.R.: Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2313–2320 (2003)
 79. Thurman R.B., Gerba C.P.: The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Reviews in Environmental Science and Technology*, **18**, 295–315 (1989)
 80. Tsuang Y.H., Sun J.S., Huang Y.C., Lu C.H., Hong-Shong Chang W., Wang C.C.: Studies of photokilling of bacteria using titanium dioxide nanoparticles. *Artif. Organs*, **32**, 167–174 (2008)
 81. Umamaheswari K., Baskar R., Chandru K., Rajendiran N., and Chandirasekar S.: Antibacterial activity of gold nanoparticles and their toxicity assessment. *BMC Infect. Dis.* **14**, P64 (2014)
 82. Vallyathan V., Shi X.: The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. *Environ. Health Perspect.* **105**, 165–177 (1997)
 83. Verstraeten N., Braeken K., Debkumari B. et al.: Living on a surface: Swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.* **16**, 496–506 (2008)
 84. Wadhams G.H., Armitage J.P.: Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 1024–1037 (2004)
 85. Wagner-Döbler I., Lünsdorf H., Lübbehüsen T., Von Canstein H.F., Li Y.: Structure and species composition of mercury-reducing biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4559–4563 (2000)
 86. Wang L., Hu C., Shao L.: The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomedicine*, **12**, 1227–1249 (2017)
 87. Wang S., Lu W., Tovmachenko O., Rai U.S., Yu H., Ray P.C.: Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. *Chem. Phys Lett.* **463**, 145–149 (2008)
 88. White C., Gadd G.M.: Accumulation and effects of cadmium on sulphate-reducing bacterial biofilms. *Microbiology*, **144**, 1407–1415 (1998)
 89. Wong M.S., Chen C.W., Hsieh C.C., Hung S.C., Sun D.S., Chang H.H.: Antibacterial property of Ag nanoparticle-impregnated N-doped titania films under visible light. *Sci. Rep.* **5**, 1978 (2015)
 90. Wu B., Zhuang W.Q., Sahu M., Biswas P., Tang Y.J.: Cu-doped TiO₂ nanoparticles enhance survival of *Shewanella oneidensis* MR-1 under ultraviolet (UV) light exposure. *Sci. Total. Environ.* **409**, 4635–4639 (2011)
 91. Yang L., Watts D.J.: Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol. Lett.* **158**, 122–132 (2005)
 92. Yang W., Shen C., Ji Q., et al.: Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology*, **20**, DOI:10.1088/0957-4484/20/8/085102 (2009)
 93. Zhang T., Wang L., Chen Q., and Chen C.: Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Med. J.* **55**, DOI:10.3349/ymj.2014.55.2.283 (2014)
 94. Zhang W., Li Y., Niu J., and Chen Y.: Photogeneration of reactive oxygen species on uncoated silver, gold, nickel, and silicon nanoparticles and their antibacterial effects. *Langmuir*, **29**, 4647–4651 (2013)
 95. Zhu K., Tian H., Zheng X., Wang L., Wang X.: Triangular silver nanoparticles loaded on graphene oxide sheets as an antibacterial film. *Materials Letters*, **275**, 128162 (2020)

COXSACKIE B – WIRUSY PANTROPOWE

Beata Gad, Magdalena Wiczorek*

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy,
Zakład Wirusologii, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w grudniu 2021 r., zaakceptowano w maju 2022 r.

Streszczenie: Wirusy Coxsackie (CV), podobnie jak inne enterowirusy, to małe, bezosłonkowe wirusy o kształcie ikosaedrycznym kapsydu. Należą do rodziny *Picornaviridae*. Ich nazwa wywodzi się od miasta Coxsackie w stanie Nowy Jork (USA), gdzie w latach 40. XX wieku rozpoznano pierwsze przypadki zachorowań wywołane tymi wirusami. Wirusy Coxsackie B (CVB) wyróżnia od innych enterowirusów zdolność do zakażenia różnego rodzaju tkanek i organów. Tak szeroki tropizm powoduje, że są one czynnikiem etiologicznym wielu różnych jednostek chorobowych. CVB są w stanie zakażać serce, opłucną, trzustkę, płuca i wątrobę powodując zapalenie mięśnia sercowego, pleurodynię, zapalenie trzustki, płuc i wątroby. Przenikają do centralnego układu nerwowego indukując zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie mózgu lub ostre porażenie wiotkie. Powodują także uogólnione zakażenia noworodków oraz choroby chroniczne takie jak cukrzyca typu 1 czy przewlekłe zapalenie mięśnia sercowego. Pantropowy charakter CVB może wynikać ze swoistej interakcji wirusa z receptorem komórkowym, która warunkuje zakażenie i zajęcie kolejnych komórek. CVB łączy się z przynajmniej dwoma białkami receptorowymi, receptorem dla wirusów Coxsackie i adenowirusów (CAR) oraz czynnikiem przyspieszającym rozkład (DAF), ale również inne determinanty mogą warunkować permissywność tkanek i nasilenie choroby. Celem niniejszego artykułu było podsumowanie najważniejszych aspektów dotyczących zakażenia wirusami Coxsackie B takich jak: replikacja, interakcja z białkami gospodarza, zmienność genetyczna, patogenezą, epidemiologią i diagnostyką.

1. Rys historyczny. 2. Klasyfikacja i budowa. 3. Receptory komórkowe i replikacja. 4. Zmienność genetyczna. 5. Przebieg zakażenia. 6. Patogeneza. 7. Epidemiologia. 8. Diagnostyka i możliwości terapeutyczne. 9. Podsumowanie

COXSACKIE B – PANTROPIC VIRUSES

Abstract: Coxsackieviruses (CV), as all enteroviruses, are small, non-enveloped, icosahedral-shaped capsid viruses. They belong to the family *Picornaviridae*. This group was named after the town of Coxsackie in New York State (USA) where was recognized the first human case of coxsackievirus infection in the 40s of the XX century. Coxsackie B (CVB) are distinguished from other enteroviruses by ability to infect many types of tissues and organs. This wide tropism reason that these viruses are etiologic agents of large number of different diseases. CVB cause infection of the heart, pleura, pancreas, lungs and liver, causing myocarditis, pleurodynia, pericarditis, pneumonia and hepatitis. They can invade the central nervous system and induce meningitis, encephalitis, or acute flaccid paralysis. They also cause systemic neonatal disease and chronic infections such as type 1 diabetes and chronic myocarditis. This pantropic character of CVB can be determinate by specific virus – receptor interaction, which initiate the infection and viral spread. CVB attach at least two receptor proteins: the coxsackievirus – adenovirus receptor (CAR) and the decay – accelerating factor (DAF). Moreover, other anonymous determinant may play a role in tissue permissiveness and disease severity. This article summarizes the main aspects of Coxsackieviruses B infection: replication, virus-receptor interaction, genetic variability, pathogenesis, epidemiology and diagnostics.

1. Introduction. 2. Classification and structure. 3. Cellular receptors and replication. 3. Genetic variability. 4. Course of infection. 5. Pathogenesis. 6. Epidemiology. 7. Diagnosis and therapeutic possibility. 8. Summary

Słowa kluczowe: enterowirusy, pantropizm, wirusy Coxsackie B

Keywords: enteroviruses, pantropism, Coxsackieviruses B

1. Rys historyczny

Historia wirusów Coxsackie (CV) rozpoczyna się w latach 40. XX wieku, w Stanach Zjednoczonych Ameryki objętych epidemią *poliomyelitis*. Latem 1947 roku w stanie Nowy Jork miało miejsce kilka ognisk zachorowań, które badał Gilbert Dalldorf, dyrektor labora-

torium w Albany. Był on zafascynowany ideą zastosowania osesków mysich do izolacji wirusa polio jako alternatywnego modelu zwierzęcego, zamiast małp, które dla każdego laboratorium stanowiły bardzo kosztowny wydatek. Dalldorf i współpracująca z nim Sickles użyli kału od dwójki dzieci podejrzanych o zakażenie wirusem polio. Zawiesinę kałową podali

* Autor korespondencyjny: Magdalena Wiczorek, Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel.: (0-22) 542 12 30; e-mail: mrechnio@pzh.gov.pl

© 2023 Beata Gad & Magdalena Wiczorek

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

dorosłym i nowonarodzonym myszom, tylko u osesków rozwinął się paraliż związany z rozległymi zmianami w mięśniach szkieletowych. Ich dalsze badania z użyciem surowic wykazały jednak, że przyczyną paraliżu nie były wirusy polio. W 1949 roku Dalldorf zaproponował, aby nowe wirusy nazwać Coxsackie, od małej wioski nad rzeką Hudson, z której pochodziły pierwsze rozpoznane przypadki zachorowań, wywołane przez te nowoodkryte patogeny [21, 22].

Dalsze badania na oseskach mysich skłoniły Dalldofra do podziału wirusów Coxsackie na dwie grupy A i B. Izolaty należące do grupy A (CVA) wywoływały zmiany w mięśniach szkieletowych nowonarodzonych myszy prowadzące do śmiertelnego paraliżu w ciągu 2 dni od zakażenia. Natomiast te należące do grupy B (CVB) powodowały zajęcie wielu organów i tkanek, a ostatecznie powolną śmierć w następstwie porażenia spastycznego (5–7 dni). Dodatkowo badacze obserwowali ogniskowe zapalenie mięśni i zmiany w komórkach trzustki, serca, hepatocytach, w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) oraz w nadnerczach zakażonych myszy. W latach 50. XX wieku zastosowano surowice do identyfikacji serotypów wirusów Coxsackie. Wkrótce rozpoznano, że CVB są czynnikiem etiologicznym np. pleurodynii, zwanej także diabelskim uściskiem lub chorobą bornholmską. Wirusy z grupy A powiązano z herpanginą, ciężkim zapaleniem gardła i chorobą dłoni, stóp i jamy ustnej (HFMD) [21].

Częste zakażenia laboratoryjne, charakteryzujące się ciężkim przebiegiem powodowały, że wielu naukowców rezygnowało z badań nad tą grupą wirusów. Dopiero rozwój technik biologii molekularnej pozwolił na bardziej dogłębne poznanie natury CV oraz stworzenie nowej klasyfikacji, opartej na pokrewieństwie filogenetycznym [21].

2. Klasyfikacja i budowa

Wirusy Coxsackie B należą do rodziny *Picornaviridae*. To jedna z największych rodzin w systematyce wirusów. W jej skład wchodzi 63 rodzaje, a osiem z nich jest zdolnych do zakażenia człowieka: *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Kobuvirus*, *Salivirus*, *Cardiovirus*, *Rosavirus* oraz *Cosavirus*. Wirusy Coxsackie B podobnie jak rinowirusy, wirusy polio oraz wirusy ECHO, wchodzi w skład rodzaju *Enterovirus* (EV), który zgodnie z kryteriami Międzynarodowego Komitetu Taksonomii Wirusów (ICTV) został podzielony na poszczególne gatunki i typy. CVB zostały sklasyfikowane jako gatunek B ludzkich enterowirusów (HEV-B). Do tej pory wyodrębnionych zostało sześć typów wirusów Coxsackie B tj. od CVB1 do CVB6 [85].

Wirusy Coxsackie B, podobnie jak inni przedstawiciele rodziny *Picornaviridae*, są to małe (około 30 nm),

bezosłonkowe wirusy o ikosaedralnym kształcie kapsydu. Materiałem genetycznym jest liniowa cząsteczka kwasu rybonukleinowego o dodatniej polarności ((+)ssRNA). Genom CVB zbudowany jest z około 7400 nukleotydów i posiada pojedynczą otwartą ramkę odczytu (ORF). ORF podzielona jest na trzy regiony P1, P2, P3. Region P1 koduje białka strukturalne kapsydu: VP1, VP2, VP3, VP4, natomiast P2 i P3 białka niestruturalne: 2A^{pro}, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C^{pro}, 3D^{pol} [8, 47, 50]. Na końcach genomowego RNA znajdują się regiony, które nie ulegają translacji (NTR). Do końca 5' jest kowalencyjnie przyłączone białko VPg, natomiast na końcu 3' znajduje się fragment poliadenylowy – poli(A). Ponadto, w regionie 5'NTR zlokalizowane są dwie jednostki funkcjonalne: struktura liścia koniuczyny CL oraz wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu typu I (IRES) [26, 47, 50, 82].

Kapsyd CVB tworzy 60 protomerów, zbudowanych z trzech białek powierzchniowych VP1, VP2 i VP3 oraz białka wewnętrznego VP4. W powierzchni każdej trójkątnej ściany utworzonej przez stykające się ze sobą monomery występuje zagłębienie (około 2 nm) nazywane kanionem, które bierze udział w wiązaniu wirusa do receptorów komórkowych gospodarza. Specyficzna budowa kanionu sprawia, że jest on mało dostępny dla przeciwciał, a jednocześnie jego struktura wpływa na stabilność cząsteczki wirusowej. Białka powierzchniowe kapsydu są także antygenami stymulującymi odpowiedź swoistych przeciwciał neutralizujących, jednym z najbardziej immunogennych jest VP1 [9].

Kapsyd wirusów Coxsackie B pozbawiony jest osłonki, co decyduje o jego większej stabilności w organizmie gospodarza oraz w środowisku. W temperaturze otoczenia CVB są niewrażliwe na rozpuszczalniki lipidowe (np. eter, chloroform, aceton) oraz stabilne w niejonowych detergentach. Ponadto wykazują oporność na powszechnie stosowane środki dezynfekujące, w tym 70% etanol i izopropanol. Charakteryzuje je stabilność w szerokim zakresie pH (3–9), po ekspozycji na pH ≤ 3.0 nadal zachowują zakaźność. Dodatkowo są w stanie przetrwać, nawet do kilku tygodni w wodzie i ściekach. Wirion CVB zostaje inaktywowany w temperaturze powyżej 56°C oraz poprzez ekspozycję na promieniowanie ultrafioletowe (UV), podchloryn sodu, formaldehyd, aldehyd glutarowy [72].

3. Receptory komórkowe i replikacja

Cykl replikacyjny CVB można podzielić na kilka etapów: wiązanie wirusa z komórką docelową, wnikanie materiału genetycznego wirusa do cytoplazmy, translacja i replikacja materiału genetycznego, składanie i uwalnianie potomnych cząsteczek wirusa. Translacja, replikacja oraz składanie zachodzą na terenie cyto-

plazmy komórki gospodarza, a złożone formy wirionu uwalniane są w wyniku lizy komórki. Proces namnażania wirusów Coxsackie B nie został jeszcze w pełni poznany, większość dostępnych informacji dotyczy ogólnego modelu replikacji enterowirusów, głównie opartego na badaniach nad wirusem polio [8, 26, 30, 48].

Pierwszym etapem procesu namnażania jest połączenie się wirusa z powierzchnią wrażliwej komórki, a następnie wniknięcie do jej wnętrza. Wiązanie cząsteczki wirusowej do komórki następuje w wyniku oddziaływania pomiędzy białkami powierzchniowymi wirionu, a receptorami na komórce docelowej. Możliwość wiązania ze specyficznymi receptorami wyznacza zakres gospodarza i tropizm tkankowy danego wirusa [3, 47].

Wszystkie typy CVB wiążą się ze specyficznym receptorem dla wirusów Coxsackie i adenowirusów (CAR). CAR to transbłonowa glikoproteina o masie 46 kDa, która należy do nadrodziny immunoglobulin [62] i rodziny łącznikowych cząsteczek adhezyjnych (JAM) [46]. Zbudowana jest z dwóch zewnątrzkomórkowych domen immunoglobulinowych D1 i D2, regionu transbłonowego TMD i wewnętrznego fragmentu cytoplazmatycznego ICD [62, 81]. W procesie wiązania i wnikania materiału genetycznego wirusa bierze udział koniec aminowy domeny D1 [47, 62]. CAR ekspresowany jest głównie na komórkach epitelialnych, w kluczowych organach: mózgu, sercu, płucach, wątrobie, jądrach, trzustce oraz nerkach [81]. Szczególnie silnej ekspresji ulega w rozwijającym się centralnym układzie nerwowym [14, 53]. Jako molekula adhezyjna odgrywa istotną rolę w regulacji takich procesów jak wzrost, różnicowanie się i migracja komórek, należy zaznaczyć jej szczególną rolę w rozwoju mózgu i serca [67].

CVB1, CVB3 i CVB5 dodatkowo wiążą się z czynnikiem przyspieszającym rozkład (DAF, CD55) białkiem o masie 70 kDa, które występuje na powierzchni większości komórek. DAF jest jednym z ważniejszych czynników regulujących aktywność dopełniacza [58]. Jego zewnątrzkomórkowy region zbudowanym jest z czterech 60 aminokwasowych fragmentów SCR, również nazywanych domenami kontrolującymi dopełniacz (CCP) [58]. Nie wszystkie szczepy w ramach serotypu oddziałują z DAF, kolejne pasażę wirusa w hodowlach komórkowych mogą pomóc wyselekcjonować warianty, które posiadają taką zdolność [11]. Jednak uważa się, że samo wiązanie się wirusa do DAF nie jest wystarczające do wniknięcia i litycznego zakażenia komórki [19, 62]. Dodatkowo wymagana jest interakcja z CAR lub innym receptorem, dlatego DAF uznawany jest za koreceptor jedynie ułatwiający proces zakażenia komórek [62].

Opisywane są także alternatywne receptory komórkowe wykorzystywane przez niektóre warianty CVB. Mutant szczepu referencyjnego Nancy CVB3, charakteryzujący się zwiększoną wirulencją, jako recep-

tor wykorzystuje glikozaminoglikan na powierzchni komórki, a dokładniej powtarzające się jednostki siarczanu heparyny [84].

Receptorem specyficznym dla wielu różnych wirusów są integryny, białka transbłonowe biorące udział w regulacji funkcji komórki związanych z adhezją, agregacją i migracją. CVB1 łączy się z integryną $\alpha v\beta 6$. Zaobserwowano, że ekspresja tej integryny wpływa na bardziej wydajną replikację wirusa w linii ludzkich komórek epitelialnych wyprowadzonych z nowotworu jelita grubego [3].

Kolejnym białkiem, które może pełnić rolę receptora dla CVB jest nukleolina, wielofunkcyjna fosfoproteina głównie zlokalizowana w jąderku, ale także występująca na powierzchni komórki. Wszystkie typy CVB są zdolne do wiązania nukleoliny w przeciwieństwie do wirusa polio, który takiej właściwości nie posiada.

Miejscem wiązania się receptora komórkowego z wirusem są reszty aminokwasowe umieszczone na dnie kanionu [47, 64]. W wyniku oddziaływania receptora z głębszymi warstwami kanionu, dochodzi do usunięcia reszty lipidowej z kieszonki białka VP1. Powoduje to destabilizację i rozluźnienie struktury cząsteczki wirusa, otwarcie kanału, przemieszczenie się na zewnątrz części aminowej VP1 i uwolnienie VP4. W błonie komórkowej zostają utworzone pory, przez które (+)ssRNA transportowany jest do cytoplazmy [69]. Mechanizm wprowadzenia genomu CVB do wnętrza komórki nie jest do końca poznany. Jedną z teorii zakłada, iż proces zachodzi na drodze endocytozy zależnej od kaweolin [32], a druga, że przez makropinocytózę [20, 52]. Endocytoza zależna od kaweolin polega na utworzeniu wpuklenia, które od strony cytoplazmy stabilizuje niskocząsteczkowe białko – kaweolina, a następnie tworzy się pęcherzyk, który jest transportowany w okolicy siateczki śródplazmatycznej (ER) lub aparatu Golgiego [32]. Na drodze makropinocytozy, wiązanie CVB z receptorem prowadzi do polimeryzacji aktyny oraz silnego sfałdowania błony komórkowej i utworzenia dużych pęcherzyków – makropinosomów [52]. Istnieją także doniesienia o internalizacji CVB3 na drodze endocytozy zależnej od klatryn [19]. W tym typie endocytozy w powstawaniu pęcherzyków bierze udział białko klatryna, która ulega nagromadzeniu w cytoplazmie w odpowiedzi na połączenie receptor-ligand [19]. Następnie utworzony endosom jest transportowany wzdłuż mikrotubul do aparatu Golgiego [32]. Ostatecznie kwas nukleinowy wirusa zostaje uwolniony do cytoplazmy komórki gospodarza [8, 69].

Kolejnym etapem cyklu replikacyjnego jest synteza białek wirusowych. Genom CVB, ze względu na taką samą polarność jak informacyjny RNA (mRNA) stanowi bezpośrednią matrycę w procesie translacji [82]. Podobnie jak komórkowy mRNA zakończony jest ogonkiem poli(A), natomiast nie posiada czapeczki kap,

która poza zabezpieczaniem transkryptu przed degradacją pełni kluczową rolę w inicjacji translacji [47]. Materiał genetyczny wirusa wiąże się z rybosomem za pośrednictwem IRES, który imitując kap rekrutuje czynniki inicjujące, ulegając kap-niezależnej translacji [26, 47, 50, 82]. Produktem jest poliproteina o autokatalitycznych właściwościach, która podlega obróbce proteolitycznej przez wirusowe proteazy: 2A i 3C/3CD (2A^{pro} i 3C^{pro}/3CD^{pro}) [30, 50, 82]. Na początkowym etapie 2A^{pro} dokonuje cięcia w układzie *in cis* wiązania Tyr-Gly na swoim własnym końcu aminowym, w wyniku którego od poliproteiny zostaje oddzielony prekursor P1, kodujący wszystkie białka kapsydowe. Dalsze etapy obróbki potranslacyjnej obejmują cięcia w układzie *in cis* i *in trans* z udziałem 3C^{pro}/3CD^{pro} [50], co prowadzi do utworzenia białek strukturalnych VP0, VP1, VP3 oraz niestukturalnych: 2A^{pro}, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C^{pro}, 3D^{pol} [47, 69, 82].

Proteazy wirusowe działają także na transkrypcje i translacje zachodzące w komórce, hamując w ten sposób syntezę białek gospodarza. Proteaza 2A tnie czynniki inicjujące translację eIF4G, DAP5 oraz białko wiążące poli(A) (PABP). 3C^{pro} unieczynnia czynnik transkrypcyjny TFIIC [10, 47, 59].

W procesie obróbki poliproteiny, obok ostatecznych produktów proteolizy powstają formy pośrednie (2BC, 3AB, 3CD), które odgrywają znaczącą rolę w replikacji CVB [82]. Białko 2BC (prekursor białek 2B i 2C) łączy się z błonami, wpływając na ich przepuszczalność, a tym samym na homeostazę w komórce oraz bierze udział w tworzeniu struktur replikacyjnych RO [8, 67]. 3AB kotwicy kompleks replikacyjny, jednocześnie podnosi aktywność RNA-zależnej polimerazy RNA (RdRp), ponadto stymuluje proteazę 3CD [30, 47]. 3CD łącząc się jednocześnie z końcem 5' i 3' powoduje cyrkulizację genomu, wraz z innymi białkami tworzy kompleks replikacyjny [47]. W cyklu replikacyjnym wirusa dojrzałe białka niestukturalne pełnią wiele różnych funkcji, najważniejsze z nich przedstawia Tabela I.

Na terenie cytoplazmy komórki gospodarza, równolegle z syntezą białek, zachodzi proces powielania materiału genetycznego CVB [47]. Synteza RNA zachodzi

w kompleksach replikacyjnych utworzonych z białek niestukturalnych wirusa oraz przegrupowanych błon ER i/lub błon aparatu Golgiego [8, 47]. W tworzenie kompleksów replikacyjnych zaangażowane są także czynniki gospodarza, do których należą kinaza fosfotyloinozytolu typu III (PI4KIIIβ) [77] oraz białko wiążące oksysterol (OSBP) [4]. Udział organelli komórkowych w tworzeniu kompleksów replikacyjnych wynika z aktywności białka 2B i wiąże się z zaburzeniem homeostazy jonowej (uwalnianie jonów Ca²⁺ z ER i aparatu Golgiego). W replikację zaangażowane są wszystkie białka niestukturalne wirusa, a najważniejszą funkcję pełni RdRp [10]. Polimeraza wirusowa posiada dwa typy aktywności katalitycznej, katalizuje syntezę komplementarnej nici na matrycy RNA oraz dokonuje addycji reszt urydyny do białka VPg [10]. Proces urydylacji zachodzi na matrycy poli(A), a czynnikiem stymulującym jest struktura spinki do włosów (*cre*), zlokalizowana w sekwencji kodującej białko 2C [26]. Urydylowane VPg (VPg-pU(pU)) jest dla RdRp specyficznym białkowym starterem syntezy nici zarówno o dodatniej jak i ujemnej polarności [26, 82]. W pierwszej kolejności następuje synteza ujemnej nici RNA, komplementarnej do RNA genomowego [10, 26, 30]. Proces ten wymaga nieuszkodzonej struktury CL na końcu 5'NTR [26] i prowadzi do utworzenia dwuniciowych, pośrednich form replikacyjnych RF (dsRNA) [10, 82]. Nici ujemna RNA staje się nicią matrycową, na której powstają liczne kopie genomowego RNA [10, 30]. Nowosyntetyzowane cząsteczki RNA mogą ulegać translacji, stanowić matrycę do syntezy nici ujemnej RNA, a część z nich staje się genomami potomnych wirionów [26]. Wirus kontroluje syntezę RNA w taki sposób, aby zostało utworzonych około 50 razy więcej nici dodatnich RNA niż ujemnych [26]. RNA wirusowe o ujemnej polarności występuje wyłącznie w postaci dwuniciowej RF, lub jako produkty pośrednie replikacji (RI) [10, 26, 82]. Sekwencja poli (A) na końcu 3' nici dodatniej jest syntezowana przez transkrypcję sekwencji poli (U) na końcu 5' nici ujemnej [51].

Kompletny wirion powstaje poprzez połączenie materiału genetycznego i białek strukturalnych wirusa [8]. Proces składania rozpoczyna się, gdy białko prekursorowe P1 ulega cięciu przez 3CD^{pro}, następnie tworzy się protomer złożony z białek VP0, VP1 i VP3 [50]. W kolejnym kroku pięć takich protomerów łączy się razem i formuje pentamer [9]. W ostatnim etapie składania połączone 12 pentamerów buduje prokapsyd. Nowo zsintetyzowana nici (+)ssRNA ulega enkapsydacji w obrębie prokapsydu, tworząc prowirion [9]. Proces ten jest na tyle wyspecjalizowany, że do kapsydu następuje pakowanie tylko nici RNA o dodatniej polarności [30]. Na wydajność procesu składania prawdopodobnie wpływa glutation lub proces od niego zależny [27, 73]. W trakcie enkapsydacji VP0 ulega cięciu do

Tabela I
Funkcje białek niestukturalnych wirusów Coxsackie B

Białko	Funkcja
2A	proteaza cysteinowa
2B	wiroporyna
2C	NTPaza
3A	białko wiążące błonę
3B	białko VPg
3C	proteaza cysteinowa
3D	RNA-zależna polimeraza RNA (RdRp)

VP2 i VP4 [9]. Proces ten nosi nazwę cięcia dojrzewającego i zamyka genom wirusa w stabilnym i dojrziałym wirionie [9]. Tworzy się uporządkowana sieć końców aminowych białek kapsydu, która stabilizuje cząsteczki wirusowe oraz daje im zdolność do zakażenia [9]. Wiriony uwalniane są przez lisę komórki [30], aczkolwiek istnieją badania *in vitro* wskazujące także na przetrwanie i niecytotoxiczne zakażenia wywołane przez niektóre z CVB3 [64], CVB4 [29] i CVB5 [6].

4. Zmienność genetyczna

Wirusy Coxsackie B, podobnie jak inne RNA wirusy, charakteryzują się bardzo dużą zmiennością genetyczną, a co za tym idzie wysokim tempem ewolucji. Niestabilność genetyczna enterowirusów, w trakcie krótkiego cyklu replikacyjnego, daje możliwość tworzenia mutantów o nowych cechach i właściwościach. W zakażonym organizmie występują one jako heterogenna populacja, złożona z różnych wariantów molekularnych (tzw. pseudotypów) określanymi jako *quasi-species*. Zmieniające się warunki środowiska faworyzują najlepiej dostosowane mutanty, przez co populacja ta wykazuje dużą dynamikę. Presja selekcyjna na różnych etapach zakażenia cały czas sprzyja powstawaniu nowych wariantów genetycznych wirusa, o zmienionym tropizmie komórkowym czy zwiększonej wirulencji. Głównym źródłem zmienności CVB są mutacje oraz rekombinacje [30, 54, 60, 67].

Mutacje, czyli błędy powstające na skutek nieprecyzyjnej replikacji RNA, można podzielić na: mutacje punktowe (zmiana pojedynczej zasady), insercje (wstawienie przynajmniej jednego dodatkowego nukleotydu) i delecje (utrata od jednego do kilku nukleotydów). Wynikają one z właściwości wirusowej RdRp, która nie posiada zdolności naprawy błędów powstałych podczas syntezy potomnych nici RNA. Związane jest to z brakiem domeny 3'-5' egzonukleazy o właściwościach korektorskich [30]. U wirusów Coxsackie B częstość powstawania mutacji szacuje się na 10^{-4} do 10^{-5} substytucji na nukleotyd [30, 66]. Mutacje zachodzą w każdym miejscu genu, ale najbardziej zmienne są obszary kodujące białka strukturalne kapsydu. Liczne błędy polimerazy mogą prowadzić do eliminacji wariantów wirusów o niskiej zdolności adaptacyjnej (selekcja negatywna) [30]. Przeciwnie, w populacji wirusów utrwalane są takie zmiany, które prowadzą do zwiększenia wirulencji oraz dostosowania się do zmieniającego środowiska (selekcja pozytywna) [45]. Przykładowo pojedyncze mutacje w genie kodującym białko VP1 mogą spowodować atenuację szczepów CVB3 kardiowirulentnych dla myszy [23]. Błędy powstałe w czasie syntezy nici potomnych wpływają również na cykl replikacyjny wirusa. Insercje i delecje nukleotydów w regionie 5'NTR zabu-

rzają proces translacji [67]. Na wydajność syntezy RNA mają wpływ zmiany utrwalone w 3'NTR [51], natomiast na częstość tworzenia rekombinantów mutacje w regionie kodującym RdRp [54].

Obok mutacji, drugim szeroko rozpowszechnionym mechanizmem determinującym zmienność CVB jest rekombinacja (rearanżacja) [18, 60]. Proces ten, w obrębie enterowirusów, szczegółowo został opisany dla wirusa polio i w podobny sposób zachodzi u CVB [54]. Warunkiem rekombinacji jest występowanie w zakażonej komórce dwóch typów wirusa, a jej wynikiem jest powstanie genomów o innej konformacji niż w wirusach rodzicielskich [45, 60]. Ze względu na homologię nici rekombinujących można ją podzielić na: homologiczną (ogólną) oraz niehomologiczną (umiejscowioną) [24, 54, 60]. Możliwe są dwa typy mechanizmów rekombinacji CVB: replikacyjny „zmiany matrycy” oraz niereplikacyjny „pęknięcia nici i ponownego przyłączenia” [24, 45]. Ponadto, rekombinacja w zależności od pochodzenia nici rodzicielskich może być: intratypowa (zachodzi w obrębie jednego typu) [45, 49, 60, 66] oraz intertypowa (zachodzi pomiędzy różnymi typami tego samego gatunku) [44, 45, 66]. Jak dotąd, na podstawie analiz filogenetycznych, nie identyfikowano zdarzeń rekombinacyjnych w regionie kodującym genomu CVB poza gatunkiem HEV-B [45]. Nie obserwowano także rekombinacji pomiędzy typami zakażającymi człowieka i zakażającymi zwierzęta. Wyjątek stanowi wirus choroby pęcherzykowej świń (SVDV), który wykazuje 80% homologii z CVB5.

Dane literaturowe wskazują, iż reanżacja materiału genetycznego u wirusów Coxsackie B najczęściej: jest typu homologicznego, przebiega według mechanizmu replikacyjnego „zmiany matrycy”, jest intertypowa, występuje w regionach kodujących białka niestrukturalne, powstaje w miejscach genomu wirusa o stabilnej strukturze drugorzędowej (m.in. po zreplikowaniu dwóch nukleotydów UU) [54].

5. Przebieg zakażenia

Wirusy Coxsackie B dostają się do organizmu człowieka drogą pokarmową (fekalno-oralną) i kropelkową [34, 53, 67]. Pierwotnym miejscem replikacji są błony śluzowe jamy nosowo-gardłowej i jelita cienkiego [21]. Wirus przedostając się do jelita narażony jest na niskie pH w żołądku, działanie proteaz, żółci oraz innych enzymów wydzielanych do światła układu pokarmowego [21]. Kolejną barierę stanowi nabłonek błony śluzowej jelit, a dokładniej śluz pokrywający powierzchnię kosmków oraz połączenia zamykające (TZ) w części szczytowej komórek nabłonka jelit [46]. Połączenia zamykające tworzą wodoodporne uszczelnienia między komórkami, w tych miejscach

komórki są ściśle do siebie przyłączone głównie przez białka zwane kładynami [20, 46], ale w procesie tym biorą udział także molekuly adhezyjne typu JAM [46] np. CAR, będący receptorem dla CVB [20, 67]. Poza TJ, CAR nie jest ekspresowany na szczytowych częściach komórek nabłonka jelit, w przeciwieństwie do DAF, którego ekspresja jest obficie wyrażona. Jednak związanie z DAF nie jest warunkiem wystarczającym do zakażenia komórki, dlatego uważa się, że proces przekraczania bariery śluzówkowej następuje w TJ [20]. Na modelu wirusa polio wykazano, że enterowirusy mogą wykorzystywać komórki M, jako wrota zakażenia. Miejscem replikacji są kępkki Peyera oraz migdałki, w przypadku zakażeń górnych dróg oddechowych [63]. Następnie dochodzi do zasiedlenia okolicznych węzłów chłonnych, zależnie od miejsca replikacji szyjnych lub krezkowych [54]. Wirus przedostaje się do krwioobiegu wywołując pierwotną wiremę, ta faza zakażenia jest najczęściej bezobjawowa i zwykle zostaje zahamowana pod wpływem wrodzonej, a następnie nabytej odpowiedzi immunologicznej [15, 54]. Jednak w niewielkim odsetku przypadków wirus rozprzestrzenia się po organizmie, przedostając się do centralnego układu nerwowego, wątroby, płuc czy serca [15, 41, 54]. Temu etapowi zakażenia towarzyszy wtórna wiremia, charakteryzująca się wysokim mianem wirusa. CVB wykazują powinowactwo do wielu tkanek i narządów takich jak mózg, rdzeń kręgowy, serce, trzustka, skóra, płuca, wątroba [59, 81]. Do często zakażanych komórek należą: neurony [28], kardiomiocyty [43] oraz komórki β wysp trzustkowych [37, 55]. Jednak pierwotnym miejscem replikacji CVB są błony śluzowe jelit i jamy nosowo-gardłowej [15, 21, 53]. To skonkretyzowane umiejscowienie zakażenia w organizmie człowieka wiąże się ze sposobem rozprzestrzeniania się wirusa w populacji [7]. Niezależnie od przebiegu zakażenia (bezobjawowe, skąpo-objawowe, pełnoobjawowe) wirus intensywnie namnaża się w śluzówkach osiągając wysokie miano w wydzielinach [21, 34]. Liczbę cząstek zakaźnych enterowirusów szacuje się na 10^6 – 10^7 w 1 gramie kału osoby zakażonej. Długi czas wydalania wirusa sprzyja powszechnemu rozprzestrzenieniu. Wynosi on przeciętnie 2–4 tygodnie [15], ale może być dłuższy niż 11 tygodni, a u osób z niedoborami immunologicznymi może trwać latami. Wśród osób zakażonych wirusem polio znane są przypadki wydalania wirusa po zakażeniu od 10 miesięcy do 28 lat [53].

6. Patogeneza

Zakażenia CVB, nawet w 90% przypadków, mają charakter bezobjawowy lub skąpo-objawowy [15]. Od 2 do 10 dni po przedostaniu się wirusa do organizmu dochodzi do rozwoju choroby gorączkowej o charak-

terze samoograniczającym się, która trwa 3–4 dni [15, 41, 57]. Do najczęstszych objawów należą: gorączka, bóle głowy, brzucha, gardła, mięśni, złe samopoczucie, niekiedy nudności i wymioty [21, 35, 59]. W rzadkich przypadkach dochodzi do zajęcia jednego lub kilku organów poza miejscem pierwotnej replikacji [35]. Przebieg zakażenia może zależeć od wieku, płci i statusu immunologicznego. Szczególnie narażone na wystąpienie ciężkich postaci klinicznych oraz długotrwałych powikłań są osoby z obniżoną odpornością [15] oraz noworodki [2, 41] i niemowlęta [41].

Wirusy Coxsackie B charakteryzują się pantropizmem, czyli powinowactwem do wielu narządów i tkanek [41, 52]. Ta właściwość powoduje, że są czynnikiem etiologicznym szerokiego wachlarza chorób [2]. Poszczególne typy CVB mogą wywoływać różne choroby, a te same choroby mogą być wywoływane przez różne typy [41]. CVB zakaża większość układów narządowych w organizmie człowieka:

- centralny układ nerwowy: zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (zomr), zapalenie mózgu, ostre porażenie wiotkie (AFP);
- układ pokarmowy: zapalenie trzustki, zapalenie wątroby, nieżyt żołądkowo-jelitowy, herpangina;
- układ oddechowy: zapalenie górnych i dolnych dróg oddechowych, w tym zapalenie płuc;
- układ sercowo-naczyniowy: zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie osierdzia;
- skóra: choroba dłoni, stóp i jamy ustnej (HFMD), choroby wysypkowe;
- mięśnie: pleurodynia (nagminne zapalenie mięśni, choroba bornholmska).

Do najcięższych w przebiegu zalicza się zachorowania u noworodków w pierwszym tygodniu życia, związane z transmisją wirusa przez łożysko. Choroba przypomina posocznicę bakteryjną i może być powikłana zapaleniem mięśnia sercowego, piorunującym zapaleniem wątroby, rozsianym wykrzepianiem wewnątrz-naczyniowym, zomr, zapaleniem opon i mózgu oraz zapaleniem płuc [2, 12, 41, 49, 57].

CVB uważa się za czynnik etiologiczny chorób przewlekłych, niekiedy o podłożu autoimmunologicznym m.in. kardiomiopatii, przewlekłego zaciskającego zapalenia osierdzia, cukrzycy typu 1, miastenii, pierwotnego zespołu Sjögrena, zespołu chronicznego zmęczenia, przewlekłego kłębuszkowego zapalenia i niewydolności nerek, choroby Stilla czy reumatoidalnego zapalenia stawów [7, 16, 35, 37, 43, 56, 65, 67, 70, 71, 74].

Wirusy Coxsackie B, podobnie jak inne enterowirusy, wywołują aseptyczne zapalenie opon-mózgowo-rdzeniowych, które należy do częstych zakażeń OUN [25, 63]. Diagnozowane jest ono w każdej grupie wiekowej (u noworodków, niemowląt, dzieci i dorosłych) [2, 41, 53, 63], przy czym najczęściej chorują noworodki [28]. Zakażenie manifestuje się typowymi obja-

wami klinicznymi dla zapalenia opon (sztywność karku) oraz bólem głowy, gorączką, wymiotami [63, 75]. Symptomy te zwykle ustępują bez następstw neurologicznych [41, 75]. Inaczej jest w przypadku zapalenia mózgu, które występuje znacznie rzadziej, ale związane jest z ciężkim przebiegiem (zajęcie mięszu mózgu i rdzenia kręgowego) [53, 63] oraz powikłaniami m.in. miastenią, która manifestuje się zaburzeniami nerwowo-mięśniowymi [71].

CVB wykazują także szczególne powinowactwo do ludzkich kardiomiocytów, przez co stanowią główną przyczynę wirusowego zapalenia mięśnia sercowego (MC) [7, 23, 30, 65]. MC dotyczy przeważnie noworodków, niemowląt oraz osób w wieku 20–40 lat [44, 53]. W kardiologii schorzenie to jest jednym z najtrudniejszych do zdiagnozowania [59]. Na początkowym etapie może przebiegać zupełnie bezobjawowo [67], następnie pojawia się gorączka, duszność, skrócenie oddechu, ostry ból w klatce piersiowej, a nawet zaburzenie rytmu serca [7, 44, 65]. Zakażenie prowadzi do reakcji zapalnej, w wyniku której mogą zostać bezpośrednio uszkodzone tkanki i komórki mięśnia sercowego [30, 65]. Wykazano, że patologiczne zmiany zachodzące w mięśniu sercowym związane są z działaniem wirusowej proteazy 2A, która tnie dystrofinę, białko łączące szkielet aktynowy z kompleksem białek błonowych (DAP) [43, 47]. Dystrofina stabilizuje błonę komórkową oraz wpływa na jej przepuszczalność, potwierdzono, że rozwój zakażenia CVB jest skorelowany z obniżeniem poziomu tego właśnie białka w komórkach serca [43]. Zwiększenie przepuszczalności błony, związane z cięciem dystrofiny przez 2A^{pro}, może odgrywać rolę w uwalnianiu wirusa z kardiomiocytu [43]. W wyniku namnażania się wirusa w komórkach mięśnia sercowego uruchomiona zostaje nieswoista odpowiedź immunologiczna [43]. Wydzielane zostają cytokiny prozapalne, w tym interferon typu gamma (IFN- γ) [65], który z kolei warunkuje wytwarzanie tlenku azotu (NO) [83]. Na modelach zwierzęcych wykazano, że ciągła ekspozycja komórek na wysokie stężenie NO ma działanie cytotoksyczne prowadzące do uszkodzeń [83]. Komórki prezentujące antygen fagocytują uwolnione cząsteczki wirusa i białka serca, co prowadzi do rozwoju odpowiedzi swoistej skierowanej przeciwko własnym białkom, tworzą się autoprzeciwciała sercowe mogące prowadzić do znacznych uszkodzeń serca [65]. Zapalenie mięśnia sercowego u dorosłych osób może przebiegać bez komplikacji, a gdy wirus zostanie wyeliminowany pacjenci samoistnie zdrowieją [53]. Niemniej zdarzają się przypadki zachorowań, w których konieczne jest wykonanie przeszczepu serca [21, 35]. Do możliwych powikłań zakażeń serca o etiologii CVB należy kardiomiopatia rozstrzeniowa, która rozwija się w trakcie procesu naprawczego po eliminacji wirusa z mięśnia sercowego [7, 59, 65, 67].

Już w latach 50. XX wieku Dalldorf opisywał tropizm CVB do trzustki w eksperymencie na ośeskach mysich. U ludzi, zapalenie trzustki o podłożu CVB, po raz pierwszy zostało opisane w 1958 roku u noworodka z posocznicą. Liczne badania wykazały, że wirusy te stanowią czynnik etiologiczny ostrego, nawracającego lub przewlekłego zapalenia trzustki oraz cukrzycy typu 1 [17, 56]. Choroby trzustki są szczególnie niebezpieczne u dzieci, ponieważ wiążą się ciężkim przebiegiem, a nawet śmiercią [37]. Do symptomów schorzenia należą m.in. silny ból brzucha promieniujący do pleców, nudności, wymioty oraz podwyższony poziom enzymów trzustkowych w surowicy (lipazy i amylazy) [17]. Zapalenie trzustki prowadzi do uszkodzenia komórek zewnątrzwydzielniczych i wynika z błędnej aktywacji enzymów trawiennych narządu [80]. Zakażenie trzustki przeważnie ulega samoograniczeniu, lecz w 10–15% przypadków prowadzi do niewydolności wielonarządowej [17, 80]. CVB mogą przetrwale zakażać komórki β trzustki, czyli komórki, które wytwarzają insulinę [56]. Wykazują one silną ekspresję CAR, który w przypadku tych komórek, jest głównie zlokalizowany w błonach pęcherzyków wydzielniczych [38, 55]. W następstwie zakażenia zostaje zakłócone prawidłowe funkcjonowanie komórek β lub ich trwałe uszkodzenie, co może prowadzić do rozwoju cukrzycy typu 1 [37, 70]. Dodatkowym czynnikiem rozwoju choroby jest aktywacja, pod wpływem zakażenia, produkcji autoprzeciwciał skierowanych przeciwko insulinie (IAA) lub dekarboksylazie kwasu glutaminowego [55, 56]. Dokładny mechanizm rozwoju cukrzycy pod wpływem zakażenia nie został jeszcze w pełni poznany [37, 70].

Po przeniknięciu przez łożysko CVB mogą uszkadzać zarówno zarodek jak i płód, powodując poronienia albo prowadzić do wystąpienia poważnych wad rozwojowych, najczęściej są to wady serca [28, 57, 67]. Zaobserwowano także dużą korelację między serokonwersją matki w czasie ciąży, a rozwojem cukrzycy u dziecka [57]. Szczególnie narażone na ciężkie choroby oraz długotrwałe powikłania są noworodki i niemowlęta, u których doszło do transmisji CVB przez łożysko pod koniec trwania ciąży lub w trakcie porodu [12, 25, 57]. Dlatego też kobiety ciężarne powinny unikać kontaktu z osobami chorymi, a w momencie podejrzenia zakażenia korzystne jest przedłużanie ciąży, dające szansę płodowi na nabycie przeciwciał neutralizujących od matki [2, 53]. U dzieci poniżej pierwszego roku życia antygeny CVB identyfikowane są w różnych typach komórek: neuronach, kardiomiocytach, hepatocytach, komórkach kanalików nerkowych, komórkach β wysp trzustkowych, komórkach nadnerczy, komórkach nabłonka pęcherzyków płuc, pęcherzykowych komórkach dendrytycznych śledziony [12, 14, 53]. Zakażenie wrodzone często przyjmuje postać ogólną (posocznica noworodkowa) i przebiega z zajęciem kilku narządów

[2, 53]. Objawy chorobowe rozwijają się w dwóch pierwszych tygodniach życia dziecka [2, 12, 14] i są to najczęściej: zapalenie mięśnia sercowego, ciężkie zaburzenia w funkcjonowaniu wątroby, niewydolność oddechowa, niewydolność nerek, zaburzenia neurorozwojowe, arytmia, ciężkie stany zapalne i uszkodzenia trzustki [2, 12, 28, 41, 67]. Uogólnione zakażenie noworodków może także być powikłane aseptycznym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych i zapaleniem mózgu, prowadzącym do trwałego upośledzenia umysłowego [2, 67, 28]. Śródmiąższowe zapalenia płuc u noworodków, o etiologii CVB, jest związane z rozwojem nadciśnienia płucnego i wysoką śmiertelnością pacjentów [2, 28].

7. Epidemiologia

Wirusy Coxsackie B mają charakter kosmopolityczny, są jednymi z najczęściej wykrywanych enterowirusów na całym świecie [5], przy czym typy CVB2, CVB3, CVB4 i CVB5 oznaczane są znacznie częściej niż CVB1 i CVB6 [41, 42, 56, 63]. W klimacie tropikalnym i subtropikalnym zachorowania wywołane CVB występują przez cały rok, natomiast w klimacie umiarkowanym obserwuje się wzrost zapadalności w okresie letnio-jesiennym [21, 41, 53]. Krążenie wirusa w populacji może przyjąć charakter endemiczny, wtedy zachorowania występują sporadycznie, na podobnym poziomie przez wiele lat lub charakter epidemiczny związany z ogniskami zachorowań na danym obszarze pojawiającymi się cyklicznie co kilka lat [25, 42].

Częstość występowania przeciwciał przeciwko CVB jest wysoka w populacji ludzkiej, zależy od typu wirusa Coxsackie oraz od przedziału wiekowego grupy badanej i wynosi od 30 do 80% [67]. Zakażeniu może ulec każda osoba wrażliwa niezależnie od wieku, lecz najbardziej narażone są dzieci poniżej 10 roku życia [5, 53]. Typ objawów klinicznych występuje z inną częstością w różnych grupach wiekowych np.: zakażenia centralnego układu nerwowego dotyczą głównie dzieci w wieku 5–15 lat, zapalenia mięśnia sercowego z największą częstością występują w grupie 20–40 latków, natomiast zakażenia ciężkie oraz uogólnione u noworodków i niemowląt [12, 44, 53]. Zwiększona podatność na ciężkie zachorowania u dzieci poniżej pierwszego roku życia wynika z ich niedostatecznie dojrzałego układu odpornościowego. Ma to szczególne znaczenie w przypadku noworodków, które nie otrzymały matczynej przeciwciała neutralizujących wirusa [14, 53]. Objawy kliniczne oraz nasilenie choroby uwarunkowane są także wrodzonymi lub nabytymi niedoborami odporności. Ponadto, cechami predysponującymi do zachorowania jest płeć męska i wcześniactwo [2].

Zachorowania o etiologii CVB1 występują rzadko i najczęściej przyjmują epidemiczny wzór krążenia ze

wzrostami aktywności co kilka lat, w nieregularnych odstępach czasowych [18, 42]. Większość z zakażeń o etiologii CVB1 ma charakter skąpo-objawowy [18]. Ten typ wirusa Coxsackie jest najczęściej wiązany z ogniskami zachorowań na zomr [25] oraz pleurodynię [42]. Przeważnie jest wykrywany u dzieci poniżej pierwszego roku życia, najczęściej w materiale pobranym z dróg oddechowych [42]. Wiązany jest także z typem posocznicy noworodkowej, z piorunującym zapaleniem wątroby z koagulopatią, która przebiega podobnie jak przy zakażeniu wirusem ECHO11, w przeciwieństwie do posocznicy powikłanej zapaleniem mózgu i mięśnia sercowego charakterystycznej dla CVB2, CVB3 i CVB5 [18, 42, 49]. Zakażenie CVB1 jest jednym z głównych czynników ryzyka rozwoju cukrzycy typu 1 [18, 56].

CVB2 charakteryzuje endemiczny typ krążenia w populacji ze zmienną skalą zachorowań z roku na rok [42]. Istnieją także doniesienia o ogniskach zachorowań wywołanych tym typem, ale są one rzadko odnotowywane. Najczęściej jest przyczyną zomr, zapalenia mięśnia sercowego i posocznicy u noworodków i niemowląt [25, 35, 41, 42]. Grupa najmłodszych pacjentów poniżej pierwszego roku życia stanowi aż 60% wśród osób z potwierdzoną etiologią CVB2. Wirus najczęściej jest wykrywany w płynie mózgowo-rdzeniowym (pmr) [25, 42].

CVB3 cechuje epidemiczny typ krążenia w populacji w zróżnicowanych interwałach czasowych [42]. Jest on najczęściej przyczyną zapalenia mięśnia sercowego, zomr, posocznicy, zapalenia opon mózgowych i mózgu u osób z niedoborami odporności, herpanginy i chorób wysypkowych [12, 30, 41, 42, 44, 57, 59]. Obserwowano ogniska zachorowań wywołane tym typem, powiązane z przypadkami zapaleń mięśnia sercowego oraz wzrostem zachorowań u niemowląt i noworodków z charakterystyczną herpanginą [42]. Najczęściej jest identyfikowany u dzieci poniżej pierwszego roku życia, głównie w materiale pobranym z dróg oddechowych [42]. Zachorowania o etiologii CVB3 u noworodków cechuje ciężki przebieg i wysoka śmiertelność 30–50% [44].

CVB4 charakteryzuje endemiczny typ krążenia, tylko w jednostkowych przypadkach odnotowywane są ogniska zachorowań [42]. Zachorowania o etiologii CVB4 wiążą się głównie z gorączką i wysypką, objawami ze strony układu oddechowego, zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych, zapaleniem mózgu, zapaleniem serca oraz posocznicą noworodkową [7, 14, 41, 42]. Zakażenie dotyczy głównie małych dzieci, a materiałem, w którym najczęściej wykrywa się CVB4 jest pmr [12, 42]. Zakażenia cechuje bardzo wyraźna sezonowość ze wzrostem odnotowywanych przypadków w okresie lato-jesień [42]. Z tym typem wirusa Coxsackie B wiąże się bardzo wysoką śmiertelność, jedną z najwyższych wśród enterowirusów [14, 42].

CVB5 jest jednym z najczęściej identyfikowanych enterowirusów [42, 49, 66]. Wykazuje on wyraźny epidemiczny wzór krążenia, z regularnym wzrostem zachorowań co 3–6 lat, trwających najczęściej jeden sezon. W latach epidemicznych często występują liczne ogniska zachorowań na zomr [42, 63, 66, 75]. Dodatkowo CVB5 wywołuje zapalenie mięśnia sercowego, posocznicy, zapalenie opon i mózgu, ostre porażenia wiotkie, którym może towarzyszyć HFMD i herpangina [12, 41, 42, 49, 66]. Zakażenie CVB5 uważa się, za czynnik predysponujący do rozwoju cukrzycy typu 1 [42]. Zachorowania dotyczą głównie małych dzieci, wirus wykrywany jest najczęściej w pmr. Podobnie jak w przypadku CVB1 i CVB4 obserwuje się wyraźną sezonowość zachorowań, szczyt przypada w okresie letnio-jesiennym [25, 42].

Najrzadziej wykrywanym typem jest CVB6, najczęściej powoduje sporadyczne przypadki zachorowań. Poziom przeciwciał przeciwko temu typowi utrzymuje się na niskim poziomie w populacji [42, 63].

Wirusy Coxsackie B często izolowano ze ścieków, wykrywano je także w wodach powierzchniowych, gruntowych i wodzie pitnej. Możliwość przenoszenia CVB, podobnie jak innych enterowirusów, przez wodę stanowi szczególne zagrożenie dla krajów rozwijających się z niedostatecznym poziomem higieny, złymi warunkami sanitarnymi i brakiem dostępu do nieskażonej wody. Chociaż udowodnienie wodopochodnego zakażenia jest trudne, biorąc pod uwagę okres inkubacji, szybkie wtórne rozprzestrzenianie się w populacji oraz niejednorodność objawów, to jednak takie potwierdzenie uzyskano dla kilku ognisk związanych z zakażeniami CVB [53].

8. Diagnostyka i możliwości terapeutyczne

Choroby wywołane przez CVB, nie są charakterystyczne tylko dla tej grupy wirusów, mogą być również spowodowane zakażeniem innym enterowirusem, dlatego też nie stosuje się diagnostyki kierunkowej dla CVB. Celem badania laboratoryjnego jest, na pierwszym etapie, ustalenie czy czynnikiem etiologicznym choroby jest enterowirus, dopiero dalsze oznaczenia pozwalają na identyfikację typu wirusa [34]. Wstępnym etapem badań diagnostycznych jest pobranie materiału od pacjenta, rodzaj próbki uzależniony jest od rozpoznania. Zalecane jest jak najszybsze pobranie materiału, najlepiej z miejsca objętego chorobą (Tab. II).

W zależności od rozpoznania do diagnostyki w kierunku enterowirusów używany jest różnego rodzaju materiał kliniczny: kał, płyn mózgowo-rdzeniowy, wymaz z odbytu, wymaz z gardła i nosogardła, płyn z pęcherzyków skórnych, popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BALF), wymaz z oka, mocz, zamrożona lub utrwalona w formalinie tkanka, krew, surowica i osocze [2, 5, 34, 39, 53]. W przypadku powszechnych dla CVB neuroinfekcji (zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych) najlepszym materiałem diagnostycznym jest pmr, gdyż detekcja wirusa jednoznacznie potwierdza etiologię zakażenia [34, 78]. W przypadku zakażeń OUN identyfikacja wirusa w kale i próbkach z układu oddechowego jest pomocna w diagnostyce, ale nie określa ostatecznie przyczyny choroby [34]. W zakażeniach górnych i dolnych dróg oddechowych, odpowiednimi materiałami klinicznymi są kał oraz wymaz z gardła, niemniej identyfikacja wirusa nie potwierdza jedno-

Tabela II

Rekomendowane materiały kliniczne do diagnostyki w kierunku enterowirusów w zależności od rozpoznania [41]

Rozpoznanie	Typ materiału klinicznego*	Wskazania diagnostyczne
Zapalenie opon i mózgu/ zapalenie opon mózgowo- rdzeniowych	pmr , kał i próbka z dróg oddechowych, ewentualnie krew	W przypadku zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych materiał genetyczny wirusa jest wykrywany w większości próbek pmr, lecz nie zawsze u pacjentów z zapaleniem mózgu. Dzięki przedłużonej obecności wirusa w kale i wydzielinach z układu oddechowego jest on łatwo wykrywany, lecz jego detekcja nie potwierdza ostatecznie etiologii choroby.
Posocznica noworodkowa	pmr , kał, krew i próbka z dróg oddechowych	W zakażeniach uogólnionych miano wirusa może być wyższe we krwi niż w pmr; wskazana jest jednoczesna diagnostyka w kierunku ludzkiego parechowirusa.
Ostre porażenie wiotkie/ zapalenie rdzenia kręgowego	próbka z dróg oddechowych , pmr, kał i krew	W większości przypadków porażen wiotkich materiał genetyczny wirusa jest wykrywany w pmr, chociaż u niektórych pacjentów może występować tylko w próbkach z układu oddechowego i/lub kale.
HFMD/ Wysypka	płyn z pęcherzyków wysypkowych , próbka z dróg oddechowych i/lub kał	Wirus o wysokim mianie występuje w płynie z pęcherzyków wysypkowych.
Choroby układu oddechowego	próbka z dróg oddechowych , kał	Materiał genetyczny wirusa zazwyczaj wykrywany jest w wymazach z gardła i aspiratach z jamy nosowo-gardłowej. Zalecane jest jednoczesne wykonanie diagnostyki w kierunku ludzkiego rinowirusa.
Zapalenie mięśnia sercowego	kał, próbka z układu oddechowego, biopsja serca i/lub krew	Biopsja serca może zostać wykorzystana do potwierdzenia diagnozy. Wskazane jest wykonanie typowania wirusa.

* – Zalecany typ materiału do badań oznaczono pogrubioną czcionką.

znacznie etiologii zakażenia [7]. Pobieranie próbek kału jest polecane do typowania wirusa, bez względu na charakter symptomów klinicznych, gdyż osoby zakażone wydalają z kałem duże ilości wirusa (10^6 – 10^7 cząstek na 1 gram kału) przez długi czas po ustąpieniu objawów (średnio 2–4 tygodnie) [15].

Standardowa diagnostyka laboratoryjna zakażeń CVB, podobnie jak innych EV, polega na detekcji materiału genetycznego wirusa w próbkach klinicznych przy użyciu technik biologii molekularnej. Dodatkowo do dalszej charakterystyki patogenu stosuje się izolację w hodowlach komórkowych, typowanie metodami molekularnymi lub przy użyciu surowic neutralizujących. Mniej popularne są metody serologiczne ze względu na niską czułość i specyficzność [34].

Diagnostyka enterowirusów przez wiele lat opierała się na izolacji w hodowlach komórkowych, a następnie ich identyfikacji w teście neutralizacji z wzorcowymi surowicami Lim Benyesh-Melnick. Izolacja wirusów długo stanowiła „złoty standard”. Obecnie metoda ta najczęściej służy do badań referencyjnych, naukowych oraz epidemiologicznych, dostarczając informacji o typach klinicznych i środowiskowych krążących w populacji [34]. Ponadto może być także używana do wykrywania zakażeń mieszanych oraz oceny działania leków przeciwwirusowych [34]. Wirusy Coxsackie B izolowane są w liniach komórkowych, wyprowadzonych zarówno ze zwierzęcych jak i ludzkich tkanek. Dobrze namnażają się w komórkach nerki małpiej oraz ludzkich liniach nowotworowych takich jak: A549, HeLa, Hep-2, HT-29 i RD [6, 29, 64].

Trudności w izolacji niektórych wariantów wirusów w hodowlach komórkowych doprowadziło do opracowania nowych metod diagnostycznych, opartych na technikach biologii molekularnej [5, 39]. Wykrywanie materiału genetycznego EV, bezpośrednio w badanym materiale klinicznym, oparte jest na łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) [34]. Obecnie w celach diagnostycznych EV używa się różne odmiany reakcji PCR: RT-PCR w czasie rzeczywistym (rtRT-PCR) [78], multiplex-RT-PCR [13] oraz wewnętrzny (zagnieżdżony) RT-PCR (nRT-PCR) [39]. W podstawowym teście diagnostycznym, reakcji amplifikacji podlega wysoko konserwatywny region 5'NTR. Test ten charakteryzuje się wysoką czułością, swoistością oraz krótkim czasem realizacji. Umożliwia on także wykrywanie materiału genetycznego wariantów wirusów, które nie namnażają się w hodowlach komórkowych [34].

Typowanie CVB przebiega z użyciem metod molekularnych i jest możliwe dzięki zastosowaniu techniki PCR połączonej z sekwencjonowaniem [39]. Reakcja sekwencjonowania może obejmować cały genom wirusa lub region kodujący białka strukturalne kapsydu, zwłaszcza VP1 [34]. Obecnie typowanie mole-

kularne EV uważa się za standardową metodę (tzw. złoty standard) [34]. Służy ona do celów epidemiologicznych, grupowania, genotypowania, identyfikacji zdarzeń rekombinacyjnych oraz pojawiania się nowych rekombinantów i wariantów EV [5, 34, 39].

Uzyskanie wyniku badań potwierdzającego etiopatogenezę CVB, nie wiąże się z przyczynową terapią zakażenia, ze względu na brak preparatów działających selektywnie na wirusa [1, 2, 76, 79]. W ciężkich przypadkach zachorowań konieczna jest hospitalizacja chorego i wdrożenie leczenia objawowego, a nawet działań podtrzymujących życie [2, 14, 35]. Korzystny wpływ może przynieść podawanie pacjentowi dożylnych preparatów ludzkiej immunoglobuliny (IVIG), ale ta metoda leczenia nie została jednoznacznie potwierdzona [2, 67]. Lepsze zrozumienie patogenezы zakażenia CVB stanowi podstawę opracowania terapii przeciwwirusowej i strategii ochronnej. Głównym zadaniem nowych substancji terapeutycznych jest selektywne oddziaływanie na wirusa lub niezbędne do replikacji wirusa czynniki gospodarza (Tab. III).

Najbardziej obiecującymi związkami w terapii zakażeń enterowirusami, w tym CVB, są inhibitory wiązania kapsydu wirusa z receptorem komórkowym [1, 64]. Do tej grupy należy pleconaril, pirodavis, vapendavis, pocapavir [1, 2, 8]. Substancje te łączą się z hydrofobowym zagłębieniem w kapsydzie, tym samym zapobiegając połączeniu z receptorem [2]. Jak dotąd żadna z tych substancji nie została zarejestrowana do leczenia, ale przeprowadzono obiecujące badania klinicznie z użyciem pleconarilu na grupie noworodków z zakażeniem ogólnoustrojowym o etiologii enterowirusowej. Uzyskane wyniki dają nadzieję na skuteczną terapię i zmniejszenie śmiertelności w tej grupie chorych [2]. Do kapsydu wirusa wiążą się także pochodne benzenosulfonamidowe [1]. Związki te łączą się z kieszenią w kapsydzie w zagłębieniu białek VP1 i VP3, przez co hamują proces uwalniania materiału genetycznego wirusa do cytoplazmy komórki gospodarza [1]. Tego typu związki wydają się mieć szeroki zakres działania i jest nadzieja, że znajdą zastosowanie w terapii zakażeń wywołanych nie tylko przez enterowirusy, ale także rinowirusy [1]. Innym rodzajem substancji przeciwwirusowych są rozpuszczalne receptory, które konkurencyjnie wiążąc cząsteczki wirusa, przeciwdziałają zakażeniu komórki. Tego typu związkiem jest fuzyjne białko sCAR-Fc, zbudowane z zewnątrzkomórkowej domeny CAR i fragmentu ludzkiej immunoglobuliny typu G (IgG) [61]. Badania *in vitro* wykazały wysoką aktywność przeciwwirusową sCAR-Fc względem wszystkich szczepów referencyjnych dla każdego z sześciu typów CVB, ale także dużą skuteczność w stosunku do izolatów klinicznych [61].

Do innej grupy związków należą inhibitory proteazy 3C. Oddziałują one z aktywnym miejscem enzymu,

Tabela III
Substancje oddziałujące z wirusami Coxsackie B [1, 4, 8, 31, 33, 40, 48, 61, 64, 68, 73, 76, 77, 79]

Cel	Mechanizm działania	Substancja czynna
Kapsyd	Zaburzenie etapu przyłączania wirusa do receptora komórkowego	<ul style="list-style-type: none"> • Pleconaril i jego analog • Poczapavir (V-073) • sCAR-Fc • Pirodavir • Vapendavir
3C ^{pro}	Hamowanie procesu potranslacyjnej obróbki poliproteiny	• Rupintrivir i jego analog AG7404
3D ^{pol}	Hamowanie procesu replikacji genomu wirusa	<ul style="list-style-type: none"> • Gemcytabina • Rybawiryna • Amiloryd
2C	Hamowanie procesu replikacji genomu wirusa	<ul style="list-style-type: none"> • Fluoksetyna • Dibucaina • Pirlindole • Formoterol • Zuklopentyksol
Czynniki gospodarza	Ukierunkowane na HSP90, inhibicja obróbki proteolitycznej regionu P1 genomu	• Geldanamycyna i jej analog 17-AAG
	Ukierunkowane na PI4KB, inhibicja replikacji wirusa	<ul style="list-style-type: none"> • Enviroxime • GW5074 • PIK93 • BF738735
	Ukierunkowane na OSBP, inhibicja replikacji wirusa	<ul style="list-style-type: none"> • Itrakonazol • OSW-1
	Ukierunkowane na glutation, inhibicja procesu składania kapsydu	<ul style="list-style-type: none"> • Butionino-sulfoksymina • TP219

Oznaczenia: HSP90 – białko szoku cieplnego 90; PI4K β – kinaza4-fosfatydyloinozytolu; OSBP – białko wiążące oksysterol.

przez co hamują potranslacyjną obróbkę poliproteiny. Opracowanie inhibitorów 3C jest związane z syntezą złożonych cząsteczek peptydomimetycznych np. rupintriviru i jego analogu AG7404. Pozytywnym aspektem zastosowania tego typu związków w terapii jest ich szeroki zakres działania nie tylko na enterowirusy, ale także na rinowirusy. [8, 48]

Kolejną strategią w terapii antywirusowej jest hamowanie wirusowej polimerazy 3D^{pol}. Analogi nukleozydów (gemcytabina, rybawiryna) oraz inhibitor nienukleozydowy (amiloryd) wpływają na zahamowanie procesu replikacji [8, 48]. Mogą one zostać włączone do genomu wirusa, prowadząc do terminacji syntezy nowopowstającego łańcucha nukleotydowego [40] lub oddziaływać z polimerazą (amiloryd) zwiększając jej częstość błędów [48]. Związki wykazujące aktywność wobec polimerazy 3D^{pol} używane są w terapiach innych schorzeń. Mianowicie gemcytabina to lek przeciwnowotworowy stosowany w chemioterapii różnych nowotworów [40]. Rybawiryna stosowana jest w terapii przeciw RNA wirusom, takim jak wirus zapalenia wątroby typu C oraz wirus RS (RSV), a amiloryd to diuretyk [31, 40].

Do kolejnej grupy potencjalnych leków przeciw-wirusowych należą inhibitory białka enzymatycznego wirusa 2C. Hamują one proces replikacji materiału genetycznego wirusa, chociaż dokładny mechanizm ich działania nie jest poznany. Inhibitorem 2C jest m.in.

lek przeciwdepresyjny fluoksetyna (Prozac), dibucaina stosowana do miejscowych znieczuleń oraz lek przeciwdepresyjny pirlindole. [8, 33,76]

Wysoki wskaźnik mutacji RNA wirusów wpływa na szybkie pojawianie się wariantów opornych na działanie substancji aktywnych. Dlatego też rośnie zainteresowanie opracowywaniem leków przeciw-wirusowych celujących w czynniki gospodarza, które są kluczowe w replikacji wirusa [8]. Zaburzenie procesu replikacji można uzyskać poprzez ukierunkowaną aktywność inhibitorów wobec czynników gospodarza biorących udział w tworzeniu struktury replikacyjnej RO tj. PI4KB oraz OSBP [4, 77]. OSBP jest blokowany przez lek przeciwgrzybiczy itrakonazol [8] oraz naturalny związek przeciwnowotworowy OSW-1 [4]. Inhibitory PI4KB (Enviroxime; GW5074; PIK93) wykazują szerokie spektrum działania, lecz ich stosowanie wiąże się wystąpieniem działań niepożądanych [8, 77]. Inhibitory czynników gospodarza mogą także prowadzić do zahamowania procesu składania cząsteczek potomnych wirusa [8]. Przykładem takich substancji są geldanamycyna [8], butionino-sulfoksymina [68] i TP219 [73]. Geldanamycyna oddziałuje z białkiem szoku cieplnego (HSP90), które bierze udział w cięciu proteiny P1 przez proteazę 3CD na VP0, VP1 i VP3 [50], natomiast butionino-sulfoksymina [68] wpływa na poziom glutationu w organizmie, podobnie jak TP219 [73], które

kowalencyjnie łączy się z tym peptydem [27]. Glutathion to tripeptyd, w którego skład wchodzi glutamina, cysteina i glicyna, bierze on udział w stabilizacji pentamerów budujących prokapsyd [27, 68].

Jak dotąd żadna z opisanych powyżej substancji nie została zatwierdzona do stosowania w terapii zakażeń CVB. Nie ma także dostępnej szczepionki przeciwko CVB. W trakcie badań klinicznych są obiecujące prototypowe szczepionki zapobiegające zakażeniom CVB3 [36] oraz CVB1 [37], które w modelach zwierzęcych ograniczają rozwój cukrzycy typu 1. Zakażeniom CVB nie można całkowicie zapobiec, ale należy pamiętać, że transmisja CVB zachodzi głównie drogą fekalno-oralną. Dlatego też przestrzeganie zasad higieny, częste i dokładne mycie rąk zmniejsza ryzyko zakażenia [2, 25].

9. Podsumowanie

Wirusy Coxsackie B to jedne z najczęściej wykrywanych enterowirusów na całym świecie. Wywołują szeroki wachlarz chorób od łagodnych nieżytów żołądkowo-jelitowych, do często ciężkich w przebiegu zapaleń mięśnia sercowego, wątroby, trzustki, opon mózgowo-rdzeniowych, mózgu oraz ostrych porażień wiotkich. Z zakażeniami CVB związany jest również rozwój chorób chronicznych: kardiomiopatii, cukrzycy typu 1 oraz zespołu chronicznego zmęczenia. Szeroki wachlarz jednostek chorobowych jakie wywołują związany jest z pantropizmem tych wirusów, czyli z możliwością zakażenia różnych tkanek i organów. Poznanie mechanizmów wnikania, patogenyzy oraz interakcji z białkami gospodarza jest tematem zainteresowania wielu badaczy. Miejmy nadzieję, że kolejne odkrycia i poszerzenie wiedzy w zakresie CVB pozwolą na skuteczną kontrolę zakażeń i zapobieganie ciężkim, jak również chronicznym postaciom choroby, oraz rozszerzą możliwości diagnostyczne i terapeutyczne.

Podziękowania

Praca powstała w ramach zadania BW-1/2021.

Piśmiennictwo

- Abdelnabi R., Neyts J. i wsp.: A novel druggable interprotomer pocket in the capsid of rhino- and enteroviruses. *PLoS Biol.* **17**, e3000281 (2019)
- Abzug M.J.: Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates. *Paediatr. Drugs.* **6**, 1–10 (2004)
- Agrez M.V., Shafren D.R., Gu X., Cox K., Sheppard D., Barry R.D.: Integrin avb6 enhances coxsackievirus B1 lytic infection of human colon cancer cells. *Virology*, **239**, 71–77 (1997)
- Albulescu L., Strating J.R.P.M., Thibaut H.J., van der Linden L., Shair M.D., Neyts J., van Kuppeveld F.J.M.: Broad-range inhibition of enterovirus replication by OSW-1, a natural compound targeting OSBP. *Antivir. Res.* **117**, 110–114 (2015)
- Angez M., Shaukat S., Zahra R., Alam M., Sharif S., Khurshid A., Zaidi S.: Characterization of group B coxsackieviruses isolated from non-polio acute flaccid paralysis patients in Pakistan: Vital Assessment Before polio eradication. *Epidemiol. Infect.* **145**, 2473–2481 (2017)
- Argo E., Gimenez B., Cash P.: Non-cytopathic infection of rhabdomyosarcoma cells by coxsackie B5 virus. *Arch. Virol.* **126**, 215–229 (1992)
- Baboonian C., Davies M.J., Booth J.C., McKenna W.J.: Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **223**, 31–52 (1997)
- Baggen J., Thibaut H.J., Strating J.R.P.M., van Kuppeveld F.J.M.: The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 368–381 (2018)
- Basavappa R., Filman D.J., Syed R., Flore O., Icenogle J.P., Hogle J.M.: Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: Structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci.* **3**, 1651–1669 (1994)
- Bedard K.M., Semler B.L.: Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes. Infect.* **6**, 702–713 (2004)
- Bergelson J.M., Modlin J.F., Wieland-Alter W., Cunningham J.A., Crowell R.L., Finberg R.W.: Clinical Coxsackievirus B Isolates Differ from Laboratory Strains in Their Interaction with Two Cell Surface Receptors. *J. Infect. Dis.* **175**, 697–700 (1997)
- Bersani I., Auriti C., Piersigilli F., Dotta A., Diemedi-Camassei F., Di Pede A., Buttinelli G., Danhaive O.: Neonatal Acute Liver Failure Due to enteroviruses: a 14 years single NICU experience. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **33**, 2576–2580 (2020)
- Billaud G., Peny S., Legay V., Lina B., Valette M.: Detection of rhinovirus and enterovirus in upper respiratory tract samples using a multiplex nested PCR. *J. Virol. Methods.* **108**, 223–228 (2003)
- Bissel S.J., Winkler C.C., DelTondo J., Wang G., Williams K., Wiley C.A.: Coxsackievirus B4 myocarditis and meningoencephalitis in newborn twins. *Neuropathology*, **34**, 429–437 (2014)
- Bopegamage S.: Enterovirus infections: Pivoting role of the adaptive immune response. *Virulence*, **7**, 495–497 (2016)
- Buchwald D., Ashley R.L., Pearlman T., Kith P., Komaroff A.L.: Viral serologies in patients with chronic fatigue and chronic fatigue syndrome. *J. Med. Virol.* **50**, 25–30 (1996)
- Chrysos G., Kokkoris S., Protosaltis J., Korantzopoulos P., Giannoulis G.: Coxsackievirus infection associated with acute pancreatitis. *JOP*, **5**, 384–387 (2004)
- Chu P.Y., Motomura K. i wsp.: Transmission and Demographic Dynamics of Coxsackievirus B1. *PLoS One*, **10**, e0129272 (2015)
- Chung S.K., Kim J.Y., Kim I.B., Park S. I., Paek K.H., Nam J.H.: Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells. *Virology*, **333**, 31–40 (2005)
- Coyne C.B., Shen L., Turner J.R., Bergelson J.M.: Coxsackievirus Entry across Epithelial Tight Junctions Requires Occludin and the Small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host. Microbe.* **2**, 181–192 (2007)
- Crowell R.L., Landau B.J.: A short history and introductory background on the coxsackieviruses of group B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **223**, 1–11 (1997)
- Dalldorf G., Sickles G.M., Plager H., Gifford, R.: A virus recovered from the feces of poliomyelitis patients pathogenic for suckling mice. *J. Exp. Med.* **89**, 567–582 (1949)
- Dan M., Chantler J.K.: A genetically engineered attenuated coxsackievirus B3 strain protects mice against lethal injection. *J. Virol.* **79**, 9285–9295 (2005)

24. Domingo E., Martin V., Perales C., Escarmis C.: Coxsackieviruses and Quasispecies Theory: Evolution of Enteroviruses (w) Group B Coxsackieviruses, red. Tracy S., Oberste M.S., Drescher K.M. *Curr Top in Microbiol. Immunol.* **323**, 3–32 (2008)
25. Druyts-Voets E., Van Renterghem L., Gerniers S.: Coxsackie B virus epidemiology and neonatal infection in Belgium. *J. Infect.* **27**, 311–316 (1993)
26. Dutkiewicz M., Stachowiak A., Swiatkowska A., Ciesiołka J.: Structure and function of RNA elements present in enteroviral genomes. *Acta. Biochim. Pol.* **63**, 623–630 (2016)
27. Duyvesteyn H.M.E., Ren J., Walter T.S., Fry E.E., Stuart D.I.: Glutathione facilitates enterovirus assembly by binding at a druggable pocket. *Commun. Biol.* **3**, DOI: 10.1038/s42003-019-0722-x. (2020)
28. Euscher E., Davis J., Holzman I., Nuovo G.J.: Coxsackie virus infection of the placenta associated with neurodevelopmental delays in the newborn. *Obstet. Gynecol.* **98**, 1019–1026 (2001)
29. Frisk G., Lindberg M.A., Diderholm H.: Persistence of coxsackievirus B4 infection in rhabdomyosarcoma cells for 30 months. Brief report. *Arch. Virol.* **144**, 2239–2245 (1999)
30. Garmaroudi F.S., Marchant D., Hendry R., Luo H., Yang D., Ye X., Shi J., McManus B.M.: Coxsackievirus B3 replication and pathogenesis. *Future Microbiol.* **10**, 629–653 (2015)
31. Gazina E.V., Smidansky E.D., Holien J.K., Harrison D.N., Cromer B.A., Arnold J.J., Parker M.W., Cameron C.E., Petrou S.: Amiloride is a competitive inhibitor of coxsackievirus B3 RNA polymerase. *J. Virol.* **85**, 10364–10374 (2011)
32. Ghigo E.: A dilemma for viruses and giant viruses: which endocytic pathway to use to enter cells? *Intervirology*, **53**, 274–283 (2010)
33. Gofshsteyn J., Cárdenas A.M., Bearden D.: Treatment of Chronic Enterovirus Encephalitis With Fluoxetine in a Patient With X-Linked Agammaglobulinemia. *Pediatr. Neurol.* **64**, 94–98 (2016)
34. Harvala H., Fischer T.K. i wsp.: Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J. Clin. Virol.* **101**, 11–17 (2018)
35. Hopkins K.A., Abdou M.H., Hadi M.A.: Coxsackie B2 Virus Infection Causing Multiorgan Failure and Cardiogenic Shock in a 42-Year-Old Man. *Tex. Heart. Inst. J.* **46**, 32–35 (2019)
36. Hunziker I.P., Harkins S., Feuer R., Cornell C.T., Whitton J.L.: Generation and analysis of an RNA vaccine that protects against coxsackievirus B3 challenge. *Virology*, **330**, 196–208 (2004)
37. Hyöty H., Leon F., Knip M.: Developing a vaccine for type 1 diabetes by targeting coxsackievirus B. *Expert. Rev. Vaccines*. **17**, 1071–1080 (2018)
38. Ifie E., Richardson S.J. i wsp.: Unexpected subcellular distribution of a specific isoform of the Coxsackie and adenovirus receptor, CAR-SIV, in human pancreatic beta cells. *Diabetologia*, **61**, 2344–2355 (2018)
39. Iturriza-Gómara M., Megson B., Gray J.: Molecular detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. *J. Med. Virol.* **78**, 243–253 (2006)
40. Kang H., Cho, S. i wsp.: Synergistic antiviral activity of gemcitabine and ribavirin against enteroviruses. *Antiviral. Res.* **124**, 1–10 (2015)
41. Kaplan M.H., Klein S.W., McPhee J., Harper R.G.: Group B Coxsackievirus infections in infants younger than three months of age: a serious childhood illness. *Rev. Infect. Dis.* **5**, 1019–1032 (1983)
42. Khetsuriani N., Lamonte-Fowlkes A., Oberst S., Pallansch M.A.: Enterovirus surveillance – United States, 1970–2005. *MMWR Surveill. Summ.* **55**, 1–20 (2006)
43. Knowlton K.U.: CVB infection and mechanisms of viral cardiomyopathy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **323**, 315–335 (2008)
44. Krogstad P., Hammon R., Halnon N., Whitton J.L.: Fatal neonatal myocarditis caused by a recombinant human enterovirus-B variant. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **27**, 668–669 (2008)
45. Kyriakopoulou Z., Pliaka V., Amoutzias G.D., Markoulatos P.: Recombination among human non-polio enteroviruses: implications for epidemiology and evolution. *Virus. Genes.* **50**, 177–188 (2015)
46. Lee S.H.: Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest. Res.* **13**, 11–18 (2015)
47. Lin J.-Y., Chen T.-C., Weng K.-F., Chang S.-C., Chen L.-L., Shih S.-R.: Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J. Biomed. Sci.* **16**, 103 (2009)
48. Linden L., Wolthers K., van Kuppeveld F.: Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses*, **7**, 4529–4562 (2015)
49. Ma H., Huang X., Kang K., Li X., Tang X., Ren Y., Wang Y., Zhao G., Xu B.: Recombination in human coxsackievirus B5 strains that caused an outbreak of viral encephalitis in Henan, China. *Arch. Virol.* **158**, 2169–2173 (2013)
50. Martínez-Salas E., Francisco-Velilla R., Fernandez-Chamorro J., Lozano G., Diaz-Toledano R.: Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. *Virus. Res.* **206**, 62–73 (2015)
51. Melchers W.J., Hoenderop J.G., Bruins Slot H.J., Pleij C.W., Pilipenko E.V., Agol V.I., Galama J.M.: Kissing of the two predominant hairpin loops in the coxsackie B virus 3' untranslated region is the essential structural feature of the origin of replication required for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **71**, 686–696 (1997)
52. Mercer J., Helenius A.: Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 510–520 (2009)
53. Muehlenbachs A., Bhatnagar J., Zaki, S.R.: Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J. Pathol.* **235**, 217–228 (2014)
54. Muslin C., Kain A.M., Bessaud M., Blondel B., Delpeyroux F.: Recombination in Enteroviruses, a Multi-Step Modular Evolutionary Process. *Viruses*, **11**, 859 (2019)
55. Oikarinen M., Hyöty H. i wsp.: Analysis of pancreas tissue in a child positive for islet cell antibodies. *Diabetologia*, **51**, 1796–1802 (2008)
56. Oikarinen S., Hyöty H. i wsp.: Virus antibody survey in different European populations indicates risk association between coxsackievirus B1 and type 1 diabetes. *Diabetes*. **63**, 655–662 (2016)
57. Ornoy A., Tenenbaum A.: Pregnancy outcome following infections by coxsackie, echo, measles, mumps, hepatitis, polio and encephalitis viruses. *Reprod. Toxicol.* **21**, 446–457 (2006)
58. Panwar H.S., Ojha H., Ghosh P., Barage S.H., Raut S., Sahu A.: Molecular engineering of an efficient four-domain DAF-MCP chimera reveals the presence of functional modularity in RCA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 9953–9958 (2019)
59. Peischard S., Ho H.T., Theiss C., Strutz-Seebohm N., Seebohm G.: A Kidnapping Story: How Coxsackievirus B3 and Its Host Cell Interact. *Cell Physiol. Biochem.* **53**, 121–140 (2019)
60. Pérez-Losada M., Arenas M., Galán J. C., Palero F., González-Candelas F.: Recombination in viruses: mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infect. Genet. Evol.* **30**, 296–307 (2015)
61. Pinkert S., Dieringer B., Diedrich S., Zeichhardt H., Kurreck J., Fechner H.: Soluble coxsackie- and adenovirus receptor (sCAR-Fc); a highly efficient compound against laboratory and clinical strains of coxsackie-B-virus. *Antiviral. Res.* **136**, 1–8 (2016)
62. Pinkert S., Röger C., Kurreck J., Bergelson J. M., Fechner H.: The Coxsackievirus and Adenovirus Receptor: Glycosylation and the

- Extracellular D2 Domain Are Not Required for Coxsackievirus B3 Infection. *J. Virol.* **90**, 5601–5610 (2016)
63. Rotbart H.A.: Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin. Infect. Dis.* **20**, 971–981 (1995)
 64. Schmidtke M., Selinka H. C., Heim A., Jahna B., Tonewa M., Kandolf R., Stelzner A., Zella R.: Attachment of coxsackievirus B3 variants to various cell lines: mapping of phenotypic differences to capsid protein VP1. *Virology*, **275**, 77–88 (2000)
 65. Schultz J.C., Hilliard A.A., Cooper L.T., Rihal C.S.: Diagnosis and treatment of viral myocarditis. *Mayo. Clin. Proc.* **84**, 1001–1009 (2009)
 66. Shen H.: Recombination analysis of coxsackievirus B5 genotype C. *Arch. Virol.* **163**, 539–544 (2018)
 67. Sin J., Mangale V., Thienphrapa W., Gottlieb R. A., Feuer R.: Recent progress in understanding coxsackievirus replication, dissemination, and pathogenesis. *Virology*, **484**, 288–304 (2015)
 68. Smith A.D., Dawson H.: Glutathione is required for efficient production of infectious picornavirus virions. *Virology*, **353**, 258–267 (2006)
 69. Sun D., Chen X. i wsp.: Apoptosis and Autophagy in Picornavirus Infection. *Front. Microbiol.* **10**, DOI: 10.3389/fmicb.2019.02032 (2019)
 70. Tang J.W., Holmes C.W.: Acute and chronic disease caused by enteroviruses. *Virulence*, **8**, 1062–1065 (2017)
 71. Thanaviratnanich S, Katirji B.: Myasthenia Gravis following Coxsackie Encephalitis. *SAJ Case Rep.* **4**, 304 (2017)
 72. Thevenin T., Lobert P.E., Hober D.: Inactivation of coxsackievirus B4, feline calicivirus and herpes simplex virus type 1: unexpected virucidal effect of a disinfectant on a non-enveloped virus applied onto a surface. *Intervirology*, **56**, 224–230 (2013)
 73. Thibaut H.J., Neyts J. i wsp.: Binding of glutathione to enterovirus capsids is essential for virion morphogenesis. *PLoS Pathog.* **10**, e1004039 (2014)
 74. Triantafyllopoulou A., Tapinos N., Moutsopoulos H.M.: Evidence for coxsackievirus infection in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis. Rheum.* **50**, 2897–2902 (2004)
 75. Tsuno K., Miyatake C., Nishijima H., Hotta C., Ogawa T., Asano T.: Coxsackievirus B5 Aseptic Meningitis in Infants in Chiba Prefecture, Japan, in 2016. *J. Nippon. Med. Sch.* **85**, 187–190 (2018)
 76. Ulferts R., de Boer S.M., van Kuppeveld F.J.M. i wsp.: Screening of a Library of FDA-Approved Drugs Identifies Several Enterovirus Replication Inhibitors That Target Viral Protein 2C. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **60**, 2627–2638 (2016)
 77. Van der Schaar H.M., van Kuppeveld F.J.M. i wsp.: Coxsackievirus mutants that can bypass host factor PI4KIII β and the need for high levels of PI4P lipids for replication. *Cell Res.* **22**, 1576–1592 (2012)
 78. Volle R., Nourrisson C., Mirand A., Regagnon C., Chambon M., Henquell C., Bailly J.-L., Peigue-Lafeuille H., Archimbaud C.: Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system. *J. Virol. Methods.* **185**, 142–148 (2012)
 79. Volobueva A., Egorova A., Galochkina A., Ekina S., Zarubaev V., Makarov V.: The Evolution of Pleconaril: Modified O-Alkyl Linker Analogs Have Biological Activity towards Coxsackievirus B3 Nancy. *Molecules*, **25**, DOI: 10.3390/molecules25061345. (2020)
 80. Vonlaufen A., Wilson J.S., Apte M.V.: Molecular mechanisms of pancreatitis: current opinion. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 1339–1348 (2008)
 81. Wehbi A., Kremer E.J., Dopeso-Reyes I.G.: Location of the Cell Adhesion Molecule “Coxsackievirus and Adenovirus Receptor” in the Adult Mouse Brain. *Front. Neuroanat.* **14**, DOI: 10.3389/fnana.2020.00028 (2020)
 82. Xiang W., Paul A.V., Wimmer E.: RNA Signals in Enterovirus and Rhinovirus Genome Replication. *Seminars in Virology*, **8**, 256–273 (1997)
 83. Zaragoza C., Ocampo C., Saura M., Leppo M., Wei X.-Q., Quick R., Moncada S., Liew F.Y., Lowenstein, C.J.: The role of inducible nitric oxide synthase in the host response to Coxsackievirus myocarditis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2469–2474 (1998)
 84. Zautner A.E., Korner U., Henke A., Badorff C., Schmidtke M.: Heparan sulfates and coxsackievirus-adenovirus receptor: each one mediates coxsackievirus B3 PD infection. *J. Virol.* **77**, 10071–10077 (2003)
 85. Zell R. and ICTV Report Consortium: ICTV VirusTaxonomy Profile. Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2421–2422 (2017)

CANDIDA AURIS: CO WIEMY NA TEMAT NAJBARDZIEJ ENIGMATYCZNEGO PATOGENU XXI WIEKU?

Agnieszka Bogut

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Wpłynęło w październiku 2022 r., zaakceptowano w grudniu 2022 r.

Streszczenie: *Candida auris* jest nowym patogenem grzybiczym, którego znaczenie kliniczne systematycznie wzrasta na przestrzeni ostatnich lat. Najważniejsze aspekty dotyczące zagrożeń związanych z tym gatunkiem dotyczą szybkiego rozprzestrzeniania się *C. auris* w skali globalnej i wysokiego potencjału epidemicznego, zdolności utrzymywania się w środowisku szpitalnym, którą umożliwia, m.in.: oporność na środki dezynfekcyjne, transmisja horyzontalna, możliwa długotrwała kolonizacja organizmu pacjenta, zdolność do wywoływania zakażeń inwazyjnych; trudności związane z laboratoryjną identyfikacją opartą na konwencjonalnych testach biochemicznych, wieloantybiotykooporność oraz konieczność wdrażania restrykcyjnych i kosztownych strategii kontroli i prewencji zakażeń w przypadku izolacji tego drożdżaka. Praca przeglądowa opisuje powyższe problemy w oparciu o wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach, celem podsumowania obecnego stanu wiedzy na temat tego drobnoustroju.

1. Wprowadzenie. 2. *Candida auris* – charakterystyka gatunku. 2.1. Epidemiologia *Candida auris*. 2.2. Wirulencja *Candida auris*. 2.2.1. Zmienność morfologiczna. 2.2.2. Wytwarzanie enzymów litycznych. 2.2.3. Adaptacja do stresogennych warunków środowiskowych. 2.2.4. Tworzenie biofilmu. 2.3. Oporność *Candida auris* na leki przeciwgrzybicze. 3. Kolonizacja a zakażenie. 4. Laboratoryjna diagnostyka *Candida auris*. 4.1. Identyfikacja gatunku *Candida auris*. 4.2. Ocena antybiotykowrażliwości *C. auris*. 4.3. Rekomendowany algorytm postępowania diagnostycznego. 5. Leczenie zakażeń wywołanych przez *Candida auris*. 6. Zalecane działania prewencyjne. 7. Podsumowanie

CANDIDA AURIS: WHAT DO WE KNOW ABOUT THE MOST ENIGMATIC PATHOGEN OF THE 21ST CENTURY?

Abstract: *Candida auris* is a new fungal pathogen whose clinical significance has dramatically increased within recent years. Major issues related to this species include its rapid global spread and high epidemic potential, resilience and persistence in the hospital environment favoured by its resistance against certain disinfectants, horizontal transmission; possibility of persistent colonization, challenging laboratory identification based on conventional biochemical methods, multidrug resistance as well as the need for implementation of restrictive and expensive prevention and control measures. This review raises the above mentioned issues and compiles recent findings regarding this microorganism.

1. Introduction. 2. *Candida auris* – characterization of the species. 2.1. Epidemiology of *Candida auris*. 2.2. *Candida auris* virulence. 2.2.1. Morphologic variability. 2.2.2. Production of lytic enzymes. 2.2.3. Adaptation to environmental stress conditions. 2.2.4. Biofilm production. 2.3. Resistance of *Candida auris* to antifungal agents. 3. Colonization vs. infection. 4. Laboratory diagnosis of *Candida auris*. 4.1. Identification of *Candida auris* species. 4.2. Determination of *Candida auris* antifungal susceptibility profile. 4.3. Recommended algorithm of the diagnostic proceedings. 5. Treatment of *Candida auris* infections. 6. Recommended preventive measures. 7. Summary

Słowa kluczowe: *Candida auris*, wirulencja, wieloantybiotykooporność, diagnostyka, leczenie

Key words: *Candida auris*, virulence, multidrug resistance, diagnosis, treatment

1. Wprowadzenie

Zakażenia grzybicze stanowią narastający problem współczesnej medycyny [34]. Mimo, iż drobnoustroje należące do rodzaju *Candida* stanowią ważny składnik ludzkiego mykobiomu, kolonizując powierzchnię skóry i błon śluzowych, m.in., układu oddechowego, pokarmowego i moczowego, są one jednocześnie wiodącymi patogenami związanymi z zakażeniami szpitalnymi

o etiologii grzybiczej, i czwartą, co do częstości występowania, przyczyną wszystkich zakażeń związanych ze środowiskiem szpitalnym [2, 34]. Zmianie z komensalnego do inwazyjnego trybu życia tych drobnoustrojów sprzyja przede wszystkim osłabienie sprawności układu immunologicznego organizmu gospodarza [2, 94].

Kliniczne objawy zakażeń drożdżakami z rodzaju *Candida* są różnorodne i mogą przyjmować zarówno postać zakażeń powierzchniowych, obejmujących skórę

* Autor korespondencyjny: Agnieszka Bogut, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin; tel.: 81 448 64 10; e-mail: agnieszka.bogut@umlub.pl

© 2023 Agnieszka Bogut

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

i błony śluzowe, jak i inwazyjnych, przebiegających pod postacią zakażeń narządowych i kandydemii [2, 34]. W skali globalnej, rocznie raportowanych jest około 400 000 przypadków kandydemii, wywołanych przez ten rodzaj grzybów, zaś śmiertelność związana z ich przebiegiem przekracza 40% [34].

Coraz częstsze występowanie zakażeń wywołanych przez *Candida* spp. można wiązać ze stosowaniem szerokozakresowych antybiotyków, wykonywaniem inwazyjnych procedur medycznych oraz z rosnącą populacją osób znajdujących się w stanie immunosupresji i krytycznie chorych, w przypadku których, zakażenia o etiologii *Candida* spp. stanowią główną przyczynę zachorowalności i śmiertelności [27].

Co więcej, inwazyjne zakażenia grzybicze, w tym zakażenia wywołane przez drożdżaki z rodzaju *Candida*, stanowią obecnie jedno z kluczowych powikłań COVID-19 u pacjentów hospitalizowanych. Pomimo zaburzeń immunologicznych notowanych w przebiegu COVID-19, nie stwierdzano znaczących defektów w funkcjonowaniu komórek immunologicznie czynnych, takich jak neutrofile i monocyty/makrofagi, odgrywających kluczową rolę w przebiegu odpowiedzi immunologicznej wobec *Candida* spp. [2]. Uznano, że do istotnych czynników ryzyka związanych z tymi zakażeniami należą: długotrwała (> 7 dni) hospitalizacja na oddziale intensywnej terapii (OIT), mechaniczna wentylacja (sprzyja kolonizacji dróg oddechowych przez grzyby), monitorowanie hemodynamiczne, stosowanie centralnych wkłucć dożylnych, wcześniejsza antybiotykoterapia, stosowanie kortykosteroidów [2, 52, 59, 77, 78, 93]. Nerozwiązaną pozostaje kwestia, czy nadkażenie *Candida* spp. w przebiegu COVID-19 skutkuje większą śmiertelnością, czy pozostaje ono jedynie wyznacznikiem ciężkiego przebiegu zakażenia wirusowego, co czyni koniecznym kontynuowanie badań epidemiologicznych, by ocenić znaczenie inwazyjnej kandydozy u pacjentów zakażonych koronawirusem [2].

Mimo, iż *C. albicans* pozostaje wiodącym gatunkiem z rodzaju *Candida* odpowiedzialnym za zakażenia, notowane jest także rosnące kliniczne znaczenie gatunków określanych jako *non-albicans Candida*, w tym *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. krusei*. Uważa się, że jest to w dużej mierze spowodowane profilaktycznym stosowaniem leków przeciwgrzybiczych u pacjentów wysokiego ryzyka. Gatunki *Candida non-albicans* mają potencjał do wywoływania zakażeń inwazyjnych, w tym kandydemii. Są one również nierzadko przyczyną niepowodzeń terapeutycznych, wynikających z naturalnej oporności na leki przeciwgrzybicze i/lub szybko nabywanej antybiotykooporności. Szczególnie niepokojący jest stwierdzony w ostatnich latach trend rosnącej oporności na flukonazol wśród szczepów *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* [2, 27].

Etiologia zakażeń wywołanych przez *Candida* spp. uległa zmianie w 2009 roku, kiedy po raz pierwszy opisano w piśmiennictwie medycznym nowy gatunek – *Candida auris*. Jego znaczenie kliniczne systematycznie wzrasta w ostatnich latach, czego dowodem jest uznanie *C. auris* za jedno z największych zagrożeń dla zdrowia publicznego [33].

Przypadki inwazyjnych zakażeń *C. auris* o charakterze ognisk epidemicznych i wysokiej śmiertelności, notowane u pacjentów z COVID-19 leczonych na OIT, dodatkowo wzbudzają uzasadniony niepokój [24, 31, 70, 51, 75, 77, 93]. Oprócz wymienionych wyżej czynników ryzyka predysponujących do nadkażeń grzybiczych w tej grupie chorych, Prestel i wsp. [75] zwrócili uwagę na używanie przez personel medyczny, zwłaszcza w pierwszym okresie pandemii COVID-19, wielu warstw środków ochrony osobistej oraz noszenie ich przez całą zmianę (rękawiczki, fartuchy, okulary ochronne, maseczki ochronne N95, czepki, ochraniacze na buty), niewłaściwe mycie i dezynfekcję sprzętu medycznego oraz uchybienia w przestrzeganiu obowiązujących procedur dotyczących higieny rąk.

C. auris, ze względu na zdolność do przeżycia na powierzchniach nieożywionych i kontaminacji środowiska szpitalnego oraz, co odróżnia ten gatunek od innych grzybów – wysoki potencjał transmisji w środowisku i horyzontalnej (pomiędzy pacjentami) [52] – może z łatwością rozprzestrzeniać się w tych warunkach [75]. Efektywna transmisja tego drożdżaka pomiędzy ludźmi pozostaje wyjątkowa w porównaniu z innymi przedstawicielami rodzaju *Candida*. Kandydoza jest zazwyczaj wywołwana przez gatunki stanowiące w warunkach fizjologicznych składnik ludzkiego mikrobiomu, a częstym źródłem zakażenia jest przewód pokarmowy. *C. auris* nie jest jednak w stanie efektywnie kolonizować układu pokarmowego, czego prawdopodobnym wytłumaczeniem jest słaby wzrost tego gatunku w warunkach beztlenowych w jelicie grubym [73]. Co więcej, jest to też jedyny poznany dotychczas gatunek grzyba, mogący wykazywać naturalną oporność na trzy główne grupy leków przeciwgrzybiczych stosowane w praktyce klinicznej: azole, polieny oraz na echinokandyny [45]. Analiza profilów antybiotykooporności izolatów *C. auris* pochodzących z różnych części świata wykazała, że niemal w 40% są to szczepy wieloantybiotykooporne (ang. *multidrug resistant* MDR), w tym szczególnie często stwierdzana jest oporność na flukonazol (90%) i amfoterycynę B (30–40%). Dodatkowo, szczepy oporne na flukonazol, często wykazują wysokie wartości MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*) dla wori-konazolu i innych azoli nowej generacji, co przemawia za brakiem skuteczności tej grupy leków. Oporność na echinokandyny wykazuje 5–10% izolatów *C. auris* [1, 28]. Zdarzają się także szczepy oporne na wszystkie dostępne obecnie leki przeciwgrzybicze, co sprawia, że

śmiertelność w przebiegu zakażeń wywołanych przez *C. auris* sięga nawet 60% [95].

Podsumowując, najważniejsze aspekty dotyczące zagrożeń związanych z *C. auris* dotyczą [1, 27, 28]:

- szybkiego rozprzestrzeniania się szczepów tego gatunku w skali globalnej,
- wysokiego potencjału epidemicznego i zdolności utrzymywania się w środowisku szpitalnym, którą umożliwia, m.in., oporność na środki dezynfekcyjne (np. czwartorzędowe związki amoniowe i aktywne względem powierzchni związki kationowe),
- transmisja horyzontalna,
- kontaminacja i długotrwałe (do 2 tygodni) utrzymywanie się na powierzchniach nieożywionych
- możliwa długotrwała (nawet > 1 roku) kolonizacja pacjenta,
- zdolność do wywoływania zakażeń inwazyjnych (np. fungemia)
- trudności związane z laboratoryjną identyfikacją opartą na reakcjach biochemicznych
- wieloantybiotykooporność,
- konieczność wdrażania restrykcyjnych i kosztownych strategii kontroli i prewencji zakażeń w przypadku izolacji *C. auris*.

2. *Candida auris* – charakterystyka gatunku

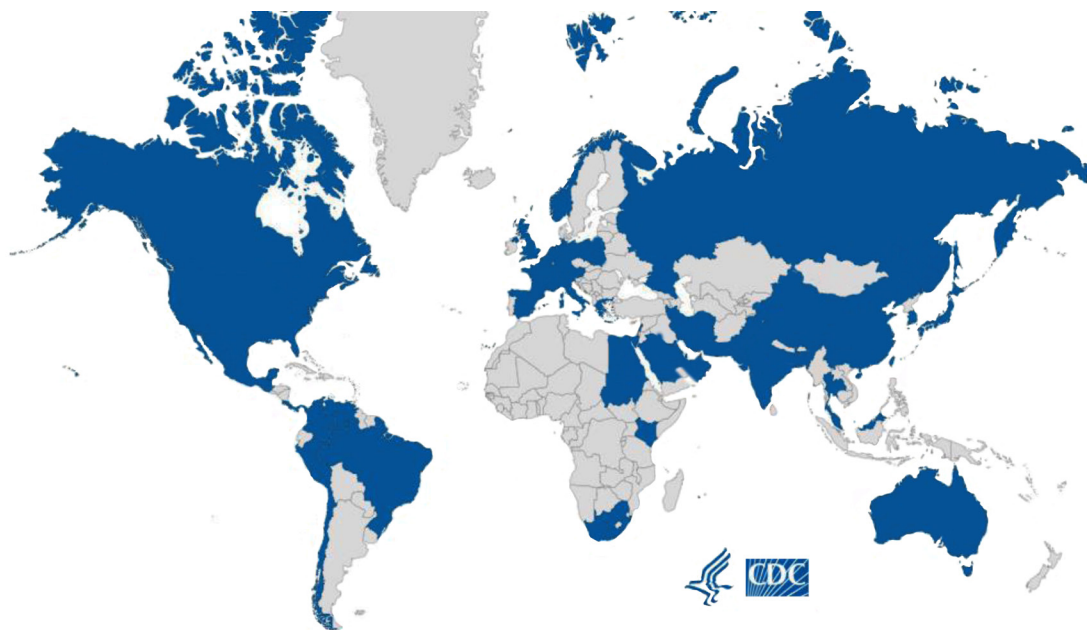
C. auris należy do gromady *Ascomycota* i klasy *Saccharomycetes*. Genom gatunku jest haploidalny. Genetyczna analiza porównawcza wykazała pokrewieństwo pomiędzy *C. auris*, a kładem *C. haemulonii*, obejmującym gatunki o sporadycznie stwierdzanym znaczeniu klinicznym i częstej wieloantybiotykooporności. Identyczność nukleotydomowa osiąga poziom 88% pomiędzy genomem *C. auris*, a genomami drożdżaków należących do wymienionego kładu i reprezentujących gatunki: *C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii* i *C. pseudohaemulonii* [72]. Kładem spokrewnionym z powyższą grupą gatunków jest *C. lusitaniae*. Genetyczne pokrewieństwo *C. auris* ze znacznie częściej izolowanymi od ludzi gatunkami, takimi jak *C. albicans*, *C. glabrata* jest dużo bardziej odległe [4, 72]. Niemniej jednak, *C. auris*, podobnie jak *C. albicans*, jest gatunkiem zaliczanym do kładu CTG, w którym kodon CTG ulega translacji na serynę, a nie na leucynę [25]. W genomie *C. auris* wykryto ortologi genów obecnych w genomie *C. albicans*, których produkty determinują grzybiczą zdolność do adaptacji do organizmu gospodarza i inwazji, w tym oligopeptydowe białka transportujące, wydzielnicze proteazy, włączając enzymy SAP (ang. *secreted aspartic proteases*), transferazy mannozyłowe, czy geny związane z tworzeniem biofilmu. Chattergee i wsp. [17] zidentyfikowali białka transportujące, stanowiące determinanty

wieloantybiotykooporności poprzez ich rolę wyrzucie (ang. *efflux*) leków z komórek grzybiczych, a ich zwiększona ekspresja może tłumaczyć niską naturalną wrażliwość tego gatunku na leki przeciwgrzybicze. Białka te należą do rodzin ABC (ang. *ATP binding cassette*) i MFS (ang. *major facilitator superfamily*). Punkty uchwytu dla poszczególnych grup leków przeciwgrzybiczych są konserwatywne u *C. auris*, włączając demetylazę 14alfa lanosterolu/ERG11 (miejsce uchwytu azoli), syntazę beta-1,3-glukanu/FKS1 (miejsce uchwytu echinokandyn), transferazę fosforybozylo-uracylu/FUR1 (miejsce uchwytu flucytozyny). Mutacje punktowe związane z antybiotykoopornością u innych gatunków *Candida* spp. wykrywane są w wielu klinicznych izolatach *C. auris* i związane są z genetycznymi kładami. Niedawno zidentyfikowano mutacje w genie ERG11 (Y132F i K143R) *C. auris*, które prowadzą do zwiększonej oporności na flukonazol [72]. Analiza porównawcza genomów reprezentujących cztery klady *C. auris* oraz trzech spokrewnionych gatunków należących do kładu *C. haemulonii*, mapowanie wewnątrz- i międzygatunkowych rearanżacji genetycznych w obrębie 7 chromosomów, wykazały, m.in., rozszerzony zakres białek transportujących i lipaz, mogących mieć związek z wirulencją *C. auris* oraz mutacje i obecność wariantów z różną liczbą kopii genu ERG11. Analiza ekspresji genów pozwoliła na identyfikację transporterów i metabolicznych regulatorów specyficznych dla *C. auris* oraz konserwatywnych w odniesieniu do spokrewnionych gatunków, co może z kolei mieć związek z różnicami dotyczącymi odpowiedzi na leczenie przeciwgrzybicze w obrębie tego kładu [72].

2.1. Epidemiologia *Candida auris*

Gatunek *C. auris* (łac. *auris* – ucho) został po raz pierwszy wyizolowany w Japonii, z wydzieliny kanału ucha zewnętrznego w przebiegu stanu zapalnego u 70-letniej pacjentki hospitalizowanej w tokijskim szpitalu [84].

Kolejne publikacje związane z opisem zakażeń wywołanych przez *C. auris* dotyczyły przypadków zapalenia ucha środkowego w Korei [60] oraz szpitalnej kandydemii w Korei Południowej [66], Indiach [16, 20, 22], południowej Afryce [71], Kuwejcie [35] i Wenezueli [14]. Pierwsze ognisko epidemiczne *C. auris* w Europie pojawiło się w 2015 roku w londyńskim szpitalu kardiochirurgicznym [86], wkrótce potem w szpitalu w Hiszpanii [44]. Ogniska epidemiczne wywołane przez *C. auris* i opisane dotychczas w piśmiennictwie zostały zebrane i wymienione w pracy przeglądowej autorstwa Desaubeaux i wsp. [33] z 2022 roku. Warto przy tym zaznaczyć, że jedynie w Portugalii, Irlandii oraz krajach skandynawskich (z wyjątkiem Norwegii) spośród krajów zachodnioeuropejskich nie pojawiły się dotychczas



Ryc. 1. Występowanie *C. auris* na świecie (oznaczone kolorem niebieskim)

Źródło: CDC [<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html>] sprawdzone: 27.09.2022.

informacje na temat izolacji *C. auris*. Krajem o największej jak dotąd liczbie potwierdzonych lub prawdopodobnych przypadków zakażeń ($n = 1157$) i kolonizacji ($n = > 3043$) *C. auris* pozostają Stany Zjednoczone [33].

Rycina 1 przedstawia dane opublikowane przez amerykańskie Centrum ds. Kontroli i Zapobiegania Chorobom (ang. Center for Disease Control and Prevention, CDC) na temat występowania *C. auris* na świecie (aktualne na dzień 15 lutego 2022 r.). Od tej daty mapa nie jest aktualizowana, ze względu na ogromne rozpowszechnienie występowania tego drobnoustroju [<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html>].

W raporcie CDC z 2019 roku, gatunek *C. auris* został zaliczony do największych zagrożeń związanych z antybiotykoopornością drobnoustrojów wraz z pałeczkami *Enterobacterales* i *Acinetobacter baumannii* opornymi na karbapenemy, *Clostridioides difficile* i *Neisseria gonorrhoeae*. *C. auris* przewyższa w tym względzie tak istotne klinicznie patogeny, jak pałeczki *Enterobacterales* wytwarzające beta-laktamazy typu ESBL (ang. *extended spectrum beta-lactamases*), metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* (ang. *methicillin resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), czy wieloantybiotykooporne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* [<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>].

Początkowe trudności związane z identyfikacją *C. auris* zainspirowały badaczy do wykonania badań retrospektywnych wśród dostępnych kolekcji szczepów grzybiczych. Re-analiza ponad 20 000 izolowanych z zakażeń inwazyjnych szczepów *Candida* spp. pochodzących z czterech kontynentów i wyizolowanych

w latach 1997–2016 (badanie SENTRY), pozwoliła na identyfikację zaledwie 6 szczepów *C. auris*, z najwcześniejszą izolacją w 2009 roku [74]. Najstarszy znany izolat *C. auris* pochodzi z 1996 roku. Był on czynnikiem etiologicznym kandydemii u pacjenta pediatrycznego w Korei Południowej [66]. Dane te wskazują, że coraz częstsze wykrywanie *C. auris* w środowisku szpitalnym ma najprawdopodobniej związek z jego niedawnym pojawieniem się w populacji, nie wynika zaś bezpośrednio z usprawnienia postępowania diagnostycznego i identyfikacji laboratoryjnej [<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-candida-auris-outbreak-healthcare-facilities-northern-italy>].

Pochodzenie *C. auris* oraz ustalenie niszy ekologicznej, z której się wywodzi, nadal pozostaje niewyjaśnione. Wyniki sekwencjonowania genomów izolatów wyhodowanych od 54 zakażonych pacjentów z Pakistanu, Indii, południowej Afryki, Wenezueli i Japonii na przełomie lat 2012–2015, wskazują na niemalże równoczesne i niezależne pojawienie się odmiennych klonalnych populacji tego drożdżaka na trzech kontynentach. Fakt, że izolaty pochodzące z południowej, wschodniej Azji, południowej Ameryki i południowej Afryki różniły się między sobą ogromną liczbą polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, wykazując jednocześnie minimalną genetyczną różnorodność w obrębie danego regionu geograficznego, czyni powyższą hipotezę wysoce prawdopodobną. Mimo, że przyczyny tego zjawiska pozostają niejasne, pojawienie się nowej lub rosnącej presji selekcyjnej obecnej w środowisku, w organizmach ludzi lub zwierząt powinno być wzięte pod uwagę w sposób szczególny [68]. Udział

czynników antropogenicznych, w tym stosowanie azoli w lecznictwie i rolnictwie należy do najczęściej sugerowanych przykładów powyższej presji selekcyjnej [23]. Pojawiają się opinie poddające w wątpliwość stosowanie leków azolowych jako bezpośredniego wytłumaczenia ekspansji tego drobnoustroju, biorąc pod uwagę jego nagłe pojawienie się w różnych częściach świata. Casadevall i wsp. [15] zaproponowali tezę, łączącą globalne ocieplenie klimatu ze zdolnością niektórych grzybów, bytujących naturalnie w środowisku, do rozwoju termicznej tolerancji i adaptacji do temperatury ciała człowieka, ze względu na malejący gradient pomiędzy temperaturą otoczenia a średnią temperaturą ciała ssaków, możliwe związane z tym procesem (np. w wyniku wyższego poziomu promieniowania UV) mutacje genetyczne, czy nawet nabycie pewnych cech warunkujących wirulencję poprzez transfer DNA od innych patogennych dla ludzi gatunków *Candida* w kontekście zmieniających się nisz ekologicznych. Autorzy ci sugerują, że *C. auris* może być grzybem pochodzenia środowiskowego, w tym saprofitem roślin. O jego niedawno nabytej termotolerancji może świadczyć preferencyjna kolonizacja powierzchni skóry (nie zaś charakteryzującego się wyższą temperaturą światła jelita) oraz początkowo stwierdzany związek z zakażeniem ucha (którego temperatura jest niższa niż wewnątrz ciała). W procesie domniemanej adaptacji możliwy jest także udział gospodarza pośredniego – ptaków – biorąc pod uwagę zdolność *C. auris* do wzrostu w temperaturze 42°C. Ptaki mogą mieć udział w transmisji *C. auris* z ekosystemów środowiskowych do obszarów wiejskich, gdzie ludzie i ptaki pozostają w bliskim kontakcie, a następnie do miast, w tym do środowiska szpitalnego. Niedawna izolacja *C. auris* ze środowiska, obejmująca zarówno izolaty wrażliwe, jak i wieloantybiotykooporne na jednej z plaż na wyspach Andaman (Indie), stanowi pierwsze naukowe potwierdzenie istnienia środowiskowej niszy (morski ekosystem) dla tego gatunku, będąc jednocześnie wsparciem dla wspomnianej wyżej hipotezy, łączącej proces globalnego ocieplenia z pojawieniem się tego drobnoustroju w ludzkiej populacji [4].

Do tej pory zidentyfikowano 5 genetycznie odmiennych kładów *C. auris*, [19, 33]. Cztery z nich (kład I–IV) są ze sobą w dużym stopniu spokrewnione genetycznie (98,7% średniej identyczności par nukleotydów) [72]:

- kład I, południowo-azjatycki, obejmujący szczepy wykryte w Indiach i Pakistanie,
- kład II, wschodnio-azjatycki, obejmujący szczepy wykryte w Japonii i Korei
- kład III, południowo-afrykański, obejmujący szczepy wykryte w południowej Afryce,
- kład IV, południowo-amerykański, obejmujący szczepy wykryte w Kolumbii i Wenezueli,
- kład V, wykryty w 2019 roku w Iranie, u 14-letniej pacjentki z otomykozą, która nigdy nie podróżo-

wała za granicę; szczep różnił się od pozostałych kładów > 200 000 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów [18].

W niektórych krajach (m.in., w Kanadzie, Kenii, Stanach Zjednoczonych, Niemczech, Wielkiej Brytanii) zidentyfikowano izolaty należące do różnych kładów, co wskazuje na filogeograficzne ich „wymieszanie się”, wynikające z przemieszczania się ludzi, w tym osób mających wcześniejszy kontakt z ośrodkami leczniczymi [11, 19, 49]. Wszystkie klady, z wyjątkiem II, łączono już z ogniskami epidemicznymi zakażeń inwazyjnych. Kład II wydaje się wykazywać tendencję do wywoływania zakażeń ucha [19].

Chow i wsp. [19] wysunęli tezę o globalnym kontekście filogeografii *C. auris*, struktury populacyjnej i mechanizmów związanych z opornością tego drożdżaka na leki przeciwgrzybicze. Ustalono, że pochodzenie każdego z czterech analizowanych (lata 2004–2018) kładów *C. auris* nie przekracza ostatnich 360 lat, zaś epidemiczne grupy szczepów należące do kładów I, III i IV pojawiły się najprawdopodobniej 36–38 lat temu. Informacja ta zbiega się w czasie (lata 80. XX wieku) z rozpoczęciem stosowania azoli w lecznictwie, rolnictwie (fungicydy, które mogą ulegać akumulacji w glebie) oraz początkiem epidemii AIDS, która doprowadziła do zwiększonego stosowania leków przeciwgrzybiczych w przebiegu towarzyszących rozwojowi AIDS nadkażeń grzybiczych.

2.2. Wirulencja *Candida auris*

Rozwój zakażenia grzybiczego uwarunkowany jest zarówno charakterystycznym dla danego szczepu potencjałem patogennym związanym z wytwarzaniem czynników wirulencji, jak i zdolnością organizmu gospodarza do kontroli nad wzrostem potencjalnego patogenu [102].

C. auris wykazuje szereg przystosowań warunkujących adaptację zarówno do nisz środowiskowych, jak i obecnych w organizmie gospodarza, co wpływa jednocześnie na potencjał patogenny tego gatunku. Przeprowadzone do tej pory badania nad wirulencją *C. auris* obejmowały różne modele, począwszy od badań prowadzonych w warunkach *in vitro*, przez wykorzystanie zwierząt doświadczalnych (*in vivo*), w tym myszy, nicieni (*Caenorhabditis elegans*), owadów (*Galleria mellonella*, *Drosophila melongaster*) i ryb (*Danio rerio*), po doświadczenia przeprowadzane w warunkach *ex vivo* (modele ustne, skórne). Wyniki tych badań nierzadko różnią się w zależności od zastosowanego modelu, wskazują także na różnice dotyczące wirulencji w kontekście badanego szczepu, co sprawia, że wiele aspektów związanych z wirulencją tego drożdżaka nadal oczekuje na naukowe wyjaśnienie [33, 45].

2.2.1. Zmienność morfologiczna

Plastyczność morfologiczna postrzegana jest jako jeden z kluczowych determinantów warunkujących szybką adaptację do zmieniających się warunków środowiskowych i wpływających na zwiększenie wirulencji patogenów grzybiczych.

Początkowo uważano, że gatunek *C. auris* jest niezdolny do wzrostu w postaci grzybni prawdziwej/pseudogrzybni, który jest kluczowy dla inwazji tkanek gospodarza [34, 101]. Yue i wsp. [101] dowiedli istnienia trzech typów komórek wytwarzanych przez *C. auris*: typowych form drożdżakowych (ang. *yeast cells*, YC), komórek drożdżakowych zdolnych do filamentacji (ang. *filamentation-competent yeast cells*, FCYC) oraz form filamentacyjnych/nitkowatych (ang. *filamentous*, F), co stanowi przykład, tzw. przełączania fenotypowego (ang. *phenotype switching*). Dziedziczny proces przełączania zachodzi na drodze YC-F; nie dziedziczny i uzależniony od uwarunkowań środowiskowych pozostaje proces przełączania z formy FCYC na F. Co więcej, przełączanie pomiędzy formą YC a fenotypem F zachodzi podczas zakażenia układowego, w wyniku pasażu przez organizm myszy, zaś zmiana z formy FCYC na F zachodzi pod wpływem zmian temperatury. Niska temperatura promuje fenotyp F, zaś wysoka – FCYC. Fenotyp F przechodzi w fenotyp FCYC w temperaturze odpowiadającej fizjologicznej ciepłocie organizmu gospodarza (37°C) i w warunkach *in vivo*, co odróżnia *C. auris* od *C. albicans* (której filamentacja jest indukowana pod wpływem wysokiej temperatury), przy czym komórki FCYC utrzymują zdolność do filamentacji. Kolonizacja powierzchni skóry, typowa dla *C. auris*, może sprzyjać powstawaniu form F, które jednocześnie wydzielają mniejsze ilości proteaz aspartylowych SAP, przez co mogą one uczestniczyć w ustaleniu komensalnej interakcji z organizmem gospodarza. Ponadto, zdolność do tworzenia pseudogrzybni przez *C. auris* zaobserwowano w wyniku ekspozycji na działanie 10% NaCl, co sugeruje możliwość zachodzenia procesu filamentacji pod wpływem bliżej nieznanych czynników środowiskowych. Analiza porównawcza profilu transkrypcyjnego form YC i F wykazała zwiększoną ekspresję genów związanych z filamentacją w fenotypie F, zróżnicowaną ekspresję genów warunkujących skład ściany komórkowej lub związanych z powierzchnią komórek oraz – co okazało się szczególnie istotne – odmienny poziom aktywności genów związanych z metabolizmem. Fenotyp F wykazywał zmniejszoną ekspresję genów uczestniczących w cyklu Krebsa i glikolizie, zwiększona zaś była ekspresja genów uczestniczących w metabolizmie kwasów tłuszczowych.

Borman i wsp. [10] zaobserwowali występowanie tzw. form agregujących i nie-agregujących *C. auris* w warunkach *in vitro* i badali patogenność tego drożdżaka z wykorzystaniem modelu *Galleria mellonella*.

Formy agregujące (powstałe w wyniku tego, że komórki potomne nie oddzieliły się od siebie po procesie pączkowania) charakteryzowały się mniejszą wirulencją, zaś formy nie-agregujące dorównywały zjadliwością *C. albicans*. Podobne wyniki, związane z większą wirulencją form nie-agregujących przy wykorzystaniu analogicznego modelu *in vivo*, zostały uzyskane przez innych badaczy [46, 47, 90], przy czym Garcia-Bustos i wsp. [47] wykazali mniejszą niż *C. albicans*, ale większą niż *C. parapsilosis*, wirulencję szczepów *C. auris*. Autorzy ci stwierdzili także zdolność *C. auris* do filamentacji w zastosowanym modelu zakażenia *in vivo*, przy czym obie formy morfologiczne drożdżaka wykazywały różny stopień tworzenia pseudogrzybni, którą można traktować jako determinant patogenności zależny od szczepu. Histologicznie, zdolności inwazyjne *C. auris* i *C. albicans* były podobne, z efektywnym rozprzestrzenianiem się zarówno form drożdżakowych jak i filamentacyjnych, począwszy od wczesnych etapów zakażenia, z wyjątkiem silnego tropizmu *C. auris* do dróg oddechowych [47]. Garcia-Bustos i wsp. [46] stwierdzili, że zdolność filamentacji niekoniecznie jest głównym determinantem patogenności *C. auris*, biorąc pod uwagę fakt, że mniej wirulentne formy agregujące wykazują silniejszą zdolność do tworzenia pseudogrzybni. Mniejszą wirulencję form agregujących *C. auris* można łączyć z ich słabszą zdolnością do rozprzestrzeniania się w organizmie gospodarza [10]. Odmienne wyniki opublikowali Wurster i wsp. [100], stwierdzając brak korelacji pomiędzy zdolnością *C. auris* do agregacji a wirulencją w zastosowanym modelu zakażenia *Drosophila melongaster*, przy czym izolaty *C. auris* doprowadziły do wyższej śmiertelności wśród zakażonych owadów niż *C. albicans*.

Stwierdzono zdolność form nie-agregujących do tworzenia biofilmu [47, 90]. Brown i wsp. [12] poddali badaniu agregujące i nie-agregujące izolaty *C. auris* w kontekście ich zdolności do tworzenia biofilmu i stwierdzili wysoki poziom heterogenności wśród analizowanych fenotypów. Niezależnie od zdolności tworzenia biofilmu, zidentyfikowano unikalne transkrypcyjne profile obu fenotypów podczas tworzenia biofilmu z komórek planktonicznych. W przypadku biofilmu tworzonego przez agregujący izolat stwierdzono zwiększenie ekspresji genów kodujących komponenty ściany i błony komórkowej, w tym białek biorących udział w adhezji do powierzchni nieożywionych i komórek gospodarza oraz inwazji i przeżyciu patogenu (na przykładzie innych gatunków grzybów). Proces agregacji wpływa zatem na transkryptom grzybów podczas tworzenia biofilmu. Ponadto, oba fenotypy wywołały minimalną odpowiedź w przebiegu modelu zakażenia tkanki nabłonkowej w warunkach *in vitro*. W przypadku rany, obie formy doprowadziły do induk-

cji silniejszej odpowiedzi, przy czym fenotyp agregujący wykazał silniejsze właściwości prozapalne.

Stwierdzono że tworzenie agregatów przez *C. auris* jest indukowane działaniem leków przeciwgrzybiczych, w tym triazoli i echinokandyn. Ta forma fenotypowa charakteryzuje się też lepszą zdolnością przetrwania w porównaniu z pojedynczymi komórkami *C. auris* [91]. Sugeruje się, że trudno ulegające dyspersji agregaty komórek *C. auris* podlegają osłabionej penetracji przez środki dezynfekcyjne, promieniowanie UV, co może przyczyniać się do utrzymywania się grzyba w środowisku szpitalnym [27]. Short i wsp. [91] stwierdzili, że zdolność do agregacji komórkowej zwiększa zdolność przeżycia *C. auris*, co łączy się także ze zwiększoną ekspresją genów związanych z tworzeniem biofilmu. Ponadto, stwierdzono zdolność form agregujących do przeżycia przez co najmniej dwa tygodnie po poddaniu ich działaniu klinicznych stężeń NaOCl [91].

Fan i wsp. [38] wykazali fenotypowe zróżnicowanie wśród klinicznych izolatów *C. auris* reprezentujących cztery różne genetyczne kłady. Dotyczyło ono zarówno morfologii komórek (obecne formy drożdżakowe, filamentacyjne, agregujące, wydłużone), jak i kolonii na podłożu hodowlanym, skłaniając autorów do wysnuenia wniosku o powszechnym występowaniu morfologicznej plastyczności u reprezentantów tego gatunku. Co więcej, zmiany morfologiczne nie były uzależnione od indukcji przez organizm gospodarza (pasażowanie w organizmie myszy), występowała ona także w hodowli *in vitro*. Badania z wykorzystaniem modelu *Galleria mellonella* wykazały większą zjadliwość form filamentacyjnych i wydłużonych *C. auris* oraz rozbieżności dotyczące wartości MIC badanych leków przeciwgrzybiczych dla poszczególnych form fenotypowych tego gatunku. Podobne obserwacje, dotyczące tworzenia różnych morfologicznych fenotypów (komórki okrągłe, wydłużone, pseudogrzybni) przez kliniczny szczep *C. auris*, w zależności od zastosowanych warunków hodowli, opisali Wang i wsp. [94]. Potwierdzili oni zdolność tworzenia pseudogrzybni drożdżaka w wyniku ekspozycji na wysokie stężenia NaCl, co może odzwierciedlać zaburzenia procesu podziału komórkowego w obecności czynników stresogennych. Autorzy wykazali znacznie mniejszą wirulencję *C. auris* w porównaniu z *C. albicans*, wykorzystując zarówno model uogólnionego zakażenia u immunokompetentnych myszy, jak i model *Galleria mellonella* [94]. Forgacs i wsp. [41] wykorzystali z kolei model kandydemii u neutropenicznych myszy, by ocenić wirulencję izolatów *C. auris* należących do czterech genetycznych kładów i w odniesieniu do *C. albicans*. Gatunek *C. auris* charakteryzował się mniejszą wirulencją niż *C. albicans*, niezależnie od kładu. Stwierdzono jednak różnice w wirulencji pomiędzy izolatami należącymi do tego samego kładu oraz zróżnicowaną wirulencję poszcze-

gólnych kładów – wskaźnik śmiertelności myszy oscylował bowiem między 44% (klad wschodnio-azjatycki) a 96% (klad południowoamerykański). Agregaty blastokiniidiów i komórek pączkujących *C. auris* wykryto w sercu, nerkach i wątrobie zakażonych myszy, przy czym serce i nerki były najsilniej obciążonymi narządami, niezależnie od kładu, co korelowało ze śmiertelnością zwierząt.

Fakhim i wsp. [37] wykorzystali do badania potencjału patogenego *C. auris* model zakażenia uogólnionego immunokompetentnych myszy, porównując jednocześnie ten gatunek z *C. haemulonii*, *C. glabrata* i *C. albicans*. Wysoką wirulencją charakteryzował się gatunek *C. albicans*, a następnie *C. auris*, *C. glabrata* i *C. haemulonii*, przy czym potencjał patogeny badanych gatunków był porównywalny. Nerki, śledziona wątroba i płuca zakażonych zwierząt były najbardziej obciążone zakażeniem grzybiczym. Pseudogrzybnie stwierdzono w tkankach nerek myszy zakażonych *C. albicans*; w odniesieniu do pozostałych gatunków *Candida* wykazano obecność jedynie form drożdżakowych, co, według autorów, może tłumaczyć fakt częstej ich izolacji z hodowli krwi zakażonych pacjentów. Badania z wykorzystaniem myszy w immunosupresji wskazały na mniejszą wirulencję *C. auris* w porównaniu z *C. albicans*, ale większą niż *C. haemulonii*. Analiza histopatologiczna wykazała obecność agregatów komórek drożdżakowych *C. auris* w tkankach nerek myszy, podczas gdy inwazyjne formy nitkowate w obrębie tego narządu tworzyła *C. albicans*. Agregacja komórek może stanowić strategię pomocną w unikaniu działania układu immunologicznego gospodarza (np. ataku fagocytów) i przeżyciu w obrębie tkanek [6].

Unikanie przez *C. auris* działania układu immunologicznego gospodarza, w tym jego mechanizmów wrodzonej odporności, jawi się obecnie jako jedna z ważniejszych strategii tego drożdżaka, wpływających na jego potencjał patogeny. Wang i wsp. [95] porównali mechanizmy odporności naturalnej indukowane przez kliniczny szczep *C. auris* BJCA001 i *C. albicans* SC5314 w warunkach *in vitro* i *in vivo*, wskazując na słabsze właściwości immunostymulacyjne *C. auris* i łącząc różnice między dwoma gatunkami z cechami ich ściany komórkowej. Wykorzystując ludzkie neutrofile oraz model inwazyjnej kandydozy *Danio rerio*, Johnson i wsp. [56] stwierdzili brak zdolności neutrofilek do zabijania *C. auris*. W przeciwieństwie do *C. albicans*, zakażeniu *C. auris* towarzyszy niewystarczająca rekrutacja tych komórek immunologicznie czynnych do ogniska zakażenia; nie powstają też, tzw. struktury NET (ang. *neutrophil extracellular traps*) – składające się z DNA, histonów i białek o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Wykazano, że unikanie działania neutrofilek przez *C. auris* jest związane z mannozylacją ściany komórkowej (modele *ex vivo* i *Danio rerio*), zaś genetyczne

„wyłączenie” ścieżek mannozyłacji zmniejsza zawartość mannanu w zewnętrznej warstwie ściany, powoduje odsłonięcie składników immunostymulujących, co skutkuje silniejszym zaangażowaniem neutrofilii, fagocytozą i zabijaniem komórek grzyba. Mechanizm tej ucieczki immunologicznej wyróżnia *C. auris* na tle innych gatunków *Candida* [53]. Badania przeprowadzone przez Wang i wsp. [95] wskazują, że zewnętrzna warstwa mannanu maskuje wewnętrzną warstwę beta-glukanu, chroniąc ją przed ekspozycją i detekcją przez receptory komórek wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, takich jak makrofagi. Osłabiona aktywacja makrofagów prowadzi do kolonizacji i proliferacji *C. auris* poprzez unikanie eliminacji przez neutrofile. Zaburzenie ciągłości powłoki mannanowej umożliwia ekspozycję beta-glukanu, który ulega rozpoznaniu przez receptory makrofagów. Interakcja ta skutkuje aktywacją ścieżki sygnałowej MAPK, uwolnieniem prozapalnych cytokin i chemokin, a następnie aktywacją i napływem neutrofilii, które eliminują komórki grzybicze. Na słabsze zdolności immunozapalne *C. auris* w porównaniu z *C. albicans* w przeprowadzonych badaniach *in vivo* wskazują: persystencja *C. auris* w organizmie gospodarza, unikanie rozpoznawania i eliminacji przez wrodzone mechanizmy odpornościowe, mniejsza liczba komórek immunologicznie czynnych (neutrofile, leukocyty, komórki CD45+, makrofagi, monocyty, komórki NK) w zakażonych tkankach, niższe surowicze stężenia prozapalnych cytokin i chemokin.

Bruno i wsp. [13] uzyskali odmienne wyniki, wykazując, że *C. auris* jest silnym induktorem wrodzonych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej. Gatunek ten indukuje specyficzny transkryptom w ludzkich komórkach jednojądrzastych, silniejszą odpowiedź cytokinową w porównaniu z *C. albicans*, niemniej jednak cechuje go słabsza zdolność do wywoływania lizy makrofagów. Charakterystyczne dla *C. auris* mannoproteiny są w dużej mierze związane z indukcją mechanizmów naturalnej odporności przez rozpoznawanie receptorów lektynowych typu C. Badania *in vivo* przy wykorzystaniu modelu uogólnionej kandydozy wykazały mniejszą wirulencję *C. auris* w porównaniu z *C. albicans*.

Wang i wsp. [95] tłumaczą rozbieżności w wynikach uzyskanych przez wspomniane dwie, niezależne grupy badawcze, m.in., różnymi rodzajami użytych w eksperymentach komórek immunologicznie czynnych i szczepów *C. auris*, oraz innymi szczegółami metodologicznymi. Warto też zaznaczyć, że poszczególne szczepy *C. auris* mogą różnić się chemiczną strukturą mannanów obecnych w ścianie komórkowej, co może przekładać się na zróżnicowane interakcje z układem immunologicznym. Ponadto istnieją zapewne inne, jeszcze nieznanne czynniki i mechanizmy immunologiczne uczestniczące w rozpoznawaniu *C. auris* jako patogenu.

Na silniejszą niż oczekiwano, przy umiarkowanym stopniu inwazji tkankowej, immunogenną aktywność *C. auris*, wskazują też wyniki badań opublikowane przez Garcia-Bustos i wsp. [46]. Gatunek ten wywoływał silniejszą odpowiedź zapalną niż *C. albicans* i *C. parapsilosis*, zwłaszcza wśród szczepów nie-agregujących, wykazywał szczególną zdolność do inwazji układu oddechowego larw *G. mellonella* oraz różnice dotyczące tropizmu tkankowego w zależności od szczepu.

Można zatem przyjąć, że heterogenność wirulencji stanowi wsparcie hipotezy sugerującej, że morfogenetyczna zmienność jest naturalną, wrodzoną cechą *C. auris* oraz wykładnikiem zdolności adaptacyjnych do różnych czynników stymulujących i warunków środowiskowych [47].

Jedno z najnowszych badań wskazuje na znaczące zwiększenie ekspresji białka PD-1 (ang. *programmed cell death protein 1*) na powierzchni limfocytów T oraz jego ligandu PD-L1 na makrofagach myszy zakażonych agregującym szczepem *C. auris* w porównaniu do niezakażonych myszy [99]. Białko PD-1 odgrywa znaczącą rolę w hamowaniu odpowiedzi immunologicznej poprzez modulację aktywności limfocytów T, aktywację apoptozy antygenowo-swoistych komórek T i hamowanie apoptozy regulatorowych komórek T. Przezbłonowe białko PD-L1 pełni ko-inhibitora odpowiedzi immunologicznej, a jego interakcja z PD-1 doprowadza do osłabienia proliferacji komórek PD-1-pozytywnych, hamowania wydzielania cytokin i indukcji apoptozy [50]. Indukcja PD-1/PD-L1 w przebiegu sepsy wywołanej przez *C. auris* może zatem promować supresyjny fenotyp immunologiczny (podobnie do wcześniejszych doniesień na temat kandydemii wywołanej przez *C. albicans*), a jej blokada mogłaby być brana pod uwagę jako potencjalna immunoterapeutyczna strategia walki z kandydozą wywołaną przez *C. auris* [99].

Zamith-Miranda i wsp. [102] zwrócili uwagę na zdolność *C. auris* do wydzielania zewnątrzkomórkowych pęcherzyków (ang. *extracellular vesicles*, EVs) i ich potencjalnego udziału w patogenezie zakażeń. Grzybicze EV zawierają wiele biologicznie aktywnych substancji, w tym czynników wirulencji oraz substancji regulatorowych, co wskazuje na ich udział w aktywacji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej oraz wpływ na przebieg zakażenia grzybiczego. Molekularna analiza porównawcza EV wytwarzanych przez *C. auris* i *C. albicans* oraz badanie ich wpływu na modulowanie efektorowych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej wykazało, że EV uwalniane przez *C. auris* (w odróżnieniu od *C. albicans*) zwiększały adhezję drożdżaka do komórek nabłonkowych. Ponadto EV *C. auris* promowały przeżycie komórek grzybiczych, podczas gdy EV uwalniane przez *C. albicans* przygotowywały makrofagi do wewnątrzkomórkowego zabijania komórek drożdżakowych. EV wydzielane przez oba gatunki

doprowadzały do aktywacji komórek dendrytycznych, wydłużających się ze szpiku kostnego. Można zatem zakładać, że EV *C. auris* wykazują właściwości immunoregulatorowe, czy czym niektóre z nich są odmienne od tych, które wykazuje *C. albicans*.

2.2.2. Wytwarzanie enzymów litycznych

C. auris jest gatunkiem zdolnym do wytwarzania enzymów warunkujących procesy adaptacji i inwazji, takich jak fosfolipazy, lipazy, wydzielnicze proteazy aspartylowe SAP; wykazuje też aktywność hemolityczną [17, 64].

2.2.3. Adaptacja do stresogennych warunków środowiskowych

Zdolność do wzrostu w wysokich temperaturach przekraczających 40°C i tolerancja wysokich (10%) stężeń NaCl odróżnia *C. auris* od pozostałych przedstawicieli tego rodzaju. Sugeruje się, że morfologiczna tranzycja grzyba poprzez tworzenie struktur przypominających pseudostrzępki w odpowiedzi na wysokie stężenia soli, może stanowić przykład adaptacji do stresogennych warunków. Wspomniane cechy mogą też sprzyjać przeżyciu i utrzymywaniu się tego drożdżaka na powierzchniach ożywionych (np. ludzka skóra) i nieożywionych [34].

Sugerowana jest rola różnych ścieżek sygnałowych w rozwoju oporności *C. auris* na warunki stresogenne. Jedną z nich jest ścieżka SAPK (ang. *stress activated proteinase kinase signalling pathway*), która odgrywa rolę w odpowiedzi na stres środowiskowy w postaci stresu osmotycznego, czy nadtlenu wodoru. Proponowany jest jej udział w tworzeniu agregatów komórek *C. auris*, jako potencjalnej strategii przetrwania. Inne ścieżki są zależne od białkowej fosfatazy kalcyneuryny, która wchodzi w interakcję z białkiem chaperonowym Hsp90. Białko Hsp90 ulega konsytywnej nadekspresji, wykazuje różnorodne funkcje i jest zasadnicze dla wzrostu tego drożdżaka. Prawdopodobnie odgrywa ono znaczącą rolę w wirulencji, termicznej tolerancji, tolerancji na stres osmotyczny i w wieloantybiotykooporności. Jest ono, m.in., negatywnym regulatorem filamentacji *C. auris*, jego inaktywacja prowadzi do powstania wydłużonych form przypominających pseudogrzybnie, morfologicznie podobnych do tych, które są indukowane pod wpływem wysokiego zasolenia czy pasażu przez organizm ssaka. Jego zahamowanie prowadzi do zwiększonej wrażliwości na flukonazol, co wykazano na przykładzie izolatów *C. auris* nie mających powszechnych w obrębie tego gatunku mutacji w genie *ERG11*, które związane są z opornością na azole [58].

2.2.4. Tworzenie biofilmu

Biofilm jest rodzajem ustrukturyzowanej „społeczności” drobnoustrojów, osadzonej w zewnątrzkomórkowej macierzy i utworzonej na powierzchni ożywionej lub nieożywionej. Struktura ta może tworzyć się na powierzchni ludzkich tkanek, błon śluzowych lub na powierzchni biomateriałów (np. cewników) i stanowić ognisko zakażenia, z którego drobnoustroje mogą dostawać się do innych miejsc [34]. Wykazano, że *C. auris* może tworzyć biofilm w warunkach *in vitro*, aczkolwiek jego biomasa wydaje się być słabsza niż biofilm tworzony przez *C. albicans* [90]. Co więcej, zdolność tworzenia biofilmu jest zależna od szczepu oraz typu morfologicznego/fenotypowego. Podobnie jak biofilm tworzony przez inne gatunki *Candida*, struktura ta stanowi ochronę przed działaniem antybiotyków i fagocytozą [72]. Sherry i wsp. [90] stwierdzili zróżnicowaną zdolność *C. auris* w zakresie adherencji do powierzchni polimerowych, tworzenia biofilmu i oporności na leki, które są aktywne względem komórek planktonicznych. Kaspofungina okazała się w dużym stopniu nieaktywna względem biofilmu *C. auris*. Oporność biofilmu tworzony przez drożdżaki na leki przeciwgrzybicze może być wynikiem, m.in., osłabionej penetracji leku przez jego strukturę oraz być związana ze zwiększoną ekspresją genów związanych z biofilmem przy zwiększonej aktywności pomp wyrzutu czy enzymów modyfikujących strukturę glukanu [45].

Zdolność *C. auris* do tworzenia biofilmu stanowi jedno z kluczowych wyzwań w praktyce klinicznej w związku z powszechnym stosowaniem biomateriałów. Kolonizacja powierzchni u pacjentów poddawanych procedurom związanym z instrumentalizacją, zwiększa ryzyko rozwoju inwazyjnej kandydozy i szpitalnego ogniska epidemicznego, a także zmniejsza szansę eradykacji kolonizacji pacjenta. W konsekwencji, [inwazyjna kandydoza wywołana przez *C. auris* w wielu przypadkach jest związana ze stosowaniem biomateriałów i innych medycznych urządzeń, przyjmując klinicznie postaci, m.in., zakażeń układu moczowego u pacjentów cewnikowanych, zakażeń układu sercowo-naczyniowego, czy zakażeń w u pacjentów neurochirurgicznych [45].

Kean i wsp. [59] przeprowadzili transkryptomyczną analizę biofilmów *C. auris*, stwierdzając zwiększoną, co najmniej dwukrotnie, ekspresję 791 genów podczas tworzenia biofilmu (vs. 464 geny w komórkach planktonicznych). Wykazano zwiększoną, na wszystkich etapach powstawania biofilmu, ekspresję genów ściany komórkowej, biorących udział w adhezji (ang. *adhesin-related glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell wall genes*) oraz w biofilmach stadium pośredniego i dojrzałego, genów kodujących pompy wyrzutu należące do rodzin ABC i MFS. Zablockowanie aktywności

tych pomp zwiększało wrażliwość mikroorganizmu na flukonazol 4-16-krotnie.

Biofilm tworzony przez *C. auris* charakteryzuje się zwiększoną (w porównaniu z komórkami planktonicznymi) tolerancją na działanie środków dezynfekcyjnych, w tym na klinicznie znaczące stężenia chlorheksydyny (0,5%, 2%) i nadtlenu wodoru (3%). W jednym z badań eradykację osiągnięto wyłącznie przy zastosowaniu powidonu jodu [57]. Sherry i wsp. [90] wykazali efektywność chlorheksydyny względem planktonicznych komórek *C. auris* oraz biofilmu, sugerując możliwe zastosowanie jej standardowych stężeń w dezynfekcji skóry i ran.

2.3. Oporność *Candida auris* na leki przeciwgrzybicze

Jedną z najważniejszych cech *C. auris* determinujących znaczenie tego gatunku jako „superpatogenu”, stanowiącego jedno z największych zagrożeń dla zdrowia publicznego w XXI wieku, jest jego częsta wieloantybiotykooporność, w tym również oporność na wszystkie grupy chemiczne leków przeciwgrzybiczych, dostępne obecnie w praktyce klinicznej. Zjawisko to znacząco ogranicza możliwość skutecznego leczenia zakażeń [45].

Gatunek *C. auris* zdołał wykształcić szeroki zakres mechanizmów oporności na leki, które obejmują: zmianę miejsca docelowego (mutacje) lub jego nadekspresję, zmianę przepuszczalności osłon komórkowych lub aktywny wyrzut leku z komórki, aktywację ścieżek komórkowych warunkujących odpowiedź na warunki stresogenne i tworzenie biofilmu.

Szczepy *C. auris* są filogenetycznie spokrewnione z gatunkami *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. haemulonii*, które charakteryzują się naturalną lub nabytą opornością na flukonazol i/lub amfoterycynę B [68]. Jak przedstawiono wyżej, odsetek szczepów *C. auris* opornych na flukonazol, amfoterycynę B i echinokandyny przekracza odpowiednio 90%, 30% i 5% [17, 36]. Według Chow i wsp. [19] kład I wykazywał największy odsetek szczepów MDR (45%, oporność na dwie grupy leków przeciwgrzybiczych), jako jedyny obejmował też szczepy o rozszerzonej wieloantybiotykooporności (oporność na trzy grupy leków, 3%). Kład II wykazywał największy odsetek szczepów wrażliwych (86%).

Niemalże wszystkie szczepy *C. auris* wykazują oporność *in vitro* na flukonazol, przy czym niektóre szczepy wykazują podwyższone wartości MIC w stosunku do innych leków należących do grupy azoli, przewyższając wartości MIC raportowane dla *C. albicans* czy *C. glabrata* [33]. Oporność *C. auris* na azole, które hamują biosyntezę ergosterolu – głównego składnika grzybiczej błony komórkowej – uwarunkowana jest mutacjami w obrębie genu *ERG11*, kodującego 14-alfa-demetylazę

lanosterolu, enzymu, który bierze udział w demetylacji lanosterolu, będącego prekursorem ergosterolu. Są to substytucje aminokwasowe typu: Y132F, K143R, F144, F126T i VF125AL (znana także jako F126L), których obecność stwierdzana jest wśród szczepów *C. auris* należących do różnych genetycznych kładów [33, 68, 82]. Raportowano także szczepy *C. auris* wrażliwe na flukonazol (MIC = 1–8 mg/l), u których obecne były mutacje typu Y132F lub K143R, co sugeruje istnienie dodatkowych mechanizmów warunkujących oporność [21, 68, 81]. Należą do nich m.in., zwiększona ekspresja genu *ERG11* wynikająca ze zwiększonej ilości czynników transkrypcyjnych *ERG11* lub zwiększonej liczby kopii tego genu [7, 19, 72]. W obu tych przypadkach wysokie stężenie cząsteczki stanowiącej punkt uchwytu dla leku „rozcieńcza” końcowy efekt aktywności środka terapeutycznego [25]. Oporność na azole wynika też ze zwiększonej aktywności białek transportowych i pomp wyrzutu. Należą one do rodzin typu ABC i MFS, i odpowiadają im, odpowiednio, pompy typu CDR1 i MDR1. Są one jednocześnie ortologami białek transportujących leki zidentyfikowanych u *C. albicans* [7, 81, 82]. Stwierdzono, że pompy CDR1 and MDR1 ulegają silniejszej ekspresji w komórkach klinicznych szczepów *C. auris* opornych na leki triazolowe, a nadekspresja CDR1 znacząco przyczynia się do klinicznej oporności na tę grupę leków [81]. Zwiększona aktywność pomp wyrzutu typu ABC u *C. auris* w porównaniu z *C. glabrata* może stanowić mechanistyczną podstawę wytłumaczenia naturalnej oporności *C. auris* na leki azolowe [6].

Fan i wsp. [39] opisali kliniczny szczep *C. auris* (BJCA002) należący do kładu III (południowo-afrykański) charakteryzujący się opornością na flukonazol i amfoterycynę B w oparciu o proponowane wartości graniczne i porównali jego właściwości genetyczne i biologiczne z wcześniej opisanym [94] szczepem BJCA001, charakteryzującym się wrażliwością na badane leki przeciwgrzybicze i należącym do kładu I (południowo-azjatycki). Stwierdzono mniejszą wirulencję opornego szczepu BJCA002 niż wrażliwego BJCA001 przy zastosowaniu dwóch typów modeli doświadczalnych: *Galleria mellonella* oraz zakażenia układowego u myszy BALB/c. Szczep BJCA002, w odróżnieniu od BJCA001, miał mutacje w genach związanych z antybiotykoopornością, w tym mutację typu hot-spot w genie *ERG11* (VF125AL, tj. V125A i F126L) oraz mutacje w genach *CDR1*, *MDR1*, a także *TAC1* i *MMR1* (prawdopodobnie pełniących rolę transkrypcyjnych regulatorów genów *CDR1* i *MDR1*) [39].

Wykazano, że *C. auris* może nabywać oporność na flukonazol poprzez adaptacyjny mechanizm związany z aneuploidalnością (atypową liczbą chromosomów). Bing i wsp. [8] stwierdzili, że w wyniku poddania szczepu *C. auris* BJCA001 presji selekcyjnej związanej z pasażowaniem na podłożu w obecności wzrastających

stężeń leku, doszło do rozwoju oporności, przy czym część opornych szczepów posiadała dodatkową kopię chromosomu V. Ponadto wykazano, że obecne w obrębie tego chromosomu geny, *ERG9* i *OPT1/2*, potencjalnie warunkujące oporność na flukonazol lub związane z biosyntezą ergosterolu, podlegały zwiększonej transkrypcji. Uzyskanie dodatkowego chromosomu może zatem mieć związek z rozwojem oporności *C. auris* na flukonazol. Przy braku presji selekcyjnej w postaci flukonazolu komórki grzybicze szybko odzyskiwały wrażliwość, tracąc jednocześnie dodatkową kopię chromosomu [8].

Leki polienowe, do których należy amfoterycyna B, działają poprzez wiązanie się z ergosterolem błon komórkowych grzybów, doprowadzając do powstania porów i uwolnienia do środowiska składników wewnątrzkomórkowych, takich jak cukry, jony potasu czy wapnia, co prowadzi do śmierci komórki [25]. Przypuszczalnie, oporność na tę grupę leków mogą determinować zmiany w ścieżce biosyntezy i w składzie steroli błonowych, mutacje w obrębie czynnika transkrypcyjnego FLO8 wpływającego na wirulencję i tworzenie biofilmu przez *C. albicans* oraz w genie kodującym białko transbłonowe [25, 36]. Stwierdzono także nadekspresję białek transportujących leki (wyrzut) w obecności amfoterycyny B [25, 27]. Rybak i wsp. [80] odkryli nową mutację w genie *ERG6* *C. auris* kodującym metyltransferazę steroli, opisując przypadek kliniczny zakażenia, w przebiegu którego oporność na amfoterycynę B została nabyta przez ten szczep *in vivo* podczas leczenia. W szczepach *C. auris* mających wspomnianą mutację, wykryto zaburzenia biosyntezy ergosterolu.

Echinokandyny są lekami, których mechanizm działania polega na nie-kompetycyjnym hamowaniu syntezy glukanu, co doprowadza do zablokowania jego syntezy. Skutkiem tego jest osłabienie grzybiczej ściany komórkowej i zwiększenie jej wrażliwości na działanie stresu osmotycznego. Oporność na tę grupę leków związana jest przede wszystkim z mutacjami w genie *FKS1*, kodującym katalityczną podjednostkę syntazy 1,3-beta-glukanu (mutacje/substytucje: S639F, F635Y, F635L, S639P, S639Y, R1354S). Sugerowana jest pomocnicza rola zwiększonej transkrypcyjnej regulacji syntezy chityny oraz genów ściany komórkowej uczestniczących w odpowiedzi grzyba na obecność w środowisku czynników stresogennych w promowaniu oporności *C. auris* na echinokandyny [61, 89].

Flucytozyna jest analogiem nukleozydowym, który hamuje syntezę grzybiczych kwasów nukleinowych. Stosowana jest do leczenia inwazyjnych zakażeń wywołanych przez *C. auris*, zwłaszcza związanych z biomateriałami. Prolek ulega aktywacji przez uracyl-fosforybozylotransferazę, kodowaną przez gen *FURI*. Jednym z udokumentowanych mechanizmów oporności *C. auris* jest substytucja typu F211I w genie *FURI* [45].

Oprócz uznanych mechanizmów warunkujących antybiotykooporność *C. auris*, istnieją dodatkowe czynniki wpływające na zmniejszoną efektywność prowadzonego leczenia. Wśród nich należy wymienić opisaną wcześniej zdolność *C. auris* do tworzenia biofilmu czy fenotypową plastyczność tego gatunku [45].

3. Kolonizacja a zakażenie

C. auris kolonizuje różne anatomiczne powierzchnie człowieka, wykazuje jednak szczególne powinowactwo do powierzchni skóry. Najczęściej szczepy tego gatunku są izolowane z okolic pach i pachwin, ale również z jamy ustnej, gardła oraz wysięków. Bywa też izolowany z moczu, jamy nosowej i zewnętrznego przewodu słuchowego. Z łatwością kolonizuje rany.

Kolonizacja powierzchni skóry skutkuje wytworzeniem przez drożdżaki złożonego biofilmu, zbudowanego z wielu warstw o wysokim stopniu adherencji i zdolności do proliferacji w niszach o zwiększonej wilgotności. Tworzenie biofilmów na powierzchni biomateriałów stosowanych w praktyce medycznej zwiększa ryzyko wieloogniskowej kolonizacji oraz jej długotrwałego utrzymywania się, co dramatycznie zmniejsza szansę eradykacji grzyba.

Kolonizacja pacjentów w środowisku szpitalnym przez *C. auris* zachodzi bardzo szybko, w ciągu kilku godzin po ekspozycji. Trwać może przez tygodnie, miesiące, a nawet lata, pomimo stosowania środków dezynfekcyjnych jak i leczniczych, takich jak chlorheksydyna, nystatyna, echinkandyny. Przewlekła kolonizacja może z kolei prowadzić do rozwoju kolejnych epizodów inwazyjnej kandydozy w ciągu kilku miesięcy, niezależnie od zastosowanej optymalnej leczenia przeciwgrzybiczej [45].

Różnicowanie pomiędzy kolonizacją a zakażeniem, podobnie jak w przypadku zakażeń wywołanych przez inne grzyby z rodzaju *Candida*, powinno być oparte na obserwacji wystąpienia u pacjenta objawów klinicznych, wskazujących na proces infekcyjny, toczący się w miejscu, z którego *C. auris* została wyizolowana [27]. Należy przy tym podkreślić, że izolacja i identyfikacja *C. auris* z miejsc fizjologicznie niejadalnych jest ważna, gdyż kolonizacja pacjenta niesie wysokie ryzyko transmisji tego drobnoustroju. Zdolność do długotrwałej kolonizacji, stwierdzanej nawet trzy miesiące po pierwszej identyfikacji, pomimo podjętego leczenia przeciwgrzybicznego i ujemnych wyników późniejszych badań przesiewowych, w dużym stopniu stanowi o potencjale epidemicznym *C. auris* [57, 76]. Pacjent skolonizowany *C. auris* stanowi źródło kontaminacji środowiska szpitalnego [oszacowano, że około milion komórek grzybiczych na godzinę ulega uwolnieniu z powierzchni skóry do środowiska], co sprawia, że

Tabela I
Najczęstsze miejsca kolonizacji i postaci inwazyjnych zakażeń wywołanych przez *C. auris* oraz czynniki ryzyka dla rozwoju zakażenia u pacjentów skolonizowanych [na podstawie 45, 27, 76]

	<i>Candida auris</i>
Kolonizacja*	Zewnętrzny przewód słuchowy Jama nosowa Jama ustna, gardło Pachy Pachwiny Mocz Odbyt Inne: dłonie, skóra koniuszków palców, przestrzenie międzypalcowe stóp * możliwa kolonizacja więcej niż jednego miejsca anatomicznego
Zakażenie	Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych Stan zapalny tkanek oka Zapalenie ucha zewnętrznego, zapalenie ucha i wyrostka sutkowatego Zapalenie segmentu ruchowego kręgosłupa Zakażenia odcewnikowe Zapalenie wsierdza, mięśnia sercowego Zakażenia skóry i tkanek miękkich, zakażenia ran Kandydemia Zakażenia układu moczowego i kandyduria Zakażenia wewnętrzbrzusze Zapalenie kości i szpiku
Czynniki ryzyka	Wcześniejsza ekspozycja na leki przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze Zabiegi chirurgiczne Mechaniczna wentylacja Żywnienie pozajelitowe Cewnikowanie Hemodializa Przewlekła niewydolność nerek Wieloogniskowa kolonizacja <i>C. auris</i> Cukrzyca

staje się on rezerwuarem tego drobnoustroju i źródłem jego szpitalnej transmisji [76].

Stwierdzono pozytywną korelację między stopniem kolonizacji pacjenta przez *C. auris*, a kontaminacją środowiska w jego najbliższym sąsiedztwie [28, 87]. Kontaminacja łóżek szpitalnych, poręczy, klamek, parapetów okiennych, krzeseł, urządzeń pomiarowych wielokrotnego użytku (np. pulsokometrów, termometrów) wykrywana jest w przebiegu wielu szpitalnych ognisk epidemicznych i może mieć charakter długotrwały [28]. Ponadto, *C. auris* może zanieczyszczać ręce, rękawiczki i odzież personelu medycznego, będącego w bezpośrednim kontakcie ze skolonizowanym pacjentem, nie przestrzegającego zasad higieny rąk oraz prewencji zakażeń, co z kolei przyczynia się do transmisji drożdżaka na kolejnych pacjentów [76].

Tabela I przedstawia najczęściej stwierdzane miejsca kolonizacji, inwazyjnych zakażeń wywołanych przez *C. auris* oraz czynniki ryzyka rozwoju zakażeń u pacjentów skolonizowanych [27, 45, 76].

Najczęstszą postacią zakażeń wywołanych przez *C. auris* jest kandydemia. Obecność drożdżaka we krwi niesie ryzyko jego rozsiewu do narządów wewnętrznych (m.in. wątroby, mózgu, płuc, kości, nerek oraz układu moczowego), co może prowadzić do wystą-

pienia zakażenia uogólnionego, wstrząsu septycznego i niewydolności wielonarządowej. Kolonizacja i zakażenia miejscowe mogą prowadzić do wystąpienia lub nawrotu kandydemii nawet po kilku miesiącach od zakończonego wyleczeniem pierwszego epizodu infekcji. Śmiertelność z powodu zakażeń wywołanych przez *C. auris* jest wyższa niż dla innych przedstawicieli rodzaju *Candida* i wynosi 30–70%. Wczesne wykrycie i szybkie wdrożenie leczenia przeciwgrzybiczego zwiększają szansę pacjenta na przeżycie [45].

4. Laboratoryjna diagnostyka *Candida auris*

Izolacja i identyfikacja *C. auris* jest kluczowa w zakresie rozpoczęcia właściwej leczenia zakażonego pacjenta oraz w celu kontroli transmisji drożdżaka i opanowania ognisk epidemicznych w warunkach szpitalnych. Postępowanie diagnostyczne nastęrcza jednak wiele problemów.

4.1. Identyfikacja gatunku *Candida auris*

Identyfikacja *C. auris* oparta o metody klasyczne, w tym wyniki reakcji biochemicznych, jest problematyczna i prowadzi do identyfikacji szczepów jako

Rhodotorula glutinis, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. sake*, *C. haemulonii*, *C. duobushmaemulonii*, *C. famata*, *C. lusitanae*, *C. albicans*, *S. guilliermondii* czy *C. parapsilosis* [30, 45, 79]. Dodatkowym problemem jest istnienie 5 kładów *C. auris*, różniących się między sobą np. profilami asymilacji N-acetyloglukozaminy [69].

Najczęstsze przykłady błędnej identyfikacji *C. auris* za pomocą komercyjnych systemów do identyfikacji drobnoustrojów opartych na badaniu profilu aktywności biochemicznej oraz wskazówki dotyczące dalszych etapów diagnostyki mikrobiologicznej, koniecznych przy podejrzeniu izolacji *C. auris*, są dostępne na stronie CDC [<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/identification.html>]; https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/pdf/Testing-algorithm_by-Method_508.pdf].

Wiarygodna identyfikacja *C. auris* jest obecnie możliwa przy zastosowaniu [33]:

- √ MALDI-TOF (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*/ desorpcja/ionizacja laserem wspomagana matrycą z pomiarem czasu przelotu jonów) pod warunkiem zastosowania zaktualizowanej względem *C. auris* bazy danych dotyczącej profili białkowych badanych drobnoustrojów (Bruker Biotyper® [Palaiseau, France; system bioMérieux Vitek®, Capronne, France; niezależna biblioteka MSI®, Paris, France],
- √ metod biologii molekularnej (PCR, multipleks PCR, Real-Time PCR, PCR polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. Restriction Fragment Length Polymorphisms, *RLFP*) sekwencjonowanie genetycznych loci: regionu D1/D2 28S rDNA; 18S Internal Transcribed Regions (ITS 1/2) rDNA; RPB1 i RPB2). Handlowo dostępne zestawy do przeprowadzenia reakcji PCR w kierunku *C. auris* to AurisID (OLM, Newcastle Upon Tyne, UK), Fungiplex Candida Auris RUO Real-Time PCR (Bruker, Bremen, Germany).

W jednym z badań [85] wykazano, że oba testy pozwalają zidentyfikować *C. auris* nawet przy niskich stężeniach DNA.

Połączenie analizy loci D1/D2 i ITS pozwala także na zakwalifikowanie izolatu do kładu genetycznego bez konieczności wykonywania sekwencjonowania całego genomu.

Proponowane są molekularne protokoły uwzględniające wykrycie *C. auris* bezpośrednio z wymazów, co może ułatwiać przeprowadzanie badań przesiewowych pacjentów [65, 87]. Opracowano metodę opartą na uzyskaniu RNA rybosomalnego genu ITS2 i przeprowadzeniu reakcji real-time PCR z wykorzystaniem odwrotnej transkrypcji (RT-qPCR), w celu wykrycia żywych

komórek *C. auris* w środowisku szpitalnym, co może być pomocne w kontroli transmisji tego drożdżaka [42].

Obecnie dostępne metody izolacji i identyfikacji *C. auris* zostały przedstawione w publikacji Lockharti wsp. [69].

Wykrywanie kolonizacji *C. auris* jest szczególnie istotne w aspekcie kontroli zakażeń, podjęcia decyzji o ewentualnej konieczności izolacji pacjenta. Badania przesiewowe oparte są na pobraniu wymazów ze skóry pach i pachwin, po czym wstępne namnażanie prowadzone jest w bulionie Sabouraud, zawierającym 10% NaCl i dulcitol. Po zaobserwowaniu wzrostu w bulionie, hodowla jest przesiewana na podłoże chromogenne CHROMagar w celu uzyskania wzrostu izolatu, który w kolejnym etapie zostanie poddany identyfikacji. Procedura izolacji *C. auris* przy zastosowaniu tej metodyki jest dostępna na stronie CDC pod adresem:

<https://www.cdc.gov/fungal/lab-professionals/pdf/c.-auris-colonization-screening-508.pdf>.

Procedura pobierania wymazów w kierunku *C. auris* jest dostępna pod adresem: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-patient-swab.html>

Wzrost kolonii *C. auris* obserwowany jest po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 30–35°C, np. na podłożu Sabouraud z dekstrozą w postaci gładkich kolonii o kolorze białym lub kremowym. W odróżnieniu od innych gatunków *Candida*, *C. auris* wzrasta także w temperaturze 42°C. Na podłożach chromogenych obserwowana jest zmienność morfologii kolonii [<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/identification.html>], w tym zabarwienia, od koloru różowego do beżowego [62].

Ostatnio opracowano i poddano analizie dwa nowe podłoża chromogenne CHROMagar Candida Plus (CHROMagar, France) i HiCrome *C. auris* MDR selective agar (HiMedia, Mumbai, India) w celu identyfikacji *C. auris* [5, 9, 31]. W badaniu De Jong i wsp. [31] podłoże CHROMagar Candida Plus jako jedyne podłoże chromogenne (spośród analizowanych: CHROMagar Candida Plus (CHROMagar), HiCrome *C. auris* MDR selective agar (HiMedia), CandiSelect (Bio-Rad), CHROMagar Candida (CHROMagar), Chromatic Candida (Liofilchem)) prawidłowo pozwala rozróżnić badane izolaty *C. auris*. Kolonie tego gatunku były zabarwione na kolor jasno niebieski, z tworzeniem charakterystycznego niebieskiego halo [<https://www.chromagar.com/en/product/chromagar-candida-plus/>]. Niemniej jednak, blisko spokrewnione gatunki *C. pseudohaemulonii* i *C. vulturna* tworzyły kolonie o podobnym wyglądzie, prowadząc do uzyskania wyników fałszywie-dodatnich [31]. Z tego powodu zaleca się, aby kolonie podejrzane o przynależność do gatunku *C. auris* na podstawie wzrostu na podłożu chromogenym, zostały poddane dalszej analizie, z wykorzystaniem sekwencjonowania lub MALDI-TOF [69]. Kumar

i wsp. [63] zaproponowali wykorzystanie tolerancji temperaturowej i CHROMagaru uzupełnionego podłożem Pal w celu morfologicznego rozróżnienia pomiędzy *C. auris* a *C. haemulonii* i *C. duobushaemulonii*, aczkolwiek opcja ta wydaje się być przydatna jedynie w sytuacji, gdy zawężamy identyfikację tylko do tych blisko spokrewnionych ze sobą gatunków [69].

Opracowano także dwa podłoża selektywne dla *C. auris*, z których jedno (Selective Auris Medium, SAM) zawiera wysokie (12,5%) stężenie NaCl oraz siarczan żelaza, co w połączeniu z podwyższoną temperaturą inkubacji (42°C), preferencyjnie umożliwia wzrost *C. auris* [30]. Inne podłoże (SCA/Specific *C. auris* medium), jest wzbogaconym bulionem, w skład którego wchodzi 10% NaCl, mannitol i fiolet krystaliczny (inkubacja w temperaturze 40°C) [54]. Podłoża te oczekują jednak na proces walidacji z użyciem większej liczby gatunków *Candida*, łącznie z blisko spokrewnionym kompleksem *C. haemulonii* [69].

4.2. Ocena antybiotykowrażliwości *Candida auris* na leki przeciwgrzybicze

Wobec wysokiego odsetka izolatów *C. auris* charakteryzujących się antybiotykoopornością, oznaczanie lekowrażliwości tego drożdżaka w warunkach *in vitro* jest niezwykle istotne.

Według rekomendacji Instytutu Klinicznych i Laboratoryjnych Standardów (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) oraz Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST) metody oceny lekowrażliwości tego drobnoustroju, obejmują metodę mikrorozcieńczeń w bulionie, metodę gradientowo-dyfuzyjną (E-testy, bioMérieux), Sensititre YeastOne (Thermo Fisher Scientific), system VITEK-2 (bioMérieux), a także MALDI-Biotyper antibiotic susceptibility test rapid assay (MBT ASTRA) i metody molekularne [40].

Niestety, dotychczas nie ustalono wartości granicznych (ang. *breakpoint*) dla żadnego z dostępnych leków przeciwgrzybiczych, wykazujących aktywność względem *C. auris*. Wiele laboratoriów korzysta z próbnych wartości „breakpoint” opracowanych i zaproponowanych przez CDC (<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>) w oparciu o analizę wartości MIC, wyniki przeprowadzonych na zwierzętach modeli zakażeń *C. auris* i molekularną identyfikację mechanizmów lekooporności tego drobnoustroju. CDC udostępniło także przewodnik w interpretacji wartości MIC dla *C. auris* w oparciu o wiedzę uzyskaną na temat *Candida* spp. oraz opinie ekspertów [<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>]. Mimo, iż wspomniane wartości „breakpoint” mogą być pomocne klinicydom w interpretacji wartości MIC

klinicznych szczepów *C. auris*, nie powinna ona być włączana do końcowych raportów z wynikami przeprowadzonej diagnostyki laboratoryjnej [69].

Wyzwaniem diagnostycznym stwierdzanym w przypadku wielu izolatów *C. auris* analizowanych przy zastosowaniu metody mikrorozcieńczeń w bulionie dla kaspofunginy jest także tzw. efekt Eagle [61, 69]. Polega on na tym, że izolat poddany ekspozycji na stężenia antybiotyku wyższe niż tzw. optymalne stężenie bakteriobójcze (ang. *optimal bactericidal concentration*, OBC) paradoksalnie wykazuje zwiększoną przeżywalność niż przy ekspozycji na OBC, co powodowane jest zmniejszonym tempem obumierania komórek grzyba [[https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(18\)30230-0](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(18)30230-0)].

Jeśli wrażliwość na inne echinonadyny nie jest badana równoległe z kaspofunginą, zjawisko to może prowadzić do błędnej identyfikacji oporności na tą grupę leków w szczepie wrażliwym [81]. Należy podkreślić, że efekt Eagle nie odzwierciedla potencjalnej odpowiedzi *in vivo* *C. auris* na echinokandyny, czego dowiedziono, przeprowadzając doświadczalny model inwazyjnej kandydozy u myszy [61].

4.3. Rekomendowany algorytm postępowania diagnostycznego

Izolaty podejrzane o przynależność do gatunku *C. auris* powinny być identyfikowane z wykorzystaniem metody MALDI-TOF MS lub sekwencjonowania DNA. Jeśli nie ma możliwości zastosowania żadnej z tych metod, system Vitek2 (bioMérieux) jest obecnie uznany za najbardziej wiarygodny w kontekście identyfikacji biochemicznej tego gatunku. Niemniej jednak, należy pamiętać, że niektóre kłady tego drożdżaka mogą zostać błędnie zidentyfikowane jako kompleks *C. haemulonii* i konieczna będzie ich dalsza charakterystyka. Jeśli żadna z wyżej wymienionych opcji diagnostycznych nie jest dostępna, można zastosować CHROMagar *Candida* Plus w celu identyfikacji izolatu na podstawie koloru wyrosłych kolonii. Swoistość tego podłoża nie wynosi jednak 100%, dlatego też izolaty wstępnie zidentyfikowane jako *C. auris*, powinny być poddane gatunkowo-swoistej reakcji PCR lub RT-PCR, by zweryfikować przynależność gatunkową. W ostateczności, przy niemożności zastosowania żadnej z opisanych opcji diagnostycznych, należy wysłać szczep do laboratorium referencyjnego w celu identyfikacji [69] zwłaszcza, jeśli w testach biochemicznych został on zidentyfikowany jako *C. haemulonii*, *C. famata*, *C. sake*, *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp. Tego rodzaju postępowanie jest szczególnie ważne w szpitalach o zwiększonym występowaniu zakażeń wywołanych przez gatunki nie-*albicans* oraz tych, które przyjmują pacjentów z innych ośrodków, zgłaszających ogniska występowania zakażeń *C. auris*.

5. Leczenie zakażeń wywołanych przez *Candida auris*

Leczenie inwazyjnych zakażeń wywołanych przez *C. auris* stanowi duże wyzwanie, biorąc pod uwagę zarówno często spotykaną wśród szczepów oporność na dostępne leki przeciwgrzybicze, jak i brak rekomendacji na temat optymalnego schematu leczenia. Na wybór odpowiedniego schematu terapeutycznego powinien mieć wpływ rodzaj szczepu *C. auris* (niektóre profile antybiotykooporności są zależne od genetycznego kładu), zakażenie związane z możliwością tworzenia biofilmu przez drobnoustroj oraz czynniki związane z pacjentem, m.in. wiek, wcześniejsze leczenie przeciwgrzybicze, postać kliniczna zakażenia, czy stan układu odpornościowego pacjenta [25, 33].

Ze względu na najczęściej stwierdzane wśród izolatów klinicznych profile wrażliwości na antybiotyki, mikafungina traktowana jest obecnie jako lek z wyboru w terapii większości klinicznych postaci zakażeń *C. auris* u pacjentów dorosłych. Lek ten jest drogi, w niektórych krajach nie jest on łatwo dostępny. Podczas leczenia konieczne jest monitorowanie stanu klinicznego pacjenta i antybiotykowrażliwości szczepu poprzez wykonywanie kolejnych badań mikrobiologicznych, jako że znane są przypadki nabycia oporności na mikafunginę w wyniku ekspozycji grzyba na lek. Przy braku klinicznej odpowiedzi na terapię echinokandynami lub w przypadku rozwoju trwającej ponad 5 dni kandydemii, należy rozważyć dodanie lub zmianę schematu leczenia poprzez podanie liposomalnej amfoterycyny B lub izawukonazolu [91].

W terapii zakażeń noworodków i dzieci < 2 m.ż. lekiem pierwszego rzutu powinien być deoksycholan amfoterycyny B; podanie echinokandyn (kaspofungina, mikafungina) można rozważyć jedynie po upewnieniu się, że zakażeniem nie został objęty ośrodkowy układ nerwowy (OUN) dziecka. Ze względu na słabą penetrację echinokandyn do OUN, terapia powinna obejmować wówczas inne leki, w tym flucytozynę, pozakonazol lub izawukonazol, w zależności od profilu lekowrażliwości szczepu *in vitro* [83]. Bardziej szczegółowe informacje na temat rekomendowanego obecnie postępowania terapeutycznego dostępne są na stronie CDC pod adresem: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-treatment.html>.

Warto dodać, że nie zaleca się podejmowania leczenia w przypadku izolacji *C. auris* z miejsc fizjologicznie niejadalnych (np. układ oddechowy, mocz) i kolonizacji powierzchni skóry, przy braku objawów klinicznych, wskazujących na aktywne zakażenie. W tych sytuacjach, jednak, konieczne jest wdrożenie odpowiednich procedur mających na celu zapobieganie i kontrolę zakażeń i ograniczenie transmisji drobnoustroju w środowisku szpitalnym. Brak wystarczających dowodów na skuteczność procedur, mających na celu dekolonizację, np. za pomocą chlorheksydyny [<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-treatment.html>] [1].

W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na poszukiwanie nowych leków o aktywności przeciwgrzybiczej, ale także alternatywnych metod terapii zakażeń wywołanych przez *C. auris*. Potencjalnie nowe metody terapii o wykazanej aktywności względem tego gatunku zostały przedstawione w Tabeli II.

Tabela II
Nowe leki przeciwgrzybicze oraz alternatywne strategie leczenia o wykazanej aktywności względem *C. auris*
[na podstawie 25, 45]

Nowe leki przeciwgrzybicze		
Lek	Mechanizm działania	Piśmiennictwo
Fosmanogepix (APX001)	Inhibitor enzymu Gwt1 (ang. <i>Glycosylphosphatidylinositol-anchored Wall protein Transfer 1</i>)	[48]
Arylamidyna T-2307	Powoduje zaburzenia potencjału błony mitochondrialnej w komórkach grzybiczych	[98]
Ibrefafungerp (SCY-078)	Inhibitor syntazy glukanu	[3]
Nitroksolina	Pochodna hydroksychinolini, mechanizm działania prawdopodobnie oparty na chelatacji jonowej	[43]
VT-1598	Lek tetrazolowy, inhibitor enzymu CYP51 (ERG11p) i syntezy ergosterolu	[97]
PC945	Lek triazolowy, inhibitor demetylazy 14a-lanosterolu	[79]
Rezafungina	Nowa echinokandyna o długim okresie półtrwania	[67]
Alternatywne strategie leczenia		
Karwakrol	Roślinne olejki eteryczne, zawierają składniki fenolowe o aktywności przeciwgrzybiczej	[88]
Farnesol	Oslabianie wirulencji, adherencji i tworzenia biofilmu przez <i>C. auris</i>	[92]
Krotamina	Naturalny peptyd, toksyna uzyskana z jadu grzechotnika; powoduje destabilizację błony komórkowej	[29]
Nanocząsteczki tlenku azotu	Hamowanie proliferacji planktonicznych komórek <i>C. auris</i> , hamowanie tworzenia biofilmu	[26]

Coraz większym zainteresowaniem w zakresie potencjalnego zastosowania w terapii zakażeń *C. auris* cieszą się także istniejące już leki, włączając preparaty o aktywności przeciwwirusowej, przeciw pasożytniczej, przeciwnowotworowej, przeciwzapalnej, czy przeciwdepresyjnej. Potencjalna aktywność przeciwgrzybicza tych środków terapeutycznych została szczegółowo opisana w pracy przeglądowej Izadi i wsp. [55].

6. Zalecane działania prewencyjne

Jedną z kluczowych zasad postępowania w przypadku pacjentów skolonizowanych lub zakażonych *C. auris* jest ich izolacja (ewentualnie kohortacja) oraz zastosowanie kontaktowych środków ostrożności. Bardzo istotna w zakresie działań prewencyjnych jest możliwość wydzielenia osobnego personelu i sprzętu medycznego (np. sprzęt USG, zestawy do tracheostomii) dla tych pacjentów. Jeśli to tylko możliwe, należy stosować sprzęt i materiały jednorazowego użytku. Powinno obowiązywać mycie i dezynfekcja środowiskowa, w tym np. aparatów do RTG, EKG, sprzętu do fizjoterapii, przed i po użyciu, a także codzienna (oraz po wypisaniu pacjenta skolonizowanego/zakażonego) dezynfekcja sal szpitalnych. Szczególny nacisk należy położyć na dezynfekcję często używanych powierzchni (stoły, poręcze łóżek, szafki) z zastosowaniem odpowiednich środków z uwzględnieniem zalecanego przez producenta czasu ekspozycji. Rekomendowane są środki na bazie chloru, kwasu nadoctowego, nadtlenku wodoru, alkoholu. Należy natomiast unikać czwartorzędowych związków amoniowych ze względu na brak wrażliwości *C. auris* [1, 28, 33].

Personel medyczny powinien podczas leczenia i ochrony nad pacjentami z *C. auris* zakładać jednorazowe fartuchy z długimi rękawami i jednorazowe rękawiczki (*germ-free*). Szczególne znaczenie ma odpowiednia dezynfekcja skóry rąk z wykorzystaniem środków na bazie alkoholu, według rekomendacji WHO [<https://www.who.int/campaigns/world-hand-hygiene-day>]. Ze względu na fakt, iż *C. auris* jest nowym patogenem, konieczna jest również edukacja personelu, uświadomienie zagrożeń z nim związanych, ze szczególnym uwzględnieniem jego wieloantybiotykooporności i dróg transmisji [1].

W przypadku kontaktu (> 24-godzinny pobyt w tej samej sali szpitalnej, stosowanie tego samego sprzętu medycznego) z „pacjentem zero”, konieczne są badania przesiewowe osób z kontaktu. Powinny one obejmować pobranie wymazów z pach, pachwin (po jednej wymazówce dla każdej z nisz) i jamy nosowej/gardła, oraz moczu (tylko pacjenci cewnikowani) i wymazu z odbytu. Badaniu przesiewowemu powinni być natomiast poddani wszyscy pacjenci w jednostce objętej

potencjalną transmisją *C. auris*. Dodatkowo, w zależności od sytuacji klinicznej, można rozważyć dodatkowe pobranie wymazów z ran, zewnętrznego przewodu słuchowego, pochwy. Dwa pierwsze badania przesiewowe (dzień 0 i dzień 4.) powinny być wykonane w pierwszym tygodniu, po czym kolejne – raz w tygodniu. Pobrane materiały kliniczne powinny być wysiane na chromogenne podłoże selektywne w kierunku *C. auris* bądź na podłoże umożliwiające identyfikację gatunków *non-albicans* za pomocą MALDI-TOF. Izolację pacjentów można zakończyć po uzyskaniu ujemnych wyników badań przesiewowych w co najmniej dwóch seriach wymazów pobranych w odstępie tygodnia, przy niestosowaniu w tym czasie leków przeciwgrzybiczych. Rekomendowane jest testowanie w kierunku *C. auris* za pomocą reakcji PCR po pobraniu drugiego zestawu wymazów, w celu zwiększenia czułości badań. Badaniom mikrobiologicznym należy także poddać sprzęt medyczny mający kontakt z pacjentem, w celu ustalenia potencjalnych dróg transmisji [1].

Do jednostki, w której wykryto *C. auris*, nie należy przyjmować pacjentów, aż do czasu ustalenia zasięgu szpitalnej transmisji drożdżaka oraz potencjalnych dróg transmisji. Alternatywnie, żadni nowi pacjenci nie powinni być przyjmowani, do czasu wypisania wszystkich dotychczasowych pacjentów z *C. auris* [1]. Co więcej, nawet jeśli kolejne przypadki izolacji *C. auris* nie zostaną wykryte w jednostce, zalecane jest cotygodniowe badanie przesiewowe pacjentów (wymazy ze skóry pach i pachwin, oraz mocz u pacjentów cewnikowanych, ewentualnie wymaz z odbytu – materiały pobierane w celu hodowli) przez co najmniej 3 miesiące od wypisania ostatniego pacjenta z *C. auris*.

Tabela III przedstawia rekomendacje CDC i ECDC na temat zapobiegania i kontroli transmisji *C. auris* w warunkach szpitalnych [27].

7. Podsumowanie

C. auris, ze względu na nieznaną, jak dotąd, pochodzenie oraz szereg cech odróżniających ten gatunek od pozostałych przedstawicieli rodzaju *Candida*, a w szczególności – wysoki potencjał epidemiczny, zdolność do transmisji horyzontalnej, odporność na działanie zewnętrznych czynników środowiskowych, niektórych środków dezynfekcyjnych oraz wieloantybiotykooporność, a także trudności związane z identyfikacją laboratoryjną, traktowany jest jako enigmatyczny i bardzo groźny drobnoustroj. Z tego względu konieczne jest kontynuowanie badań mających na celu poznanie potencjału patogenego tego drobnoustroju i mechanizmów wirulencji, a także rozwój i wdrożenie do rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej metod, które pozwolą na szybką i wiarygodną identyfikację

Tabela III

Rekomendacje CDC i ECDC dotyczące zapobiegania i kontroli transmisji *C. auris* w warunkach szpitalnych [na podstawie 27]

ECDC	CDC
<ul style="list-style-type: none"> • Prawidłowa identyfikacja gatunku (MALDI-TOF, sekwencjonowanie domeny D1/D2) • Raportowanie nowych przypadków, analiza retrospektywna przypadków • Opracowanie standardów kontroli zakażeń (włączając mycie i dezynfekcję środowiskową, reprocessowanie urządzeń medycznych, izolację pacjenta), szybkie i właściwe raportowanie nowych przypadków • Wczesna identyfikacja nosicieli poprzez aktywny skrining? proszę wpisać polskie określenie proszę o konsekwencję (wymazy z nosa, gardła, pach, pachwin, odbytu, miejsc wkłucia cewników dożylnych, mocz, kał, płyn z drenażu rany, materiały z dróg oddechowych) • Ustalenie źródła ogniska epidemicznego (dochodzenie epidemiologiczne, badania przesiewowe pacjentów, wymazy środowiskowe); prewencja transmisji drobnoustroju • Ograniczanie rozprzestrzeniania się ogniska (kontaktowe środki ostrożności, izolacja/kohortowanie pacjentów, personel medyczny dedykowany do opieki nad skolonizowanymi/zakażonymi pacjentami) • Edukacja personelu medycznego • Właściwa szpitalna polityka antybiotykowa 	<ul style="list-style-type: none"> • Prawidłowa identyfikacja gatunku (MALDI-TOF, metody biologii molekularnej) • Raportowanie potwierdzonych izolatów <i>C. auris</i> • Strategie kontroli zakażeń: <ul style="list-style-type: none"> ➢ Jednoosobowe pokoje dla pacjentów, kontaktowe środki ostrożności ➢ Właściwa higiena rąk ➢ Mycie i dezynfekcja środowiskowa (codzienna i po wypisaniu pacjenta) odpowiednimi środkami ➢ Badania przesiewowe osób z kontaktu, identyfikacja przypadków kolonizacji (wymazy: pachy, pachwiny, nos, zewnętrzny przewód słuchowy, część ustna gardła, inne: mocz, rany, odbytu) ➢ Badania przesiewowe zalecane dla pacjentów z tej samej sali, co pacjent z <i>C. auris</i> • Edukacja personelu medycznego • Monitorowanie przestrzegania zasad kontroli zakażeń • Właściwa szpitalna polityka antybiotykowa

tego gatunku. Kluczowe jest opracowywanie nowych strategii terapeutycznych oraz skutecznych metod zapobiegania transmisji tego drożdżaka, co jest szczególnie ważne w warunkach szpitalnych.

Piśmiennictwo

- Aldejohann A.M., Wiese-Posselt M., Gastmeier P., Kurzai O.: Expert recommendations for prevention and management of *Candida auris* transmission. *Mycoses*, **65**, 590–598 (2022)
- Arastehfar A., Carvalho A., Nguyen M.H., Hedayati M.T., Netea M.G., Perlin D.S., Hoenigl M.: COVID-19-Associated candidiasis (CAC): An underestimated complication in the absence of immunological predispositions? *J. Fungi*, DOI: 10.3390/jof6040211 (2020)
- Arendrup M.C., Jørgensen K.M., Hare R.K., Chowdhary A. *In vitro* activity of Ibrexafungerp (SCY-078) against *Candida auris* Isolates as determined by EUCAST methodology and comparison with activity against *C. albicans* and *C. glabrata* and with the activities of six comparator agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, e02136-19 (2020)
- Arora P., Singh P., Wang Y., Yadav A., Pawar K., Singh A., Padmavati G., Xu J.P., Chowdhary A.: Environmental isolation of *Candida auris* from the coastal wetlands of Andaman Islands, India. *Mbio*. DOI: 10.1128/mBio.03181-20 (2021)
- Bayona J.V.M., Garcia C.S., Palop N.T., Martin A.V., Padron C.G., Rodriguez J.C., Peman J., Cardona C.G.: Novel chromogenic medium CHROMagar(TM) Candida Plus for detection of *Candida auris* and other *Candida* species from surveillance and environmental Samples: A Multicenter Study. *J. Fungi*, DOI: 10.3390/jof8030281 (2022)
- Ben-Ami R., Berman J., Novikov A., Bash E., Shachor-Meyouhas Y., Zakin S., Maor Y., Tarabia J., Schechner V., Adler A., Finn T.: Multidrug-Resistant *Candida haemulonii* and *C. auris*, Tel Aviv, Israel. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 195–203 (2017)
- Bhattacharya S., Holowka T., Orner E.P., Fries B.C.: Gene duplication associated with increased fluconazole tolerance in *Candida auris* cells of advanced generational age. *Sci. Rep.* DOI: 10.1038/s41598-019-41513-6 (2019)
- Bing J., Hu T.R., Zheng Q.S., Munoz J.F., Cuomo C.A., Huang G.H.: Experimental evolution identifies adaptive aneuploidy as a mechanism of fluconazole resistance in *Candida auris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* DOI: 10.1128/AAC.01466-20 (2021)
- Borman A.M., Fraser M., Johnson E.M.: CHROMagar (TM) Candida Plus: A novel chromogenic agar that permits the rapid identification of *Candida auris*. *Med. Mycol.* **59**, 253–258 (2021)
- Borman A.M., Szekely A., Johnson E.M.: Comparative pathogenicity of United Kingdom Isolates of the emerging pathogen *Candida auris* and other key pathogenic *Candida* species. *Msphere*, DOI: 10.1128/mSphere.00189-16 (2016)
- Borman A.M., Szekely A., Johnson E.M.: Isolates of the emerging pathogen *Candida auris* present in the UK have several geographic origins. *Med. Mycol.* **55**, 563–567 (2017)
- Brown J.L., Delane C., Short B., Butcher M.C., McCloud E., Williams C., Kean R., Ramage G.: *Candida auris* phenotypic heterogeneity determines pathogenicity in vitro. *Msphere*, DOI: 10.1128/mSphere (2020)
- Bruno M., Kersten S., Bain J.M., Jaeger M., Rosati D., Kruppa M.D., Lowman D.W., Rice P.J., Graves B., Ma Z.C., i wsp.: Transcriptional and functional insights into the host immune response against the emerging fungal pathogen *Candida auris*. *Nat. Microbiol.* **5**, 1516–1531 (2020)
- Calvo B., Melo A.S.A., Perozo-Mena A., Hernandez M., Francisco E.C., Hagen F., Meis J.F., Colombo A.L.: First report of *Candida auris* in America: clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. *J. Infect.* **73**, 369–374 (2016)

15. Casadevall A., Kontoyiannis D.P., Robert V.: On the emergence of *Candida auris*: climate change, azoles, swamps, and birds. *Mbio*, **23**, e01397-19 (2019)
16. Chakrabarti A., Sood P., Rudramurthy S.M., Chen S., Kaur H., Capoor M., Chhina D., Rao R., Eshwara V.K., Xess I., i wsp.: Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. *Intensive Care Med.* **41**, 285–295 (2015)
17. Chatterjee S., Alampalli S.V., Nageshan R.K., Chettiar S.T., Joshi S., Tatu U.S.: Draft genome of a commonly misdiagnosed multidrug resistant pathogen *Candida auris*. *BMC Genomics*. DOI: 10.1186/s12864-015-1863-z (2015)
18. Chow N.A., de Groot T., Badali H., Abastabar M., Chiller T.M., Meis J.F.: Potential fifth clade of *Candida auris*, Iran, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* **2**, 1780–1781 (2019)
19. Chow N.A., Munoz J.F., Gade L., Berkow E.L., Li X., Welsh R.M., Forsberg K., Lockhart S.R., Adam R., Alanio A., i wsp.: Tracing the evolutionary history and global expansion of *Candida auris* using population genomic analyses. *Mbio*. DOI: 10.1128/mBio.03364-19 (2020)
20. Chowdhary A., Kumar V.A., Sharma C., Prakash A., Agarwal K., Babu R. Dinesh K.R., Karim S., Singh S.K., Hagen F., Meis J.F.: Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 919–926 (2014)
21. Chowdhary A., Prakash A., Sharma C., Kordalewska M., Kumar A., Sarma S., Tarai B., Singh A., Upadhyaya G., Upadhyay S., i wsp.: A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009-17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 891–899 (2018)
22. Chowdhary A., Sharma C., Duggal S., Agarwal K., Prakash A., Singh P.K., Jain S., Kathuria S., Randhawa H.S., Hagen F., Meis J.F.: New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1670–1673 (2013)
23. Chowdhary A., Sharma C., Meis J.F.: *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *Plos Pathogens*. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006290 (2017)
24. Chowdhary A., Tarai B., Singh A., Sharma A.: Multidrug-Resistant *Candida auris* infections in critically ill coronavirus disease patients, India, April-July 2020. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 2694–2696 (2020)
25. Chybowska A.D., Childers D.S., Farrer R.A.: Nine things genomics can tell us about *Candida auris*. *Front. Gen.* DOI: 10.3389/fgene.2020.00351 (2020)
26. Cleare L.G., Li K.L., Abuzeid W.M., Nacharaju P., Friedman J.M., Nosanchuk J.D. NO *Candida auris*: Nitric oxide in nanotherapeutics to combat emerging fungal pathogen *Candida auris*. *J Fungi (Basel)*. DOI: 10.3390/jof6020085 (2020).
27. Cortegiani A., Misseri G., Fasciana T., Giammanco A., Giarratano A., Chowdhary A.: Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. *J. Intensive Care*. DOI: 10.1186/s40560-018-0342-4 (2018)
28. Cortegiani A., Misseri G., Giarratano A., Bassetti M., Eyre D.: The global challenge of *Candida auris* in the intensive care unit. *Crit. Care*, **23**, 3 (2019)
29. Dal Mas C., Rossato L., Shimizu T., Oliveira E.B., da Silva Junior P.I., Meis J.F., Colombo A.L., Hayashi M.A.F.: Effects of the natural peptide crotamine from a South American rattlesnake on *Candida auris*, an emergent multidrug antifungal resistant human pathogen. *Biomolecules*. DOI: 10.3390/biom9060205 (2019)
30. Das S., Singh S., Tawde Y., Chakrabarti A., Rudramurthy S.M., Kaur H., Shankarnarayan S.A., Ghosh A.: A selective medium for isolation and detection of *Candida auris*, an emerging pathogen. *J. Clin. Microbiol.* DOI: 10.1128/JCM.00326-20. (2021)
31. de Jong A.W., Dieleman C., Carbia M., Tap R.M., Hagen F.: Performance of two novel chromogenic media for the identification of multidrug-resistant *Candida auris* compared with other commercially available formulations. *J. Clin. Microbiol.* DOI: 10.1128/JCM.03220-20 (2021).
32. de Jong A.W., Francisco E.C., de Almeida J.N., Brandao I.B., Pereira F.M., Dias P.H.P., Costa M.D.M., Jordao R.T.D., Vu D., Colombo A.L., Hagen F.: Nanopore genome sequencing and variant analysis of the susceptible *Candida auris* strain L1537/2020, Salvador, Brazil. *Mycopathologia*, **186**, 883–887 (2021)
33. Desoubeaux G., Coste A.T., Imbert C., Hennequin C.: Overview about *Candida auris*: what's up 12 years after its first description? *J. Mycol. Med.* DOI: 10.1016/j.mycmed.2022.101248 (2022)
34. Du H., Bing J., Hu T.R., Ennis C.L., Nobile C.J., Huang G.H.: *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *Plos Pathogens*, DOI: 10.1371/journal.ppat.1008921 (2020)
35. Emara M., Ahmad S., Khan Z., Joseph L., Al-Obaid I., Purohit P., Bafna R.: *Candida auris* candidemia in Kuwait, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1091–1092 (2015)
36. Escandon P., Chow N.A., Caceres D.H., Gade L., Berkow E.L., Armstrong P., Rivera S., Misas E., Duarte C., Moulton-Meissner H., i wsp.: Molecular epidemiology of *Candida auris* in Colombia reveals a highly related, countrywide colonization with regional patterns in amphotericin B resistance. *Clin. Infect. Dis.* **68**, 15–21 (2019)
37. Fakhim H., Vaezi A., Dannaoui E., Chowdhary A., Nasiry D., Faeli L., Meis J.F., Badali H.: Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. *Mycoses*, **61**, 377–382 (2018)
38. Fan S.R., Yue H.Z., Zheng Q.S., Bing J., Tian S.F., Chen J.J., Ennis C.L., Nobile C.J., Huang G.H., Du H.: Filamentous growth is a general feature of *Candida auris* clinical isolates. *Med. Mycol.* **59**, 734–740 (2021)
39. Fan S.R., Zhan P., Bing J., Jiang N., Huang Y.N., Chen D.K., Hu T.R., Du H., Huang G.H.: A biological and genomic comparison of a drug-resistant and a drug-susceptible strain of *Candida auris* isolated from Beijing, China. *Virulence*, **12**, 1388–1399 (2021)
40. Fasciana T., Cortegiani A., Ippolito M., Giarratano A., Di Quattro O., Lipari D., Graceffa D., Giammanco A.: *Candida auris*: An Overview of how to screen, detect, test and control this emerging pathogen. *Antibiotics-Basel*, DOI: 10.3390/antibiotics9110778 (2020)
41. Forgacs L., Borman A.M., Prepost E., Toth Z., Kardos G., Kovacs R., Szekely A., Nagy F., Majoros L., Kovacs I.: Comparison of in vivo pathogenicity of four *Candida auris* clades in a neutropenic bloodstream infection murine model. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 1160–1169 (2020)
42. Freitas B.L., Leach L., Chaturvedi V., Chaturvedi S.: Reverse Transcription-Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR) Assay for the rapid enumeration of live *Candida auris* cells from the health care environment. *J. Clin. Microbiol.* DOI: 10.1128/JCM.00779-21 (2022)
43. Fuchs F., Hof H., Hofmann S., Kurzai O., Meis J.F., Hamprecht A.: Antifungal activity of nitroxoline against *Candida auris* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 1697.e7-1697.e10 (2021)
44. Gaitan A.C.R., Moret A., Hontangas J.L., Molina J.M., Lopez A.I.A., Cabezas A.H., Maseres J.M., Arcas R.C., Ruiz M.D.G., Chiveli M.A. i wsp.: Nosocomial fungemia by *Candida auris*: First four reported cases in continental Europe. *Rev. Iberoam. Micol.* **34**, 23–27 (2017)
45. Garcia-Bustos V., Cabanero-Navalon M.D., Ruiz-Sauri A., Ruiz-Gaitan A.C., Salavert M., Tormo M.A., Peman J.: What Do We know about *Candida auris*? State of the art, knowledge gaps, and future directions. *Microorganisms*, DOI: 10.3390/microorganisms9102177 (2021)

46. Garcia-Bustos V., Peman J., Ruiz-Gaitan A., Cabanero-Navalon M.D., Cabanilles-Boronat A., Fernandez-Calduch M., Marcilla-Barreda L., Sigona-Giangreco I.A., Salavert M., Tormo-Mas M.A., Ruiz-Sauri A.: Host-pathogen interactions upon *Candida auris* infection: fungal behaviour and immune response in *Galleria mellonella*. *Emerg. Microbes Infect.* **11**, 136–146 (2022)
47. Garcia-Bustos V., Ruiz-Sauri A., Ruiz-Gaitan A., Sigona-Giangreco I.A., Cabanero-Navalon M.D., Sabalza-Baztan O., Salavert-Lleti M., Tormo M.A., Peman J.: Characterization of the differential pathogenicity of *Candida auris* in a *Galleria mellonella* infection model. *Microbiol. Spectr.* DOI: 10.1128/Spectrum.00013-21 (2021)
48. Hager C.L., Larkin E.L., Long L., Zohra Abidi F., Shaw K.J., Ghannoum M.A. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the antifungal activity of APX001A/APX001 against *Candida auris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* DOI: 10.1128/AAC.02319-17 (2018)
49. Hamprecht A., Barber A.E., Mellinghoff S.C., Thelen P., Walther G., Yu Y.Y., Neurgaonkar P., Dandekar T., Cornely O.A., Martin R., i wsp.: *Candida auris* in Germany and previous exposure to foreign healthcare. *Emerg. Infect. Dis.* **25**, 1763–1765 (2019)
50. Han Y.Y., Liu D.D., Li L.H.: PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 727–742 (2020)
51. Hanson B.M., Dinh A.Q., Tran T.T., Arenas S., Pronty D., Gershengorn H.B., Ferreira T., Arias C.A., Shukla B.S.: *Candida auris* invasive infections during a COVID-19 case surge. *Antimicrob. Agents Chemother.* DOI: 10.1128/AAC.01146-21 (2021)
52. Hoenigl M., Seidel D., Sprute R., Cunha C., Oliverio M., Goldman G.H., Ibrahim A.S., Carvalho A.: COVID-19-associated fungal infections. *Nat. Microbiol.* **7**, 1127–1140 (2022)
53. Horton M.V., Johnson C.J., Zarnowski R., Andes B.D., Schoen T.J., Kernien J.F., Lowman D., Kruppa M.D., Ma Z.C., Williams D.L. i wsp.: *Candida auris* cell wall mannosylation contributes to neutrophil evasion through pathways divergent from *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *MSphere*, DOI: 10.1128/mSphere.00406-21 (2021)
54. Ibrahim A., Peyclit L., Abdallah R., Khelaifia S., Chamieh A., Rolain J.M., Bittar F.: SCA Medium: A new culture medium for the isolation of all *Candida auris* clades. *J. Fungi*, DOI: 10.3390/jof7060433 (2021)
55. Izadi A., Gharehbolagh S.A., Sadeghi F., Talebi M., Darmiani K., Zarrinnia A., Zarei F., Peymaeei F., Khojasteh S., Borman A.M., Mahmoudi S.: Drug repurposing against *Candida auris*: a systematic review. *Mycoses*, **65**, 784–793 (2022)
56. Johnson C.J., Davis J.M., Huttenlocher A., Kernien J.F., Nett J.E.: Emerging fungal pathogen *Candida auris* evades neutrophil attack. *Mbio*, DOI: 10.1128/mBio.01403-18 (2018)
57. Kean R., McKlound E., Townsend E.M., Sherry L., Delaney C., Jones B.L., Williams C., Ramage G.: The comparative efficacy of antiseptics against *Candida auris* biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **52**, 673–677 (2018)
58. Kean R., Brown J., Gulmez D., Ware A., Ramage G.: *Candida auris*: a decade of understanding of an enigmatic pathogenic yeast. *J. Fungi*, DOI: 10.3390/jof6010030 (2020)
59. Kean R., Delaney C., Sherry L., Borman A., Johnson E.M., Richardson M.D., Rautemaa-Richardson R., Williams C., Ramage G.: Transcriptome assembly and profiling of *Candida auris* reveals novel insights into biofilm-mediated resistance. *MSphere*, DOI: 10.1128/mSphere.00334-18 (2018)
60. Kim M.N., Shin J.H., Sung H., Lee K., Kim E.C., Ryoo N., Lee J.S., Jung S.I., Park K.H., Kee S.J., i wsp.: *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: Identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin. Infect. Dis.* **48**, e57–e61 (2009)
61. Kordalewska M., Lee A., Park S., Berrio I., Chowdhary A., Zhao Y.A., Perlin D.S.: Understanding echinocandin resistance in the emerging pathogen *Candida auris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* DOI: 10.1128/AAC.00238-18 (2018)
62. Kordalewska M., Perlin D.S.: Identification of drug resistant *Candida auris*. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2019.01918 (2019)
63. Kumar A., Sachu A., Mohan K., Vinod V., Dinesh K., Karim S.: Simple low cost differentiation of *Candida auris* from *Candida haemulonii* complex using CHROMagar *Candida* medium supplemented with Pal's medium. *Rev. Iberoam. Micol.* **34**, 109–111 (2017)
64. Kumar D., Banerjee T., Pratap C.B., Tilak R.: Itraconazole-resistant *Candida auris* with phospholipase, proteinase and hemolysin activity from a case of vulvovaginitis. *J. Infect. Dev. Ctries*, **9**, 435–437 (2015)
65. Leach L., Zhu Y., Chaturvedi S.: Development and validation of a Real-Time PCR assay for rapid detection of *Candida auris* from surveillance samples. *J. Clin. Microbiol.* DOI: 10.1128/JCM.01223-17 (2018)
66. Lee W.G., Shin J.H., Uh Y., Kang M.G., Kim S.H., Park K.H., Jang H.C.: First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 3139–3142 (2011)
67. Lepak A.J., Zhao M., Andes D.R. Pharmacodynamic evaluation of rezafungin (cd101) against *Candida auris* in the neutropenic mouse invasive candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* DOI: 10.1128/AAC.01572-18 (2018)
68. Lockhart S.R., Etienne K.A., Vallabhaneni S., Farooqi J., Chowdhary A., Govender N.P., Colombo A.L., Calvo B., Cuomo C.A., Desjardins C.A. i wsp.: Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin. Infect. Dis.* **64**, 134–140 (2017)
69. Lockhart S.R., Lyman M.M., Sexton D.J.: Tools for detecting a “Superbug”: Updates on *Candida auris* testing. *J. Clin. Microbiol.* DOI: 10.1128/jcm.00808-21 (2022)
70. Magnasco L., Mikulska M., Giacobbe D.R., Taramasso L., Vena A., Dentone C., Dettori S., Tutino S., Labate L., di Pilato V., i wsp.: spread of Carbapenem-Resistant Gram-negatives and *Candida auris* during the COVID-19 pandemic in critically ill patients: one step back in antimicrobial stewardship? *Microorganisms*. DOI: 10.3390/microorganisms9010095 (2021)
71. Magobo R.E., Corcoran C., Seetharam S., Govender N.P.: *Candida auris*-associated candidemia, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 1250–1251 (2014)
72. Munoz J.F., Gade L., Chow N.A., Loparev V.N., Juieng P., Berkow E.L., Farrer R.A., Litvintseva A.P., Cuomo C.A.: Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. *Nat. Commun.* DOI:10.1038/s41467-018-07779-6 (2018)
73. Nett J.E.: *Candida auris*: An emerging pathogen “incognito”? *Plos Pathogens*. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007638 (2019)
74. Pfaller M.A., Diekema D.J., Turnidge J.D., Castanheira M., Jones R.N.: Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* Species from 1997–2016. *Open Forum Infect. Dis.* **6**, S79–S94 (2019)
75. Prestel C., Anderson E., Forsberg K., Lyman M., de Perio M.A., Kuhar D., Edwards K., Rivera M., Shugart A., Walters M., Dotson N.Q.: *Candida auris* outbreak in a COVID-19 specialty care unit – Florida, July–August 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **70**, 56–57 (2021)
76. Proctor D.M., Dangana T., Sexton D.J., Fukuda C., Yelin R.D., Stanley M., Bell P.B., Baskaran S., Deming C., Chen Q. i wsp.: Integrated genomic, epidemiologic investigation of *Candida auris* skin colonization in a skilled nursing facility. *Nat. Med.* **27**, 1401–1409 (2021)

77. Rajni E., Singh A., Tarai B., Jain K., Shankar R., Pawar K., Mamoria V., Chowdhary A.: A High frequency of *Candida auris* blood stream infections in coronavirus disease 2019 patients admitted to intensive care units, Northwestern India: a case control study. *Open Forum Infect. Dis.* DOI: 10.1093/ofid/ofab452 (2021)
78. Rodriguez J.Y., Le Pape P., Lopez O., Esquea K., Labiosa A.L., Alvarez-Moreno C.: *Candida auris*: A Latent threat to critically ill patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* **73**, e2836–e2837 (2021)
79. Rudramurthy S.M., Colley T., Abdolrasouli A., Ashman J., Dhaliwal M., Kaur H., Armstrong-James D., Strong P., Rapeport G., Schelenz S., Ito K., Chakrabarti A. In vitro antifungal activity of a novel topical triazole PC945 against emerging yeast *Candida auris*. *J. Antimicrob. Chemother.* **74**, 2943–2949 (2019)
80. Rybak J.M., Barker K.S., Munoz J.F., Parker J.E., Ahmad S., Mokaddas E., Abdullah A., Elhagracy R.S., Kelly S.L., Cuomo C.A., Rogers P.D.: In vivo emergence of high-level resistance during treatment reveals the first identified mechanism of amphotericin B resistance in *Candida auris*. *Clin. Microbiol. Infect.* **28**, 838–843 (2022)
81. Rybak J.M., Doorley L.A., Nishimoto A.T., Barker K.S., Palmer G.E., Rogers P.D.: Abrogation of triazole resistance upon deletion of CDR1 in a clinical isolate of *Candida auris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* DOI: 10.1128/AAC.00057-19 (2019)
82. Rybak J.M., Sharma C., Doorley L.A., Barker K.S., Palmer G.E., Rogers P.D.: Delineation of the direct contribution of *Candida auris* ERG11 mutations to clinical triazole resistance. *Microbiol Spectr.* DOI: 10.1128/Spectrum.01585-21 (2021)
83. Sabino R., Verissimo C., Pereira A.A., Antunes F.: *Candida auris*, an agent of hospital-associated outbreaks: which challenging issues do we need to have in mind? *Microorganisms*. doi: 10.3390/microorganisms8020181 (2020)
84. Satoh K., Makimura K., Hasumi Y., Nishiyama Y., Uchida K., Yamaguchi H.: *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol. Immunol.* **53**, 41–44 (2009)
85. Sattler J., Noster J., Brunke A., Plum G., Wiegel P., Kurzai O., Meis J.F., Hamprecht A.: Comparison of two commercially available qPCR kits for the detection of *Candida auris*. *J. Fungi*. doi: 10.3390/jof7020154 (2021)
86. Schelenz S., Hagen F., Rhodes J.L., Abdolrasouli A., Chowdhary A., Hall A., Ryan L., Shackleton J., Trimlett R., Meis J.F. i wsp.: First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, DOI: 10.1186/s13756-016-0132-5 (2016)
87. Sexton D.J., Kordalewska M., Bentz M.L., Welsh R.M., Perlin D.S., Litvintseva A.P.: Direct detection of emergent fungal pathogen *Candida auris* in clinical skin swabs by SYBR Green-based quantitative PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* DOI: 10.1128/JCM.01337-18 (2018)
88. Shaban S., Patel M., Ahmad A. Improved efficacy of antifungal drugs in combination with monoterpene phenols against *Candida auris*. *Sci. Rep.* DOI: 10.1038/s41598-020-58203-3 (2020)
89. Sharma D., Paul R.A., Rudramurthy S.M., Kashyap N., Bhattacharya S., Soman R., Shankarnarayan S.A., Chavan D., Singh S., Das P. i wsp. : Impact of FKS1 genotype on echinocandin in vitro susceptibility in *Candida auris* and in vivo response in a murine model of infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* DOI: 10.1128/AAC.01652-21 (2022)
90. Sherry L., Ramage G., Kean R., Borman A., Johnson E.M., Richardson M.D., Rautemaa-Richardson R.: Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 328–331 (2017)
91. Short B., Brown J., Delaney C., Sherry L., Williams C., Ramage G., Kean R.: *Candida auris* exhibits resilient biofilm characteristics in vitro: implications for environmental persistence. *J. Hosp. Infect.* **103**, 92–96 (2019)
92. Srivastava V., Ahmad A.: Abrogation of pathogenic attributes in drug resistant *Candida auris* strains by farnesol. *PLoS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0233102 (2020)
93. Villanueva-Lozano H., Trevino-Rangel R.D., Gonzalez G.M., Ramirez-Elizondo M.T., Lara-Medrano R., Aleman-Bocanegra M.C., Guajardo-Lara C.E., Gaona-Chavez N., Castilleja-Leal F., Torre-Amione G., Martinez-Resendez M.F.: Outbreak of *Candida auris* infection in a COVID-19 hospital in Mexico. *Clin. Microbiol. Infect.* **27**, 813–816 (2021)
94. Wang X.J., Bing J., Zheng Q.S., Zhang F.F., Liu J.B., Yue H.Z., Tao L., Du H., Wang Y.N., Wang H., Huang G.H.: The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. *Emerg. Microbes Infect.* DOI: 10.1038/s41426-018-0095-0. (2018)
95. Wang Y.Y., Zou Y., Chen X.Q., Li H., Yin Z., Zhang B.C., Xu Y.B., Zhang Y.Q., Zhang R.L., Huang X.H., i wsp.: Innate immune responses against the fungal pathogen *Candida auris*. *Nat. Commun.* DOI: 10.1038/s41467-022-31201-x (2022).
96. White P.L., Dhillon R., Cordey A., Hughes H., Faggian F., Soni S., Pandey M., Whitaker H., May A., Morgan M., i wsp.: A national strategy to diagnose Coronavirus Disease 2019-Associated invasive fungal disease in the intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.* **73**, E1634-E1644 (2021)
97. Wiederhold N.P., Lockhart S.R., Najvar L.K., Berkow E.L., Jaramillo R., Olivo M., Garvey E.P., Yates C.M., Schotzinger R.J., Catano G., Patterson T.F. The Fungal Cyp51-specific inhibitor VT-1598 demonstrates *in vitro* and *in vivo* activity against *Candida auris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, e02233-18 (2019)
98. Wiederhold N.P., Najvar L.K., Jaramillo R., Olivo M., Patterson H., Connell A., Fukuda Y., Mitsuyama J., Catano G., Patterson T.F. The Novel arylamidine T-2307 demonstrates *in vitro* and *in vivo* activity against *Candida auris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* DOI: 10.1128/AAC.02198-19 (2020)
99. Wurster S., Albert N.D., Kontoyiannis D.P.: *Candida auris* bloodstream infection induces upregulation of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint pathway in an immunocompetent mouse model. *Msphere*. DOI: 10.1128/msphere.00817-21 (2022)
100. Wurster S., Bandi A., Beyda N.D., Albert N.D., Raman N.M., Raad I.I., Kontoyiannis D.P.: *Drosophila melanogaster* as a model to study virulence and azole treatment of the emerging pathogen *Candida auris*. *J. Antimicrob. Chemother.* **74**, 1904-1910 (2019)
101. Yue H.Z., Bing J., Zheng Q.S., Zhang Y.L., Hu T.R., Du H., Wang H., Huang G.H.: Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. *Emerg. Microbes Infect.* DOI: 10.1038/s41426-018-0187-x (2018)
102. Zamith-Miranda D., Heyman H.M., Couvillion S.P., Cordero R.J.B., Rodrigues M.L., Nimrichter L., Casadevall A., Amattuzzi R.F., Alves L.R., Nakayasu E.S., Nosanchuk J.D.: Comparative molecular and immunoregulatory analysis of extracellular vesicles from *Candida albicans* and *Candida auris*. *Msystems*. DOI: 10.1128/mSystems.00822-21 (2021)

LIPOPOLISACHARYD *PANTOEA AGGLOMERANS* A ATOPOWE ZAPALENIE SKÓRY, ALERGICZNE KONTAKTOWE ZAPALENIE SKÓRY I GOJENIE RAN

Aneta Kiecka*, Marian Szczepanik

Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Nauk o Zdrowiu,
Instytut Fizjoterapii, Katedra Nauk Biomedycznych

Wpłynęło w lutym, zaakceptowano w listopadzie 2022 r.

Streszczenie: Lipopolisacharyd (LPS) występuje w większości bakterii Gram-ujemnych i indukuje wrodzoną odpowiedź immunologiczną poprzez wiązanie się z receptorem Toll-podobnym 4 (TLR4). Interesującym zagadnieniem jest LPS wyizolowany z gatunku *Pantoea agglomerans*. Z jednej strony stanowi czynnik ryzyka chorób takich jak rany, ropień, bakteremia, zapalenie płuc, infekcje dróg moczowych, septyczne zapalenie stawów, zapalenie kości i szpiku oraz zapalenie otrzewnej. Z drugiej strony coraz częściej obserwuje się jego właściwości prozdrowotne w miażdżycy, chorobie Alzheimera i osteoporozie. Badania na ludziach i modelach zwierzęcych pokazują, że LPS z *P. agglomerans* może mieć korzystne działanie w leczeniu niektórych chorób. Ogromnym wyzwaniem jest dziś zapobieganie i leczenie chorób skóry, w tym atopowego zapalenia skóry, alergicznego kontaktowego zapalenia skóry i trudno gojących się ran. Badania pokazują, że LPS z *P. agglomerans* może być przydatny w leczeniu chorób skóry poprzez wpływ na odpowiedź immunologiczną. Badania pokazują, że LPS działa na komórki Langerhansa i prowadzi do tłumienia odpowiedzi alergicznej.

1. Wprowadzenie. 2. *Pantoea agglomerans*. 2.1. Lipopolisacharyd. 3. Lipopolisacharyd w atopowym zapaleniu skóry. 4. Lipopolisacharyd w alergicznym kontaktowym zapaleniu skóry. 5. Lipopolisacharyd a gojenie ran. 6. Podsumowanie

LIPOPOLYSACCHARIDE *PANTOEA AGGLOMERANS* AND ATOPIC DERMATITIS, ALLERGIC CONTACT DERMATITIS AND WOUND HEALING

Abstract: Lipopolysaccharide (LPS) is found in most Gram-negative bacteria and induces innate responses by binding to toll-like receptor 4 (TLR4). LPS isolated from *Pantoea agglomerans* species is an interesting issue. On the one hand, it is a risk factor for diseases such as wounds, abscess, bacteremia, pneumonia, urinary tract infections, septic arthritis, osteomyelitis and peritonitis. On the other, its health-promoting properties in atherosclerosis, Alzheimer's disease, and osteoporosis are increasingly observed. Studies in humans and animal models show that LPS from *P. agglomerans* may have beneficial effects in the treatment of certain diseases. A huge challenge today is the prevention and treatment of skin diseases, including atopic dermatitis (AD), allergic contact dermatitis (ACD), and hard-to-heal wounds. Reports show that LPS from *P. agglomerans* may be useful in the treatment of skin diseases through its effects on the immune response. Studies show that LPS acts on Langerhans cells and leads to suppression of the allergic response.

1. Introduction. 2. *Pantoea agglomerans*. 2.1. Lipopolysaccharide. 3. Lipopolysaccharide and atopic dermatitis. 4. Lipopolysaccharide and allergic contact dermatitis. 5. Lipopolysaccharide and wound healing. 6. Summary

Słowa kluczowe: alergiczne kontaktowe zapalenie skóry, atopowe zapalenie skóry, gojenie ran, immunomodulacja, lipopolisacharyd, *Pantoea agglomerans*

Keywords: allergic contact dermatitis, atopic dermatitis, wound healing, lipopolysaccharide, immunomodulation, *Pantoea agglomerans*

1. Wprowadzenie

Lipopolisacharyd (LPS) to struktura występująca u bakterii Gram-ujemnych, która indukuje wrodzoną odpowiedź immunologiczną poprzez wiązanie się z receptorem Toll-podobnym 4 (TLR4) [20, 52]. Od dawna LPS jest uznawany za toksyczny składnik bakteryjny i jest stosowany do pobudzania odpowiedzi zapal-

nych w badaniach *in vitro* i *in vivo*, takich jak zapalenie płuc i uszkodzenie jelit, wywołane przez LPS w eksperymentalnych modelach zwierzęcych [17, 73]. Jednak niektóre badania pokazują, że ekspozycja na endotoksyny, w tym LPS w dzieciństwie zmniejsza ryzyko alergii i astmy w dorosłym życiu [6]. Ciekawe zagadnienie stanowi działanie na organizm LPS wyizolowanego z gatunku *Pantoea agglomerans*. Badania prowadzone

* Autor korespondencyjny: mgr Aneta Kiecka, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Nauk o Zdrowiu, Instytut Fizjoterapii, Katedra Nauk Biomedycznych; aneta.kiecka@uj.edu.pl

© 2023 Aneta Kiecka & Marian Szczepanik

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

na ludziach oraz z zastosowaniem modelu zwierzęcego pokazują, że LPS ten może mieć korzystny wpływ na leczenie niektórych chorób. Nakata i wsp. [45] wykazali, że doustne podanie LPS z *P. agglomerans* wpływa na aktywację makrofagów (inicjowanie) i chroni przed infekcją i alergią, bez wystąpienia skutków ubocznych. Wykazano także, że LPS *P. agglomerans* zapobiega tłumieniu funkcji makrofagów w chorobach wywołanych stresem [45]. Doustnie podawany LPS może dotrzeć do otrzewnej i wzmocnić fagocytozę poprzez ścieżkę sygnalizacyjną receptora TLR4 w rezydentnych makrofagach otrzewnowych myszy [24, 28]. Analizy biochemiczne wykazały, że LPS znacznie poprawia tolerancję glukozy i obniża poziomy LDL (lipoproteiny o niskiej gęstości) utlenionego LDL w osoczu oraz znacząco zmniejsza wytwarzanie mediatorów prozapalnych, w tym białka chemotaktycznego monocytów (MCP-1) w osoczu, czynnika martwicy nowotworu- α (TNF- α) i interleukiny-6 (IL-6) w okrzynicy oraz zmniejsza aktywność oksydacyjną w próbce krwi obwodowej [28]. Korzystne skutki terapeutyczne działania LPS *P. agglomerans* wykazano również w osteoporozie, miażdżycy, chorobach metabolicznych i chorobie Alzheimer'a. Analizy biochemiczne wykazały, że LPS *P. agglomerans* wpływa na obniżenie poziomu LDL i utlenionego LDL w osoczu zapobiegając w ten sposób miażdżycy [29, 46].

Olbrzymim wyzwaniem dzisiejszych czasów jest zapobieganie oraz leczenie chorób skóry, w tym atopowego zapalenia skóry (atopic dermatitis, AD), alergicznego kontaktowego zapalenia skóry (allergic contact dermatitis, ACD) oraz trudno gojących się ran. Schorzenia te są częste, uciążliwe dla pacjentów, a ich leczenie kosztowne [27]. Wykazano, że m.in. niegojące się rany powodują ogromne wydatki na opiekę zdrowotną, których całkowity koszt szacuje się na ponad 3 miliardy dolarów rocznie [39]. Chociaż wzrost zachorowalności obserwowany jest wszędzie, najbardziej dotknięte są kraje szybko rozwijające się [59]. Stale poszukuje się skutecznych terapii w leczeniu tych schorzeń, bada się ich podłoże chorób oraz ocenia się wpływ poszczególnych czynników na ich zaostrzenie. W badaniach pojawiły się doniesienia o wpływie LPS *P. agglomerans* na złagodzenie chorób skóry. Choć nie wszystkie dane są spójne, wiele z nich mówi o łagodzeniu stanu zapalnego w chorobach skóry po stosowaniu LPS.

W przeglądzie tym zebrano dane dotyczące wpływu LPS pochodzącego od *P. agglomerans* na AD, ACD trudno gojące się rany.

2. *Pantoea agglomerans*

Bakterie gatunku *Pantoea agglomerans* produkujące żółty pigment, są bakteriami Gram-ujemnymi należącymi do rzędu *Enterobacteriales*, wcześniej były znane

jako *Enterobacter agglomerans* lub *Erwinia herbicola* [9, 70]. Gatunek ten został przeklasyfikowany do nowego rodzaju w 1989 [61]. *P. agglomerans* jest organizmem środowiskowym pochodzenia rolniczego, często izolowanym z roślin, gleby, wody i pożywienia [7]. Bakteria fermentuje węglowodany, powoli rozkłada żelatynę i nie ma zdolności do dekarboksylacji aminokwasów. Izolowana jest często od pracowników zakładów zbożowych i jest możliwym czynnikiem etiologicznym (jako fitopatogen) gorączki zbożowej (zespołu toksycznego wywołanego pyłem organicznym). Organizm ten jest patogenem oportunistycznym, aby doszło do infekcji zwykle wymagana jest obniżona odporność żywiciela m.in. nawracające zakażenia, zaburzenia żołądkowo-jelitowe i przedłużone gojenie ran [14]. W wielu doniesieniach literaturowych opisywano wyizolowanie patogennych *P. agglomerans* w przypadku: infekcji rany, ropnia, bakteriemii, zapalenia płuc, infekcji dróg moczowych, septycznego zapalenia stawów, zapalenia kości i szpiku, zapalenia otrzewnej, kamicy przewodu żółciowego, zapalenia pęcherza moczowego i zapalenia wnętrza gałki ocznej [7, 9, 10, 11, 53, 57]. Jednak coraz częściej opisuje się prozdrowotne właściwości tej bakterii. Wykazano, że woda źródłana Comano (Comano, Włochy), w której bytują m.in. *P. agglomerans* poprawia regenerację skóry, nie tylko zwiększając proliferację i migrację keratynocytów, ale także modulując zregenerowane włókna kolagenowe i elastyczne w skórze. Jednakże nie można jednoznacznie określić, że za prozdrowotne właściwości wody odpowiada tylko *P. agglomerans* ponieważ bytują w niej także inne gatunki takie jak *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Citrobacter youngae*, *Chromobacterium violaceum* [47].

2.1. Lipopolisacharyd *P. agglomerans* – budowa, właściwości

Lipopolisacharyd jest głównym składnikiem błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych [15]. LPS jest makrocząsteczkowym glikolipidem złożonym z hydrofobowego regionu lipidu A przyłączonego do długiego i rozgałęzionego łańcucha węglowodanowego. Region A lipidu jest odpowiedzialny za większość aktywności immunologicznej LPS i składa się z fosforylowanego szkieletu diglukozaminy z dołączonymi do niego czterema do siedmiu łańcuchami acylowymi. Cztery z grup acylowych są bezpośrednio połączone z pozycjami 2, 3, 2' i 3' szkieletu glukozaminy, a pozostałe dwie są przyłączone do grup hydroksylowych łańcuchów lipidowych. Lipid A z różnych gatunków bakterii wykazuje znaczną różnorodność strukturalną [37, 51]. Region węglowodanowy LPS można podzielić na dwa obszary, rdzeń i łańcuch O-specyficzny. Region rdzenia stanowi

oligocukier, który łączy łańcuch O-swoisty z lipidem A i jest stosunkowo konserwatywny wśród gatunków bakterii [51, 62]. Łańcuch O-swoisty jest zbudowany z kilkunastu do kilkudziesięciu powtarzających się podjednostek cukrowych, które warunkują swoistość antygenową. LPS nazywany jest endotoksyną, ponieważ wywołuje silną odpowiedź zapalną. Jednak LPS niektórych bakterii, w tym *Porphyromonas gingivalis* i *Helicobacter pylori*, wykazuje niską aktywność endotoksyczną w porównaniu z enterobakteriami, takimi jak np. *Escherichia coli* [15, 43, 50]. Yoshida, w 1991 roku odkryli substancję w wodnym ekstrakcie mąki pszennej, która aktywowała makrofagi po podaniu doustnym lub śródskórnym. Substancją tą był LPS, który pochodzi z zewnętrznej błony komórkowej *P. agglomerans*. Nazwano go IP-PA1 (immunopotencjator z *P. agglomerans*, dawna nazwa: LPSp). Uważa się, że preparat IP-PA1 ma zastosowanie w różnych dziedzinach, takich jak żywność (w zapobieganiu i łagodzeniu zespołów metabolicznych), produkty do pielęgnacji skóry (w celu utrzymania zdrowej skóry, złagodzenia atopowego zapalenia skóry i przeciwdziałania starzeniu) oraz jako aktywny składnik pasz do hodowli bydła (w celu ochrony przed infekcjami) [30]. Chociaż struktura lipidu A z LPS-u IP-PA z *P. agglomerans* jest prawie taka sama jak w przypadku *E. coli* i *Salmonella* ssp., skład łańcucha polisacharydowego jest różny [63]. Według Kohchi i wsp., łańcuch O-specyficzny *P. agglomerans* LPS (IP-PA1) jest krótszy w porównaniu z O-specyficznym łańcuchem LPS z *E. coli* O157:H7 ma inny skład. LPS IP-PA1 składa się z ramnozy i glukozy, podczas gdy LPS *E. coli* składa się z kolitozy, glukozaminy, glukozy i galaktozy. Całkowita masa cząsteczkowa IP-PA1 jest znacznie mniejsza niż *E. coli* LPS [30]. IP-PA1 ma mniejszą masę molekularną (5000 kDa), niż inne bakterie [48]. LPS IP-PA1 staje się obiecującym immunomodulatorem [23].

3. Lipopolisacharyd w atopowym zapaleniu skóry

Rola LPS w alergii jest tematem intensywnych badań. Blümer i wsp. badali samice myszy BALB/c eksponowane na LPS przed zapłodnieniem i w czasie ciąży. Kilka tygodni po urodzeniu potomstwo uwarżliwiono na albuminę jaja kurzego (OVA), a następnie prowokowano alergenem w aerozolu. Niniejsze badanie dostarcza pierwszych eksperymentalnych dowodów na to, że LPS może już działać w życiu prenatalnym w celu modulowania rozwoju alergii u potomstwa [5]. Badanie Tulić i wsp. pokazało, że gdy zwierzęta były eksponowane na LPS od dnia 6 do dnia 10 po uczuleniu, w dniu 12 zaobserwowano obniżony poziom przeciwciał IgG swoistych dla OVA i podwyższony poziom IgE swoistych dla OVA w porównaniu z uczulonymi

zwierzętami nienarażonymi na LPS. W badaniu tym, wykazano, że u szczurów narażenie na produkt bakteryjny LPS może zapobiegać uczuleniu na alergen *in vivo* tylko wtedy, gdy narażenie następuje na wczesnym etapie procesu uczulania, co w tym modelu oznacza do dnia 6 po pierwotnym uczuleniu alergenem. Ekspozycja na LPS po 6 dniu dodatkowo wzmocniła alergiczną odpowiedź zapalną [6, 13, 64, 71].

Atopowe zapalenie skóry to przewlekła i nawracająca choroba zapalna skóry, która często współistnieje z innymi chorobami atopowymi. Patofizjologia atopowego zapalenia skóry jest złożona i wieloczynnikowa, obejmująca elementy dysfunkcji bariery, zmiany w komórkowej odpowiedzi immunologicznej, nadwrażliwość zależną od IgE oraz czynniki środowiskowe. Około 80% pacjentów z AD wykazuje fenotyp immunologiczny charakteryzujący się wysokim poziomem swoistych dla alergenu komórek Th2 i przeciwciał IgE oraz nacieków limfocytów obecnych w skórze [3, 33, 34]. Fenotyp immunologiczny Th2 może przyczyniać się do patologii AD poprzez tłumienie wrodzonych i adaptacyjnych odpowiedzi immunologicznych przeciwko drobnoustrojom [4, 12]. Istnieją przesłanki, że lizat bakterii Gram-ujemnych takich jak *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Citrobacter youngae*, *Chromobacterium violaceum* pochodzących z gorących źródeł jest skutecznym składnikiem do pielęgnacji skóry w zapobieganiu zaostrzenia AD [19]. Ciekawym jest, że Myles i wsp. dowiedli również, że pacjenci z AD mają mniej bakterii Gram-ujemnych na skórze niż osoby zdrowe oraz że przeszczepienie bakterii Gram-ujemnych pobranych ze skóry osób zdrowych na skórę pacjentów z AD osłabiło objawy AD [42]. W badaniu Nakai i wsp. wykazano, że krem nawilżający z dodatkiem LPS (IP-PA1) był przydatny w codziennej pielęgnacji skóry pacjentów z łagodną postacią AD oraz osłabiał objawy choroby [44]. Badania pokazują, że swędzenie znacząco wpływa na pogorszenie jakości życia pacjentów z AD i dodatkowo drapanie wzmacnia objawy AD poprzez zniszczenie funkcji bariery skórnej [74]. Nakai i wsp. wykazali, że krem nawilżający z dodatkiem LPS (IP-PA1) skutecznie zmniejsza uczucie swędzenia w AD [44, 74]. Chociaż limfocyty T regulatorowe (Treg), które tłumią limfocyty T pomocnicze, istnieją w naskórku zdrowej osoby, uważa się, że funkcja Treg jest osłabiona u pacjentów z AD [8, 49, 67]. Wciąż podejmowane są próby wyjaśnienia mechanizmu wpływu LPS na AD, w tym związku LPS z IL-31 a AD. Doniesiono, że Treg stymulowane LPS wpływają immunosupresyjnie na neutrofile, tak że hamują stan zapalny [35]. Na tej podstawie można sobie również wyobrazić, że LPS aktywuje komórki Treg w celu zahamowania pomocniczych komórek T i zmniejszenia ekspresji IL-31, która powoduje stan zapalny i swędzenie [44]. Pomimo, że wiele interakcji między LPS a innymi

komórkami obecnymi w naskórku wciąż nie jest poznanych, pojawiły się pewne doniesienia wyjaśniające. Keratynocyty wyrażają TLR, w tym TLR4 i reagują na stymulację LPS. Stymulacja keratynocytów przez LPS zwiększa poziom ekspresji filagryny, białka pełniącego funkcję bariery [25]. Ponadto keratynocyty wytwarzają β -defensynę, substancję przeciwdrobnoustrojową, *in vivo* w odpowiedzi na stymulację przez LPS [55]. Na podstawie tych ustaleń można założyć, że LPS oddziałuje na keratynocyty, co wzmacnia barierową funkcję skóry i hamuje niepożądane namnażanie się bakterii [32]. W komórkach Langerhansa nie ma indukcji cytokin zapalnych w odpowiedzi na stymulację LPS [66]. Stymulacja LPS tłumi raczej ekspresję Th2 chemokiny TARC [40]. Sugeruje to, że działanie LPS na komórki Langerhansa prowadzi do tłumienia odpowiedzi alergicznej [44]. W badaniu Wakame i wsp. wykazano, że doustne podanie LPS IP-PA1 może mieć hamujący wpływ na AD. Badania przeprowadzono na myszach szczepu NC/Nga. Sugeruje się, że IP-PA1 może kontrolować reakcję immunologiczną zachodzącą *in vivo* u myszy NC/Nga na poziomie komórkowym. Dzieje się tak, ponieważ limfocyty T CD4⁺ odgrywają ważną rolę w równowadze immunologicznej reakcji obronnej gospodarza, a potwierdzono, że CD4⁺ i CD8⁺ są obecne w szczególności w komórkach AD penetrujących skórę [69]. Podsumowując, doustne podawanie IP-PA1 wykazuje hamujący wpływ na objawy AD [69].

4. Lipopolisacharyd w alergicznym kontaktowym zapaleniu skóry

Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry jest reakcją nadwrażliwości typu IV indukowaną przez alergeny kontaktowe [26]. Rozwój alergii kontaktowej wymaga uczulenia na określony alergen, a następnie wywołania odpowiedzi zapalnej po wtórnej ekspozycji na ten sam alergen [68]. Ciągłe poszukuje się przyczyn i terapii w ACD, stworzenie mysiego modelu nadwrażliwości kontaktowej (CHS) na hapteny, która jest odpowiednikiem ludzkiego ACD pozwoliło na poznanie wielu mechanizmów tej choroby i daje nadzieję na znalezienie kolejnych możliwych przyczyn jej powstania oraz ewentualnych skutecznych terapii [1, 2]. W CHS faza sensytyzacji rozpoczyna się po pierwszym kontakcie z haptentem [16]. Wnikający w skórę alergen kontaktowy łatwo wiąże się z wszelkiego rodzaju składnikami skóry, w tym z białkami głównego układu zgodności tkankowej (MHC) [72]. Po kontakcie z alergenem około 40% lokalnych LC ulega aktywacji, opuszcza naskórek i migruje naczyniami limfatycznymi do drenujących węzłów chłonnych, gdzie osadzają się w obszarach przykorowych limfocytów T. Bezpośrednio po kontakcie z alergenem indukowane jest wytwarzanie

mRNA interleukiny-1 β (IL- β) i uwalnianie białka IL-1 β z LC. Z kolei IL-1 β stymuluje uwalnianie czynnika martwicy nowotworu- α (TNF- α) i czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów-makrofagów (GM-CSF) z keratynocytów. IL-1 β i TNF- α hamują ekspresję związanej z błoną E-kadheryny i w ten sposób powodują odłączenie LC od otaczających keratynocytów [16]. Jednocześnie wzrasta ekspresja cząsteczek adhezyjnych, które promują migrację LC poprzez pośredniczenie w oddziaływaniach z macierzą zewnątrzkomórkową i komórkami skóry, takimi jak CD54, integryna $\alpha 6$ i warianty CD44. Również produkcja metaloproteinazy 9, enzymu degradującego błonę podstawną naskórka, jest podwyższona w aktywowanych LC [54]. Zbadano, czy wstrzyknięty śródskórnym LPS zmienia funkcje skórnych DC, prowadząc do zwiększonej nadwrażliwości kontaktowej (CHS). LPS zwiększył indukcję CHS u myszy. LPS nie zwiększył zdolności stymulacyjnej DC w drenujących LN po zastosowaniu haptenu. LPS zmienił gęstość i morfologię naskórkowej komórki I-A⁺ u myszy. LPS zwiększył odsetek komórek I-A⁺ FITC w LN 24 godziny po zastosowaniu FITC [76]. Najnowsze badania nad LPS IP-PA1 pokazują, że może on modulować odpowiedź zapalną i osłabiać odpowiedź immunologiczną w ACD. W badaniu Tanaka i wsp. testowano wpływ miejscowej aplikacji LPS IP-PA1 przed wywołaniem nadwrażliwości u myszy szczepu C57BL/6 poprzez 2,4-dinitrofluorobenzen (DNFB). LPS pochodzący z *P. agglomerans* nakładano na skórę brzucha myszy lub na skórę ucha przez 2 tygodnie, a następnie uczulano DNFB lub podawano od momentu uczulenia przez 7 dni. Badanie pokazało, że w przypadku podania LPS IP-PA1 przed uczuleniem obrzęk i nacieki limfocytów do skóry właściwej został zmniejszony. Następnie oceniono wpływ LPS IP-PA1 na fazę wzbudzenia. W tym przypadku LPS IP-PA1 nie wpłynął na obrzęk ucha. Badanie to pokazało, że miejscowa aplikacja LPS IP-PA1 może wpłynąć na CHS na fazę uczulenia, lecz nie wzbudzenia [60]. Istotnym etapem fazy uczulenia dla CHS jest migracja komórek skóry zawierających haptent do LN drenujących skórę [22, 56]. Obecnie w skórze identyfikowane są komórki Langerhansa i cztery typy DC, z których niektóre mogą migrować przez przewody limfatyczne do LN drenujących skórę w odpowiedzi na stymulację. Stwierdzono, że u myszy traktowanych LPS IP-PA1 liczba komórek FITC-dodatnich bramkowanych na DC CD11c⁺ lub CD11c⁺ CD207⁺, które migrowały ze skóry do drenujących LN po zastosowaniu FITC, znacznie spadła. Jednak na całkowitą liczbę DC11c⁺ lub CD11c⁺ CD207⁺ wpływających do LN nie miała wpływu aplikacja LPS IP-PA1. Wyniki te sugerują, że zastosowanie LPS IP-PA1 osłabiło migrację komórek wychwytyjących antygen, głównie DC, do LN drenujących skórę, a następnie osłabiło aktywację komórek T w LN [60].

5. Lipopolisacharyd, a gojenie ran

Trudno gojące lub niegojące się rany stanowią istotną przyczynę zachorowalności i śmiertelności dla dużej części populacji. Jednym z podstawowych mechanizmów odpowiedzialnych za niepowodzenie gojenia się ran przewlekłych jest wymykająca się spod kontroli reakcja zapalna, która jest samopodtrzymująca się [39]. Proces gojenia ran składa się z czterech wysoce zintegrowanych i zachodzących na siebie faz: hemostazy, zapalenia, proliferacji i przebudowy lub rozwiązania tkanki [18]. Te fazy i ich funkcje bio-fizjologiczne muszą zachodzić we właściwej kolejności, w określonym momencie i trwać przez określony okres czasu z optymalną intensywnością [38]. Niegojące się rany dotyczą około 3 do 6 milionów ludzi w Stanach Zjednoczonych, przy czym osoby w wieku 65 lat i starsze stanowią 85% przypadków [39]. Limfocyty T migrują do ran w ślad za komórkami zapalnymi i makrofagami i osiągają szczyt w fazie późnej proliferacji/wczesnej przebudowy. Rola limfocytów T nie jest do końca poznana i jest obecnie obszarem intensywnych badań. Niektóre badania sugerują, że opóźniona infiltracja limfocytów T wraz ze zmniejszonym stężeniem limfocytów T w miejscu rany jest związana z osłabieniem gojenia ran [58]. W łożysku rany fibroblasty produkują kolagen oraz glikozaminoglikany i proteoglikany, które są głównymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Po silnej proliferacji i syntezie ECM gojenie się ran wchodzi w końcową fazę przebudowy, która może trwać latami [21]. Prowadzone są intensywne badania mające na celu znalezienie stymulanta gojenia ran. W raporcie Kostarney i wsp. opisano pierwsze badanie wpływu leczenia mysich ran skóry za pomocą miejscowego bakteryjnego LPS, głównego egzogenego ligandu receptora TLR4. Badacze pokazują, że leczenie LPS silnie wpływa na proces gojenia ran poprzez przyspieszenie ustępowania stanu zapalnego, zwiększenie infiltracji makrofagów, zwiększenie syntezy kolagenu oraz zmianę wydzielania szeregu mediatorów biorących udział w procesie regeneracji skóry. Miejscowe leczenie LPS zwiększało wydzielanie cytokin prozapalnych interleukiny (IL)-6, IL-1 β i czynnik hamujący białaczkę (LIF) i chemokiny CC: CCL2/MCP-1, CCL7/MCP-3, CCL3/MIP-1 α i CCL5/RANTES, ale nie chemokiny CXC (CXCL2/MIP-2 i CXCL9/MIG) [31]. Morishima i wsp. zbadali kilka przypadków trudno gojących się ran i zastosowania LPS IP-P1 w kremie. Wykazano, że gojące rany działanie LPS wynika podobno z jego zdolności do wywoływania działania przeciwzapalnego i funkcji naprawczej tkanek [41]. Naukowcy doszli do wniosku, że migracja keratynocytów jest hamowana przez produkty bakteryjne, wykrywane przez TLR4, a także przez TLR2. Jako, że rany przewlekłe zawsze wykazują obecność pewnych

bakterii, odkrycia te dostarczają możliwego wyjaśnienia nie gojenia się wrzodów [36]. Wykazano, że LPS może promować proliferację i syntezę kolagenu fibroblastów w pewnym zakresie niskich dawek, ale zbyt wysoka dawka LPS może hamować proliferację i syntezę kolagenu fibroblastów, w związku z tym sugeruje się, że LPS w pewnych stężeniach może przyczyniać się do gojenia się ran, podczas gdy nadmierne stężenie LPS ma negatywny wpływ na gojenie się ran [75]. Rola LPS w gojeniu ran wymaga jeszcze dokładnego poznania tych mechanizmów. Choć istnieją też sprzeczne z tym doniesienia, że w przypadku przedłużonego gojenia ran pourazowych należy brać pod uwagę obecność ciał obcych pochodzenia roślinnego zakażonych *P. agglomerans*. Usunięcie takich ciał obcych prowadzi do szybkiego gojenia się ran [65].

6. Podsumowanie

Bakterie gatunku *P. agglomerans* są interesującymi bakteriami Gram-ujemnymi. Z jednej strony stanowią one czynnik ryzyka wystąpienia chorób takich jak: rany, ropnie, bakteriemia, zapalenie płuc, infekcje dróg moczowych, septyczne zapalenie stawów, zapalenie kości i szpiku, zapalenie otrzewnej, a z drugiej strony coraz częściej obserwuje się ich prozdrowotne właściwości w miażdżycy, chorobie Alzheimera, czy osteoporozie. Naukowcy wykazali, że składnik zewnętrznej błony bakterii *P. agglomerans* LPS IP-P1 ujawnia niezwykle szerokie spektrum właściwości leczniczych, głównie dzięki zdolności do utrzymania homeostazy. LPS IP-P1 działa jako immunomodulator. Mały amfipatyczny IP-PA1 łatwo tworzy micelle o małej średnicy, które łatwo przenikają przez błonę śluzową i/lub skórę, wzmacniając pozytywne działanie leczenia po podaniu doustnym lub śródskórnym. Ta endotoksyna wpływa na zahamowanie lub produkcję określonych cytokin i modulację odpowiedzi immunologicznej.

Choroby skóry w tym: AD, ACD i trudno gojące się rany stanowią olbrzymi problem medyczny dzisiejszych czasów, obciążając w ten sposób służbę zdrowia. Obecnie kortykosteroidy są powszechnie stosowane np. w leczeniu AD, chociaż leki te mają potencjalne działania niepożądane. Dlatego istnieje pilna potrzeba zbadania nowych alternatywnych sposobów zapobiegania i leczenia AD. Kolejne doniesienia pokazują, że LPS z *P. agglomerans* może być przydatny w leczeniu chorób skóry poprzez jego wpływ na odpowiedź immunologiczną. Badania pokazują, że LPS działa na komórki Langerhansa i prowadzi do stłumienia odpowiedzi alergicznej.

Jednak ze względu na kilka doniesień o wyizolowaniu *P. agglomerans* np. z trudno gojącej się rany potrzebne są dalsze badania na szeroką skalę oceniające jej

prozdrowotne właściwości. Koniecznym jest określenie dokładnego mechanizmu, dzięki któremu LPS moduluje odpowiedź immunologiczną w chorobach skóry oraz możliwe określenie odpowiedniej dawki prozdrowotnej aplikowanej pacjentom z chorobami skóry.

Piśmiennictwo

- Askenase P.W., Itakura A., Leite-de-Moraes M.C., Lisbonne M., Roongapinun S., Goldstein D.R., Szczepanik M.: TLR-dependent IL-4 production by invariant Valpha14+Jalpha18+ NKT cells to initiate contact sensitivity *in vivo*. *J. Immunol.* **15**, 6390–6401 (2005)
- Askenase P.W., Szczepanik M., Itakura A., Kiener C., Campos RA.: Extravascular T-cell recruitment requires initiation begun by Valpha14+ NKT cells and B-1 B cells. *Trends Immunol.* **5**, 441–449 (2004)
- Biedermann B.C., Sahner S., Gregor M., Tsakiris D.A., Jeaneret C., Pober J.S., Gratwohl A.: Endothelial injury mediated by cytotoxic T lymphocytes and loss of microvessels in chronic graft versus host disease. *Lancet*, **15**, 2078–2083 (2002)
- Biedermann T.: Dissecting the role of infections in atopic dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* **86**, 99–109 (2006)
- Blümer N., Herz U., Wegmann M., Renz H.: Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. *Clin. Exp. Allergy*, **35**, 397–402 (2005)
- Braun-Fahrlander C., Riedler J. i wsp.: Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* **347**, 869–877 (2002)
- Büyükcama A., Tuncer Ö., Gür D., Sancak B., Ceyhan M., Cengiz AB., Kara A.: Clinical and microbiological characteristics of *Pantoea agglomerans* infection in children. *J. Infect. Public Health*, **11**, 304–309 (2018)
- Caramalho I., Lopes-Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M., Demengeot J.: Regulatory T-cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **197**, 403–411 (2003)
- Cheng A., Liu C.Y., Tsai H.Y., Hsu M.S., Yang C.J., Huang Y.T., Liao C.H., Hsueh P.R.: Bacteremia caused by *Pantoea agglomerans* at a medical center in Taiwan, 2000–2010. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **46**, 187–194 (2013)
- Chiou Y.L., Shih C.J., Ko W.S.: The increased ratio of CD4+/CD8+ was positively correlated with inflammation in hepatitis C patients with metabolic syndrome. *Clin. Biochem.* **46**, 745–749 (2013)
- Cruz A.T., Cazacu A.C., Allen C.H.: *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1989–1992 (2007)
- David Boothe W., Tarbox J.A., Tarbox M.B.: Atopic Dermatitis: Pathophysiology. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1027**, 21–37 (2017)
- Eisenbarth SC., Piggott DA., Huleatt JW., Visintin I., Herrick C.A., Bottomly K.: Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med.* **16**, 1645–1651 (2002)
- Flores Popoca E.O., Miranda García M., Romero Figueroa S., Mendoza Medellín A., Sandoval Trujillo H., Silva Rojas H.V., Ramírez Durán N.: *Pantoea agglomerans* in immunodeficient patients with different respiratory symptoms. *Scien. World J.* **2012**, e156827 (2012)
- Fujimoto Y., Shimoyama A., Saeki A., Kitayama N., Kasamatsu C., Tsutsui H., Fukase K.: Innate immunomodulation by lipophilic termini of lipopolysaccharide; synthesis of lipid As from *Porphyromonas gingivalis* and other bacteria and their immunomodulative responses. *Mol. Biosyst.* **9**, 987–996 (2013)
- Gaspari AA., Katz SI.: Contact hypersensitivity. *Curr. Protoc. Immunol.* **4**, 4.2 (2001)
- Gonçalves de Moraes V.L., Singer M., Vargaftig B.B., Chignard M.: Effects of rolipram on cyclic AMP levels in alveolar macrophages and lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse lung. *Br. J. Pharmacol.* **123**, 631–636 (1998)
- Gosain A., DiPietro LA.: Aging and wound healing. *World. J. Surg.* **28**, 321–326 (2004)
- Gueniche A., Knaudt B., Schuck E., Volz T., Bastien P., Martin R., Röcken M., Breton L., Biedermann T.: Effects of nonpathogenic gram-negative bacterium *Vitreoscilla filiformis* lysate on atopic dermatitis: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Br. J. Dermatol.* **159**, 1357–1363 (2008)
- Guest RL., Rutherford ST., Silhavy TJ.: Border Control: Regulating LPS Biogenesis. *Trends Microbiol.* **29**, 334–345 (2021)
- Guo S., DiPietro L.A.: Factors affecting wound healing. *J. Dent. Res.* **89**, 219–229 (2010)
- Hara-Chikuma M., Sugiyama Y., Kabashima K., Sohara E., Uchida S., Sasaki S., Inoue S., Miyachi Y.: Involvement of aquaporin-7 in the cutaneous primary immune response through modulation of antigen uptake and migration in dendritic cells. *FASEB. J.* **26**, 211–218 (2012)
- Hebishima T., Matsumoto Y., Watanabe G., Soma G., Kohchi C., Taya K., Hayashi Y., Hirota Y.: Recovery from immunosuppression-related disorders in humans and animals by IP-PA1, an edible lipopolysaccharide. *Anticancer. Res.* **30**, 3113–3118 (2010)
- Inagawa H., Kobayashi Y., Kohchi C., Zhang R., Shibasaki Y., Soma G.: Primed Activation of Macrophages by Oral Administration of Lipopolysaccharide Derived from *Pantoea agglomerans*. *In Vivo*, **30**, 205–211 (2016)
- Isard O., Knol A.C., Aries M.F., Nguyen J.M., Khammari A., Castex-Rizzi N., Dreno B.: Propionibacterium acnes activates the IGF-1/IGF-1R system in the epidermis and induces keratinocyte proliferation. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 59–66 (2011)
- Jakasa I., Thyssen J.P., Kezic S.: The role of skin barrier in occupational contact dermatitis. *Exp. Dermatol.* **27**, 909–914 (2018)
- Jenner N., Campbell J., Marks R.: Morbidity and cost of atopic eczema in Australia. *Australas. J. Dermatol.* **45**, 16–22 (2004)
- Kobayashi Y., Inagawa H., Kohchi C., Kazumura K., Tsuchiya H., Miwa T., Okazaki K., Soma GI.: Oral administration of *Pantoea agglomerans*-derived lipopolysaccharide prevents development of atherosclerosis in high-fat diet-fed apoE-deficient mice via ameliorating hyperlipidemia, pro-inflammatory mediators and oxidative responses. *PLoS One*, **27**, e 0195008 (2018)
- Kobayashi Y., Inagawa H., Kohchi C., Kazumura K., Tsuchiya H., Miwa T., Okazaki K., Soma GI.: Oral administration of *Pantoea agglomerans*-derived lipopolysaccharide prevents metabolic dysfunction and Alzheimer's disease-related memory loss in senescence-accelerated prone 8 (SAMP8) mice fed a high-fat diet. *PLoS One*, **13**, e0198493 (2018)
- Kohchi C., Inagawa H., Nishizawa T., Yamaguchi T., Nagai S., Soma G.: Applications of lipopolysaccharide derived from *Pantoea agglomerans* (IP-PA1) for health care based on macrophage network theory. *J. Biosci. Bioeng.* **102**, 485–496 (2006)
- Kostarnoy A.V., Gancheva P.G., Logunov D.Y., Verkhovskaya L.V., Bobrov M.A., Scheblyakov D.V., Tikhvatulin A.I., Filipova N.E., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L.: Topical bacterial lipopolysaccharide application affects inflammatory response and promotes wound healing. *J. Interferon Cytokine Res.* **335**, 14–22 (2013)

32. Kubo C., Tsutsui T.W., Tamura Y., Kumakura S., Tsutsui T.: Immortalization of normal human gingival keratinocytes and cytological and cytogenetic characterization of the cells. *Odontology*, **97**, 18–31 (2009)
33. Leung D.Y., Bieber T.: Atopic dermatitis. *Lancet*, **11**, 151–160. (2003)
34. Leung D.Y., Boguniewicz M., Howell M.D., Nomura I., Hamid Q.A.: New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* **113**, 651–657 (2004)
35. Lewkowicz N., Klink M., Mycko M.P., Lewkowicz P.: Neutrophil-CD4+CD25+ T-regulatory cell interactions: A possible new mechanism of infectious tolerance. *Immunobiology*, **218**, 455–464 (2013)
36. Loryman C., Mansbridge J.: Inhibition of keratinocyte migration by lipopolysaccharide. *Wound Repair Regen.* **16**, 45–51 (2008)
37. Maeshima N., Fernandez R.C.: Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell. Infect. Microbiol.* **3**, e3 (2013)
38. Mathieu D., Linke J.C., Wattel F.: Non-healing wounds. In: Handbook on hyperbaric medicine. *Springer*, **2**, 401–427 (2006)
39. Menke N.B., Ward K.R., Witten T.M., Bonchev D.G., Diegelmann R.F.: Impaired wound healing. *Clin. Dermatol.* **25**, 19–25 (2007)
40. Mitsui H., Watanabe T., Saeki H., Mori K., Fujita H., Tada Y., Asahina A., Nakamura K., Tamaki K.: Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 95–102 (2004)
41. Morishima A., Inagawa H.: Improvement in Protracted Wound Healing by Topical Cream Containing Lipopolysaccharide Derived from *Pantoea agglomerans*. *Anticancer Res.* **38**, 4375–4379 (2018)
42. Myles I.A., Williams K.W., Reckhow J.D., Jammeh M.L., Pincus N.B., Sastalla I., Saleem D., Stone K.D., Datta S.K.: Transplantation of human skin microbiota in models of atopic dermatitis. *JCI. Insight*, **1**, e86955 (2016)
43. Nair B.C., Mayberry W.R., Dziak R., Chen P.B., Levine M.J., Hausmann E.: Biological effects of a purified lipopolysaccharide from *Bacteroides gingivalis*. *J. Periodontal. Res.* **18**, 40–49 (1983)
44. Nakai K., Kubota Y., Soma G.I., Kohchi C.: The Effect of lipopolysaccharide-containing moisturizing cream on skin care in patients with mild atopic dermatitis. *In Vivo*, **33**, 109–114 (2019)
45. Nakata K., Inagawa H., Soma G.: Lipopolysaccharide IP-PA1 from *Pantoea agglomerans* prevents suppression of macrophage function in stress-induced diseases. *Anticancer, Res.* **31**, 2437–2440 (2011)
46. Nakata K, Nakata Y, Inagawa H, Nakamoto T, Yoshimura H, Soma G.: *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide maintains bone density in premenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Food. Sci. Nutr.* **2**, 638–646 (2014)
47. Nicoletti G., Corbella M., Jaber O., Marone P., Scevola D., Faga A.: Non-pathogenic microflora of a spring water with regenerative properties. *Biomed. Rep.* **3**, 758–762 (2015)
48. Nishizawa T., Inagawa H., Oshima H., Okutomi T., Tsukioka D., Iguchi M., Soma G., Mizuno D.: Homeostasis as regulated by activated macrophage. I. Lipopolysaccharide (LPS) from wheat flour: isolation, purification and some biological activities. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 479–483 (1992)
49. Ou L.S., Goleva E., Hall C., Leung D.Y.: T-Regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 756–763 (2004)
50. Park B.S., Lee J.O.: Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.* **6**, e66 (2013)
51. Raetz C.R., Whitfield C.: Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635–700 (2002)
52. Rathinam V.A.K., Zhao Y., Shao F.: Innate immunity to intracellular LPS. *Nat. Immunol.* **20**, 527–533 (2019)
53. Rave O., Assous M.V., Hashkes P.J., Lebel E., Hadas-Halpern I., Megged O.: *Pantoea agglomerans* foreign body-induced septic arthritis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **31**, 1311–1312 (2012)
54. Rustemeyer T., Pilz B., Frosch P.J.: Contact allergies in medical occupations. *Hautarzt.* **45**, 834–844 (1994)
55. Seo S.J., Ahn S.W., Hong C.K., Ro B.I.: Expressions of beta-defensins in human keratinocyte cell lines. *J. Dermatol. Sci.* **27**, 183–191 (2001)
56. Sheng J., Chen Q. i wsp.: Fate mapping analysis reveals a novel murine dermal migratory Langerhans-like cell population. *Elife*, **10**, e65412 (2021)
57. Sudhalkar A., Majji A.B., Chhablani J., Manderwad G.: *Pantoea agglomerans* endophthalmitis: clinical features and outcomes. *Retina*, **34**, 1702–1706 (2014)
58. Swift M.E., Burns A.L., Gray K.L., DiPietro L.A.: Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 1027–1035 (2001)
59. Sybilski A.J., Raciborski F., Lipiec A., Tomaszewska A., Lusawa A., Samel-Kowalik P., Walkiewicz A., Krzych E., Komorowski J., Samoliński B.: Atopic dermatitis is a serious health problem in Poland. Epidemiology studies based on the ECAP study. *Postepy Dermatol. Alergol.* **32**, 1–10 (2015),
60. Tanaka M., Kohchi C., Inagawa H., Ikemoto T., Hara-Chikuma M.: Effect of topical application of lipopolysaccharide on contact hypersensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1**, 100–106 (2022)
61. Tindall B.J.: The combination *Enterobacter agglomerans* is to be cited as *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 and the combination *Pantoea agglomerans* is to be cited as *Pantoea agglomerans* (Beijerinck 1888) Gavini et al. 1989. Opinion 90. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 3582–3583 (2014)
62. Trent M.S., Stead C.M., Tran A.X., Hankins J.V.: Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J. Endotoxin. Res.* **12**, 205–223 (2006)
63. Tsukioka D., Nishizawa T., Miyase T., Achiwa K., Suda T., Soma G., Mizuno D.: Structural characterization of lipid A obtained from *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide. *FEMS Microbiol Lett.* **15**, 239–244 (1997),
64. Tulić M.K., Wale J.L., Holt P.G., Sly P.D.: Modification of the inflammatory response to allergen challenge after exposure to bacterial lipopolysaccharide. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **22**, 604–612 (2000)
65. Vaiman M., Lazarovich T., Lotan G.: *Pantoea agglomerans* as an indicator of a foreign body of plant origin in cases of wound infection. *J. Wound. Care.* **22**, 184–185 (2013)
66. van der Aar A.M., Picavet D.I. i wsp.: Langerhans cells favor skin flora tolerance through limited presentation of bacterial antigens and induction of regulatory T cells. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1240–1249 (2013)
67. Verhagen J., Akdis M., Traidl-Hoffmann C., Schmid-Grendelmeier P., Hijnen D., Knol EF., Behrendt H., Blaser K., Akdis C.A.: Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **117**, 176–183 (2006)
68. Voller L.M., Kullberg S.A., Liou Y.L., Hylwa S.A.: Effectiveness of support groups for patients with contact dermatitis: a pilot study. *Dermatitis.* **31**, 383–388 (2020)
69. Wakame K., Komatsu K., Inagawa H., Nishizawa T.: Immunopotentiator from *Pantoea agglomerans* Prevents Atopic Dermatitis

- Induced by *Dermatophagoides farinae* Extract in NC/Nga Mouse. *Anticancer. Res.* **35**, 4501–4508 (2015)
70. Walterson AM., Stavrinos J.: *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 968–984 (2015)
71. Wang N., McKell M. i wsp.: Lipopolysaccharide suppresses IgE-mast cell-mediated reactions. *Clin. Exp. Allergy.* **47**, 1574–1585 (2017)
72. Weltzien HU., Moulon C., Martin S., Padovan E., Hartmann U., Kohler J.: T cell immune responses to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions. *Toxicology*, **22**, 141–151 (1996)
73. Williams J.M., Duckworth C.A. i wsp.: A mouse model of pathological small intestinal epithelial cell apoptosis and shedding induced by systemic administration of lipopolysaccharide. *Dis. Model. Mech.* **6**, 1388–1399 (2013)
74. Wilson S.R., Thé L., Batia L.M., Beattie K., Katibah G.E., McClain S.P., Pellegrino M., Estandian D.M., Bautista D.M.: The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell.* **10**, 285–295 (2013)
75. Yang H., Li F., Chai J.: Influence of lipopolysaccharide on the biological characteristics of skin fibroblasts and its potential role in wound healing. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, **20**, 873–876 (2006)
76. Yokoi S., Niizeki H., Iida H., Asada H., Miyagawa S.: Adjuvant effect of lipopolysaccharide on the induction of contact hypersensitivity to haptens in mice. *J. Dermatol. Sci.* **53**, 120–128 (2009)

KOLEKCJE KULTUR MIKROORGANIZMÓW, A BIOBANKI MIKROBIOLOGICZNE W KONTEKŚCIE NOWYCH NORM ISO

Ewelina Jaroszewska*, Justyna Nasiłowska, Barbara Sokołowska

Kolekcja Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych¹ – Centrum Zasobów Mikrobiologicznych, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Waclawa Dąbrowskiego – PIB, Warszawa

Wpłynęło w czerwcu 2022 r., zaakceptowano w listopadzie 2022 r.

Streszczenie: W celu zaspokojenia rosnących potrzeb gospodarki światowej w zakresie biotechnologii, kolekcje kultur muszą zmieniać sposób działania z biernego przechowywania mikroorganizmów w aktywne centra zasobów mikrobiologicznych, których usługi powinny wykraczać poza ich udostępnianie. Ochrona i świadome wykorzystanie mikroorganizmów mają na celu współtworzenie strategii odpowiedzialnego i zrównoważonego rozwoju, opartego na wiedzy eksperckiej. W niniejszym artykule podjęto tematykę dotyczącą powstającego w ostatnim czasie panelu norm specyficznych dla biobanków oraz wymagań, którym muszą sprostać kolekcje kultur aby przekształcić się w nowoczesne biobanki mikrobiologiczne.

1. Wprowadzenie. 2. Kolekcje Kultur i Centra Zasobów Mikrobiologicznych (Biobanki Mikrobiologiczne). 3. System zarządzania jakością. 4. Biobanki. 5. Bazy danych związane z materiałem biologicznym – przechowywanie i zarządzanie danymi. 6. Podsumowanie

MICROBIAL CULTURE COLLECTIONS AND MICROBIOLOGICAL BIOBANKS IN THE CONTEXT OF NEW ISO STANDARDS

Abstract: In order to meet the growing needs of the world economy for biotechnology, culture collections must transform the way they operate from passive storage of microbial resources to active microbial resource centers whose services should go beyond the provision of microbes. The protection and conscious use of microorganisms aims to co-create a strategy for responsible and sustainable development, based on expert knowledge. This article deals with the subject of the recently developed panel of biobank-specific standards and the requirements that must be met by culture collections to transform into modern microbial biobanks.

1. Introduction. 2. Culture Collection and Microbial Resource Centers (Microbial Biobanks). 3. Quality Management System. 4. Biobanking. 5. Databases related to biological material – data storage and management. 6. Summary

Słowa kluczowe: biobankowanie, biobanki mikrobiologiczne, MRC, QMS, zasoby mikrobiologiczne
Keywords: biobanking, microbial biobank, MRC, QMS, microbiological resources

1. Wprowadzenie

Tempo postępu biotechnologii prowadzi do dynamicznego wzrostu ilości danych i informacji naukowych, w tym mikrobiologicznych, genotypowych i fenotypowych. Kolekcje czystych kultur drobnoustrojów oraz Centra Zasobów Mikrobiologicznych, zwane także biobankami mikrobiologicznymi (Tabela I), odgrywają kluczową rolę w ochronie i obiegu zasobów mikrobiologicznych oraz powiązanych z nimi danych. Mają one zasadnicze znaczenie dla postępu nauk przyrodniczych i biogospodarki [8, 22]. Kolekcje są odpowiedzialne za gromadzenie, selekcję, przechowywanie i rozpowszech-

nianie danych i informacji związanych z powierzonym materiałem biologicznym spełniając przy tym wysokie standardy jakości i wiedzy specjalistycznej wymaganej przez międzynarodową społeczność naukowców i przemysłu. Takie zadania wymagają wieloaspektowego podejścia zarówno w zarządzaniu materiałami oraz informacją, a także opracowania nowych metodologii w celu zapewnienia jakości procedur.

Biobanki różnią się znacznie pod względem rodzaju posiadanego materiału biologicznego, podejmowanych działań, świadczonych usług, a także ich położenia geograficznego, wielkości i struktury. W ostatnim czasie Komitet Techniczny ISO/TC 276 Biotechnologia dążąc

* Autor korespondencyjny: Ewelina Jaroszewska, Kolekcja Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych – Centrum Zasobów Mikrobiologicznych¹, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Prof. Waclawa Dąbrowskiego – PIB, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa; tel.: 226063605; e-mail: ewelina.jaroszewska@ibprs.pl

© 2023 Ewelina Jaroszewska et al.

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

¹ Kolekcja Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych – Centrum Zasobów Mikrobiologicznych (IBPRS, Warszawa, Polska), wspierana przez Europejski program badawczo-innowacyjny Horyzont 2020 w ramach umowy o grant nr 871129-IS_MIRRI21 Projekt

Tabela I
Nazewnictwo repozytoriów zasobów mikro-/biologicznych

Nawa polska	Nawa angielska	Akronim
Kolekcje czystych kultur drobnoustrojów	Culture Collection of Microorganisms	CC
Centrum Zasobów Biologicznych/ Biobank	Biological Resource Center/Biobank	BRC
Centrum Zasobów Mikrobiologicznych/ Biobank Mikrobiologiczny	Microbiological Resource Center/ Microbiological biobank	MRC

do wprowadzenia uzgodnionych na szczeblu międzynarodowym wspólnych wytycznych opracował normy dotyczące prowadzenia biobanków, aby stworzyć ogólnoświatowe zrozumienie jakości, zaufania, niezawodności i poprawić wydajność biobanków [13].

2. Kolekcje Kultur i Centra Zasobów Mikro-biologicznych (Biobanki Mikrobiologiczne)

Miliony gatunków drobnoustrojów zasiedlające naszą planetę stanowią nieprzebrane źródło biologicznej różnorodności, ważnej zarówno z powodów naukowych, jak też komercyjnych. Mikroorganizmy są podstawą wielu dziedzin działalności człowieka i odgrywają kluczową rolę w wielu sektorach biogospodarki. Są wykorzystywane do produkcji żywności, biopaliw i energii elektrycznej, ochrony roślin i zwierząt, przekształcania odpadów organicznych, a także biosyntezy istotnych substancji takich jak antybiotyki, leki, enzymy, witaminy, czy barwniki.

Światowe kolekcje kultur już od ponad 100 lat gromadzą materiał biologiczny i podejmują badania interdyscyplinarne. Do zadań CC należy pozyskiwanie, analizowanie, długoterminowe przechowywanie oraz dystrybucja zgromadzonego materiału biologicznego wraz z powiązanymi danymi. Do kręgu zainteresowań CC należą szczepy bakterii, drożdży, grzybów strzępkowych, bakteriofagi, algi wykazujące szczególne właściwości przydatne w procesach biotechnologicznych i/lub przedstawiające inną wartość naukową bądź technologiczną. Poza tym istnieją kolekcje deponujące linie komórkowe, kwasy nukleinowe (genomowy i plazmidowy DNA, wektory lub geny). Kolekcje kultur odgrywają kluczową rolę w zapewnieniu stabilności fizjologicznej, biotechnologicznej i genetycznej materiału biologicznego. Powyższy cel realizowany jest m.in. przez dobór odpowiedniej metody konserwacji i przechowywania, okresową kontrolę materiału biologicznego, a także walidację stosowanych metod i procedur. Na świecie istnieje wiele rodzajów CC, o różnym potencjale, statusie i zasięgu. Publiczne CC dostarczają swoje produkty i usługi społeczeństwu. Z kolei badawcze CC świadczą usługi istotne dla podmiotów badawczych tj. instytutów naukowych i uczelni. Pomimo znacznych różnic dotyczących pochodzenia zasobów kolekcji,

przeznaczenia, a także źródła finansowania czy rodzaju interesariuszy, wszystkie CC mierzą się z podobnymi wyzwaniami związanymi ze stabilnością finansową oraz gwarancją jakości przechowywanego materiału biologicznego i związanych z nim danych.

Podążając za strategią bardziej ekologicznego, zdrowszego i zrównoważonego środowiska, opartego na ochronie, badaniu i waloryzacji zasobów mikrobiologicznych i bioróżnorodności powołano do istnienia tzw. Centra Zasobów Mikrobiologicznych. MRCs są uważane za jeden z kluczowych elementów zrównoważonej międzynarodowej infrastruktury naukowej, która jest niezbędna, aby zapewnić dostarczanie korzyści płynących z biotechnologii, zarówno w sektorze zdrowia, przemyśle i innych ważnych obszarach biogospodarki [14]. Centra Zasobów Mikrobiologicznych stanowią najbardziej aktualną i nowoczesną formę CC. Są to podstawowe infrastruktury przechowujące i zarządzające zasobami mikrobiologicznymi w celu zagwarantowania ochrony różnorodności mikrobiologicznej i zapewnienia źródeł drobnoustrojów dla badań i przemysłu [22]. Poza utrzymywaniem i dystrybucją zasobów biologicznych oferowanych przez typowe CCs, MRCs zapewniają produkty i usługi, które wykraczają daleko poza utrzymanie i dystrybucję zasobów mikrobiologicznych oferowanych przez typowe CC. Opierają się na określonych i zatwierdzonych procedurach zapewniania jakości, zapewniają głęboką wiedzę fachową w zakresie systematyki drobnoustrojów oraz utrzymują wiedzę prawną w zakresie praw własności i bio-bezpieczeństwa.

Kolekcje kultur drobnoustrojów mogą przekształcić się w MRCs, jeśli sprostają różnego rodzaju wyzwaniom. Należą do nich: zapewnienie stabilności finansowej, zgodność z prawodawstwem, wdrożenie systemu zarządzania jakością (Quality Management System – QMS), zwiększenie dostępu do informacji, technologii, szkoleń, zasobów biologicznych, czy ekspertyz taksonomicznych i bioinformatycznych.

CCs osiągają status MRCs po wdrożeniu zarówno wytycznych dotyczących najlepszych praktyk określonych przez Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (Organisation for Economic Cooperation and Development – OECD), Światową Federację Kolekcji Kultur (World Federation for Culture Collection – WFCC), jak i certyfikację i/lub akredytację zgodnie z odpowiednimi normami [24]. W wyniku tego MRCs działają w sposób

kontrolowany pod względem jakości wymaganej przez przemysł i społeczność naukową [16, 10]. To sprawia, że MRCs są kluczowymi elementami zrównoważonej międzynarodowej infrastruktury naukowej dla rozwoju biotechnologii i biogospodarki, a także odgrywają kluczową rolę dla wyzwań społecznych.

Jednym z zadań MRC powinno być włączanie się w projekty inwestycyjne sektora biotechnologicznego oraz wspieranie rozwoju regionu, w którym są zlokalizowane. Wychodząc naprzeciw tym zadaniom, MRCs włączają do podstawowej działalności depozyty bezpieczne i/lub patentowe [2]. Dla MRCs strategiczne jest zatem zachowanie reprezentatywnych i typowych szczepów drobnoustrojów, a także ich potencjalnej wartości dla przemysłu, medycyny, rolnictwa lub działalności naukowej [3].

3. System zarządzania jakością

Wdrożenie systemu zarządzania jakością jest jednym z najważniejszych wyzwań podejmowanych przez kolekcje, ponieważ ma kluczowe znaczenie dla zapewnienia jakości zasobów mikrobiologicznych. W oparciu o QMS, CCs są w stanie dostarczać materiały mikrobiologiczne o gwarantowanej jakości, która jest zgodna z krajowymi i międzynarodowymi ramami prawnymi (np. „Konwencją o różnorodności biologicznej”, „Protokołem z Nagoi o dostępie i podziale korzyści”, przepisami i zezwoleniami dotyczącymi opakowań i wysyłki, itp.) [22].

Do niedawna CCs wdrażając system zarządzania jakością korzystały z:

- Zaleceń WFCC „Guidelines for the Establishment and Operation of Collections of Cultures of Microorganisms”;
- Zaleceń OECD „Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres”;
- Zaleceń GLP (Good Laboratory Practice);
- norm ISO serii 9000 „Systemy zarządzania jakością – Wymagania”;
- normy ISO/IEC 17025 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących”;
- normy ISO 17034 „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji producentów materiałów odniesienia”.

W ostatnim czasie powstaje panel specyficznych norm dla biobanków/CCs opartych o powyższe wytyczne i normy.

Wytyczne WFCC dotyczą tworzenia i działania kolekcji mikroorganizmów. Zawierają szereg zagadnień z zakresu organizacji obejmujących: cele, fundusze, zakres działalności, prowadzenie dokumentacji, katalogów, szkoleń, obsługi kolekcji drobnoustrojów (przechowywanie, potwierdzanie autentyczności, pozyskiwanie i udostępnianie szczepów), a także bezpieczeń-

stwa, ochrony, współpracy międzynarodowej i przepisów prawa. Po wewnętrznym wdrożeniu tych zasad CCs powinny przejść do stosowania wymogów i wytycznych OECD dotyczących najlepszych praktyk lub różnego rodzaju norm i certyfikatów [23, 12]. Przewodnik OECD stanowi opis zasad dobrej praktyki laboratoryjnej we wszystkich rodzajach BRCs (Tabela I). Jeden z rozdziałów pt. „Best Practice Guidelines for the Micro-organism Domain” poświęcony jest wymaganiom skierowanym do kolekcji mikroorganizmów. Obejmuje on zagadnienia z zakresu m.in. kwalifikacji i szkoleń personelu, sprzętu, kalibracji, odczynników i pożywek, pozyskiwania, przechowywania i udostępniania szczepów. Pozostałe dokumenty opisują ogólne wytyczne dotyczące systemu jakości związanego z dostarczaniem wyrobów i usług biorąc pod uwagę kluczowe kwestie, tj. wprowadzenie nadzoru nad dokumentacją i zapisami, zaangażowanie kierownictwa w budowanie systemu zarządzania jakością, usystematyzowanie zarządzania zasobami, ustanowienie procesów realizacji wyrobu, dokonywanie systematycznych pomiarów (zadowolenia klienta, wyrobów, procesów).

4. Biobanki

Aktualnie CCs/biobanki, które chcą uzyskać akredytację i osiągnąć status wysokiej jakości, mogą korzystać z dokumentów bezpośrednio dla nich dedykowanych. Część z nich jest opublikowana i dostępna dla biobanków, zaś niektóre znajdują się jeszcze w fazie projektu. Komitet Techniczny ISO/TC 276 Biotechnologia opracowując poniższe normy, dąży do wprowadzenia uzgodnionych na szczeblu międzynarodowym wspólnych wytycznych. W 2018 roku opublikował normę ISO 20387 – Biotechnologia – Biobankowanie – Ogólne wymagania dotyczące biobankowania. Norma może być stosowana przez wszystkie organizacje prowadzące biobanki materiału biologicznego z organizmów wielokomórkowych (np. ludzi, zwierząt, grzybów i roślin) oraz mikroorganizmów do badań i rozwoju. Nie odnosi się jednak do materiału biologicznego przeznaczonego do produkcji żywności/pasz, laboratoriów zajmujących się analizą żywności/pasz i/lub zastosowaniami terapeutycznymi. Celem normy jest promowanie zaufania do biobanków oraz określenie wymagań dotyczących kompetencji w zakresie ich działalności, w tym dostarczania materiału biologicznego oraz danych odpowiedniej jakości dla badań i rozwoju. Do normy ISO 20387 zostały opublikowane dodatkowe dokumenty z wytycznymi, wspomagającymi jej wdrażanie. Jednym z nich jest techniczny raport ISO/TR 22758 Biotechnologia – Biobankowanie – Przewodnik wdrożeniowy dla ISO 20387, który zawiera szczegółowe wytyczne dotyczące wdrażania wymagań tej normy [9]. Nowy raport

techniczny ma być uzupełnieniem, a nie substytutem ISO 20387, który wyszczególnia wymagania dotyczące kompetencji, bezstronności i spójnego działania biobanków. Wymagania ISO 20387 są już kompleksowe, więc uzupełniające wytyczne w ISO/TR 22758 pomogą organizacjom znacznie lepiej zrozumieć, jak wdrożyć normę oraz w pełni docenić korzyści biobankowania. Ponadto dostępna jest norma ISO 21899 Biotechnologia – Biobankowanie – Ogólne wymagania dotyczące walidacji i weryfikacji metod stosowanych do zapewnienia jakości materiałów biologicznych zdeponowanych w biobankach [7] oraz dokument ISO 21710 Biotechnologia – Biobankowanie – Specyfikacja dotycząca zarządzania danymi i ich publikacji w MRC [6]. Drugi z powyższych dokumentów określa wymagania, umożliwiające spójne formatowanie oraz kontrolę jakości danych. Uwzględnia również zalecenia dla MRC dotyczące poprawy wymiany i integracji danych związanych z materiałem mikrobiologicznym. Ma on na celu ułatwienie procedur, takich jak deponowanie, pozyskiwanie, potwierdzanie, przechowywanie i dystrybucja szczepów, i może być wykorzystywany przez MRC w celu potwierdzenia lub uznania kompetencji w zakresie zarządzania danymi i ich publikacji. W lipcu 2022 została opublikowana norma ISO 24088-1 – Biotechnologia – Biobankowanie mikroorganizmów – Część 1: Bakterie i archeony. Obejmuje ona zagadnienia związane z pozyskiwaniem, przetwarzaniem, przechowywaniem i transportem drobnoustrojów należących do powyższych domen [8].

5. Bazy danych związane z materiałem biologicznym – przechowywanie i zarządzanie danymi

Ogromnym wyzwaniem dla centrów zasobów mikrobiologicznych jest przechowywanie i zarządzanie danymi. Obecne bazy danych zawierają głównie informacje o zasobach (identyfikacji, charakterystyce molekularnej i biochemicznej), a także ich historii (pochodzenie, nabycie itp.) oraz ich praktycznym zarządzaniu (ilości, miejscu przechowywania itp.). Dane te są punktem wyjścia do tworzenia katalogów, które mogą być oferowane klientom w formie on-line. Dzięki publicznie dostępnym katalogom zawierającym zbiór informacji o zasobach, możliwe jest swobodne poszukiwanie się danymi (przeszukiwanie, rozpowszechnianie) w celu umożliwienia wewnętrznego zarządzania zasobami i prezentacji zasobów potencjalnym klientom.

Aby właściwie zarządzać danymi niezbędne są odpowiednie procedury. Zarządzanie danymi od dziesięcioleci stanowi istotny problem w działalności MRC. Bazy danych zawierające informacje na temat przechowywanego materiału biologicznego wymagają wydajnej i dobrze dostosowanej infrastruktury informatycznej. Przy braku zunifikowanych systemów informatycznych

wymiana informacji jest znacznie utrudniona. Zarówno poziom komputeryzacji, jak i stosowane systemy informatyczne różnią się w zależności od rodzaju MRC. Stosowane są proste ale też i bardziej zaawansowane rozwiązania do zarządzania danymi, począwszy od prostych arkuszy kalkulacyjnych, po złożone platformy analityczne, zawierające także dane eksperymentalne i wykonujące proste analizy bioinformatyczne. Systemy informatyczne dedykowane biobankom powinny umożliwiać działanie za pośrednictwem oprogramowania integracyjnego, takiego jak systemy zarządzania przepływem pracy [21].

Norma ISO 20387 zaleca, by w biobanku istniała procedura wdrażania, modyfikacji i użytkowania oprogramowania, sprzętu komputerowego i baz danych systemu komputerowego. Procedura powinna obejmować co najmniej integralność danych, kontrole bezpieczeństwa i system awaryjny, aby zapobiec utracie lub uszkodzeniu danych.

Z kolei OECD rekomenduje aby BRCs/MRCs wybierały standardowe protokoły danych, umożliwiające bazom danych lepsze współdziałanie.

- Dane poufne powinny być jasno określone w związku z możliwością uwierzytelniania użytkowników za pomocą technik szyfrowania i innych powiązanych narzędzi do zabezpieczania informacji.
- System informatyczny powinien zapewniać regularne gromadzenie kopii zapasowych danych.
- Pożądane jest przechowywanie danych poza siedzibą firmy.
- Archiwa danych powinny być prowadzone zgodnie z polityką przechowywania zasobów biologicznych.
- BRCs/MRCs powinny wprowadzić odpowiednie środki (protokoły, narzędzia i standardy) we własnych systemach informatycznych w celu zapewnienia odpowiedniego bezpieczeństwa informacji. Podstawę takich środków może stanowić np. uwierzytelnianie za pomocą identyfikatora użytkownika i hasła, szyfrowanie wiadomości i/lub ograniczanie adresów IP.
- Pliki kopii zapasowych powinny być przechowywane w bezpiecznym miejscu.
- BRCs/MRCs powinny udostępniać dane opisujące materiał biologiczny i jego pochodzenie oraz udostępniać użytkownikom katalogi elektroniczne za pośrednictwem ich własnych systemów (np. strony internetowej) lub za pośrednictwem sieci krajowych, regionalnych lub globalnych. Dane powinny być przechowywane w celu zapewnienia zgodności z odpowiednimi krajowymi przepisami ustawowymi i wykonawczymi.
- BRCs/MRCs powinny ograniczać dostęp do katalogów elektronicznych, jeśli jest to stosowne. Użytkownicy katalogów powinni być uwierzytelnieni, a określone tożsamości i hasła powinny być

dostarczane w celu uzyskania dostępu do różnych kategorii informacji i usług.

- Należy sprawdzać ważność identyfikatorów i haseł.

Według zaleceń WFCC katalogi szczepów dostępnych do dystrybucji (drukowane lub on-line) powinny być sporządzane lub aktualizowane w regularnych odstępach czasu. Coroczne wydawanie drukowanych katalogów jest nieuzasadnione, ale przerwy wynoszące pięć lub więcej lat byłyby zbyt duże, aby mogły być użyteczne. Katalogi on-line powinny być aktualizowane częściej. Kultury o ograniczonej dystrybucji powinny być wyraźnie oznaczone. Kultury, które z jakiegokolwiek powodu nie są dostępne do dystrybucji, nie powinny być wymieniane w katalogach lub publicznie dostępnych bazach danych.

W związku z rozwojem nowych narzędzi molekularnych, w tym technik wysokoprzepustowych, MRCs będą odgrywać kluczową rolę w koordynacji programów sekwencjonowania kwasów nukleinowych poprzez dostarczanie standaryzowanego i wysokiej jakości DNA szczepów. Będą one zatem odgrywały aktywną rolę w gromadzeniu, organizowaniu i utrzymywaniu zaktualizowanych danych genotypowych i fenotypowych uznanych za wartościowe do przechowywania. Dlatego idealnie byłoby, gdyby infrastruktura bioinformatyczna każdego MRC posiadała wewnętrzne systemy do obróbki danych wyjściowych ze zautomatyzowanymi platformami z danymi genetycznymi i fenotypowymi wraz z oprogramowaniem do podstawowej analizy porównawczej genomu i charakterystyki fenotypowej. Niemniej jednak zalecana jest możliwość połączenia wewnętrznych analiz z publicznie dostępnymi platformami bioinformatycznymi. Technologia sekwencjonowania nowej generacji (NGS), sekwencjonowanie RNA oraz podejścia transkryptomyczne i metagenomiczne, wykładniczo zwiększyły wykrywanie różnorodności biologicznej drobnoustrojów [5]. Ujawniają one w próbkach środowiskowych dużą liczbę nieopisanych gatunków, często niemożliwych do wyhodowania w warunkach laboratoryjnych. Na przykład technika NGS została wykorzystana do odkrycia nowych linii grzybów, które nie zostały wcześniej opisane [11]. Dane NGS zwiększają również możliwość „porównania całego genomu” w celu lepszego przypisania blisko spokrewnionych taksonów drobnoustrojów, tym samym poprawiając analizę relacji genotyp-fenotyp między różnymi szczepami. Ponadto pojawienie się trzeciej generacji NGS (PacBio i Oxford Nanopore) zwiększyło dostępność kompletnych genomów, szczególnie u bakterii, oferując w ten sposób cenne narzędzie do badania rearanzacji chromosomów, powtórzeń i translokacji. Warto zauważyć, że wraz ze stopniowym zmniejszaniem kosztów NGS oczekuje się, że identyfikacja nowych gatunków będzie oparta na całym ich genomie [3].

6. Podsumowanie

Biobanki przechowując setki milionów próbek biologicznych, w tym pochodzące od ludzi, zwierząt, roślin i drobnoustrojów, pomagają globalnej społeczności naukowej rozwijać wiele obszarów działalności człowieka, od produkcji roślinnej po spersonalizowaną medycynę [13].

Kolekcje kultur powinny zatem wyjść poza kontekst historyczny („botaniczny”) opracowując produkty komercyjne i rozwiązania biotechnologiczne poprzez badania przesiewowe i selekcję odpowiednich szczepów, a także finansowanie badań przez inwestycje publiczne/prywatne oraz tworzenie spółek typu spin-off [24].

Dostępność certyfikowanych szczepów drobnoustrojów musi być punktem wyjścia do wyboru materiału biologicznego przydatnego dla wykorzystania w nowoczesnej biotechnologii [2, 4, 15]. W tym kontekście rola MRCs i CCs ma zasadnicze znaczenie w zachowaniu biozasobów i dotyczących ich danych, które mają być wykorzystane na potrzeby badań, innowacji i rozwoju [1]. W rzeczywistości ogromna różnorodność biologiczna zachowana w CCs zapewnia wysokie prawdopodobieństwo odzyskania wyjątkowych szczepów o pożądanym właściwościach. Nowoczesne podejście w badaniach i rozwoju biotechnologii powinno również gwarantować, że kultury mikroorganizmów opisane lub wymienione w publikacjach i wnioskach patentowych są publicznie dostępne dla niezależnych badań [25].

CCs i MRCs w przyszłości będą również odpowiedzialne za ochronę niehodowlanych mikroorganizmów VBNC (viable but non culturable), konsorcjów drobnoustrojów (złożonych próbek gleby, osadów, wody itp.), w tym ich mikrobiomów. Przed centrami zasobów mikrobiologicznych stoi wiele ważnych wyzwań, aby chronić różnorodność mikrobiologiczną dla przyszłych pokoleń.

Piśmiennictwo

1. Alexandraki V., Tsakalidou E., Papadimitriou K., Holzapfel W.: Status and trends of the conservation and sustainable use of micro-organisms in food processes. *Commission on Genetic Resources*. Fao; Rome, Italy, 1–172 (2013)
2. Boundy-Mills K.L., Glantschnig E., Roberts I.N., Yurkov A., Casaregola S., Daniel H.M., Groenewald M., Turchetti B.: Yeast culture collections in the twenty-first century: New opportunities and challenges. *Yeast*. **33**, 243–260 (2016)
3. De Vero L., Varese G.C. i wsp.: Preservation, Characterization and Exploitation of Microbial Biodiversity: The Perspective of the Italian Network of Culture Collections, *Microorganisms*. Dec; **7**(12), 685 (2019)
4. Ghisalba O., Meyer H.P., Wohlgemuth R.: Industrial Biotransformation. In: Flickinger M.C., editor. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. John Wiley & Sons; Hoboken, NJ, USA, 2010
5. Hibbett D., Glotzer D.: Where are all the undocumented fungal species? A study of *Mortierella* demonstrates the need for sequence-based classification. *New Phytol.* **191**, 592–596 (2011)

6. ISO 21710 Biotechnology – Biobanking – Specification on data management and publication in MRC
7. ISO 21899 Biotechnology – Biobanking – General requirements for validation and verification of processing methods for materials in biobanks
8. ISO 24088-1 – Biotechnology – Biobanking of microorganisms – Part 1: Bacteria and Archaea
9. ISO/TR 22758 Biotechnology – Biobanking – Implementation guide for ISO 20387, provides detailed guidance on how to implement the requirements of ISO 20387
10. Janssens D., Arahall D.R., Bizet C., Garay E.: The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research. *Res. Microbiol.* **161**, 422–429 (2010)
11. Jones D.S., Albrecht H.L., Dawson K.S., Schaperdorth I., Freeman K.H., Pi Y., Pearson A., MacAlady J.L.: Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm. *ISME J.* **6**, 158–170 (2012)
12. Martins A., Lima N., Sampaio P.: A standard proposal for biological resources centres. *Int. J. Qual. Reliab. Manag.* **34**, 147–162 (2017)
13. Naden C.: Injecting quality into biobanks. <https://www.iso.org/news/ref2533.html> (16.11.2022)
14. OECD, Best Practice guidelines for Biological Resource Centres, 2007
15. OECD, The Bioeconomy to 2030, Main Findings and Policy Conclusions, 2009
16. Overmann J.: Significance and future role of microbial resource centers. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**, 258–265 (2015)
17. PN-EN ISO serii 9000 – Systemy zarządzania jakością – Wymagania
18. PN-EN ISO/IEC 17025 – Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących
19. PN-EN ISO 17034 – Ogólne wymagania dotyczące kompetencji producentów materiałów odniesienia
20. PN-EN ISO 20387 – Biotechnologia – Biobankowanie – Ogólne wymagania dotyczące biobankowania
21. Romano P.: Automation of in-silico data analysis processes through workflow management systems. *Brief. Bioinform.* **9**, 57–68 (2008)
22. Simões M., Dias N., Santos C. Lima N.: Establishment of a Quality Management System Based on ISO 9001 Standard in a Public Service Fungal Culture Collection. *Microorganisms*, **4**, 21 (2016)
23. Smith D.: *Culture Collections*. Elsevier Inc.; Amsterdam, The Netherlands, 2012, Volumen 79, 1 wydanie
24. Smith D., McCluskey K., Stackebrandt E.: Investment into the future of microbial resources: Culture collection funding models and BRC business plans for biological resource centres. *Springerplus*, **3**, 81 (2014)
25. Stackebrandt E., Smith D., Casaregola S., Varese G.C., Verkleij G., Lima N., Bridge P.: Deposit of microbial strains in public service collections as part of the publication process to underpin good practice in science. *Springerplus*, **3**, 1–4 (2014)
26. WFCC Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms, 3 wydanie, 2010

SPIS TREŚCI

A. Meliani, F.Z.A. Khelil, S. Nair – Wysoka przenikalność nanocząstek przez błony bakteryjne kluczem do potencjalnego zastosowania	3
B. Gad, M. Wieczorek – Coxsackie B – wirusy pantropowe	13
A. Bogut – <i>Candida auris</i> : co wiemy na temat najbardziej enigmatycznego patogenu XXI wieku?	27
A. Kiecka, M. Szczepanik – Lipopolisacharyd <i>Pantoea agglomerans</i> a atopowe zapalenie skóry, alergiczne kontaktowe zapalenie skóry i gojenie ran	47
E. Jaroszevska, J. Nasiłowska, B. Sokołowska – Kolekcje kultur mikroorganizmów, a biobanki mikrobiologiczne w kontekście nowych norm ISO	55

CONTENTS

A. Meliani, F.Z.A. Khelil, S. Nair – The high penetrability of nanoparticles into bacterial membranes: a key of a potential application	3
B. Gad, M. Wieczorek – Coxsackie B – pantropic viruses	13
A. Bogut – <i>Candida auris</i> : what do we know about the most enigmatic pathogen of the 21 st century? ...	27
A. Kiecka, M. Szczepanik – Lipopolysaccharide <i>Pantoea agglomerans</i> and atopic dermatitis, allergic contact dermatitis and wound healing	47
E. Jaroszevska, J. Nasiłowska, B. Sokołowska – Microbial culture collections and microbiological biobanks in the context of new ISO standards	55

Warunki prenumeraty

Zapytania o warunki prenumeraty oraz zamówienia proszę kierować do Wydawcy
Roma Walendzewicz
tel. 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com

Wpłaty należy dokonywać na rachunek bankowy
Bank BGŻ 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550
Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa

Cena 1 zeszytu 48 zł + VAT 8%