

Quarterly

Volume 62

Issue 2 • 2023

APRIL – JUNE

CODEN:

PMKMAV 62 (2)

2023

POLISH SOCIETY OF MICROBIOLOGISTS
POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Advancements of Microbiology

formerly Postępy Mikrobiologii

Impact Factor = 1,118 (2021)

MNiSW Score = 20,00 (2019)

<http://am-online.org/>

EDITORIAL BOARD / RADA REDAKCYJNA

MONIKA BRZYCHCZY-WŁOCH (Kraków, Poland), PAWEŁ CIBOROWSKI (Omaha, USA),
JERZY DŁUGOŃSKI (Łódź, Poland), BARBARA DOŁĘGOWSKA (Szczecin, Poland),
KATARZYNA DZIERŻANOWSKA-FANGRAT (Warszawa, Poland), LUKÁŠ HLEBA (Nitra, Slovakia),
WALERIA HRYNIEWICZ (Warszawa, Poland), ANNA MALM (Lublin, Poland),
JACEK MIĘDZOBRODZKI (Kraków, Poland), ELŻBIETA ANNA TRAFNY (Warszawa, Poland),
ARTUR SABAT (Groningen, The Netherlands), KRZYSZTOF TRZCIŃSKI (Utrecht, The Netherlands),
PIOTR ZIELENKIEWICZ (Warszawa, Poland)

EDITOR-IN-CHIEF / REDAKTOR NACZELNA

Eligia M. Szewczyk

ASSISTANT EDITOR / SEKRETARZ

Anna Białeczka

JOURNAL ADDRESS / ADRES REDAKCJI

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

EDITORS / REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPŁAWSKA (Warszawa, Poland),
KATARZYNA GRUDLEWSKA-BUDA (Bydgoszcz, Poland),
ANNA KĘDZIORA (Wrocław, Poland), AGNIESZKA KWIATEK (Warszawa, Poland)
EDYTA PODSIADŁY (Warszawa, Poland), KRZYSZTOF SKOWRON (Bydgoszcz, Poland)

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Information about the cover photo / Informacja o zdjęciu na okładce:

***Staphylococcus carnosus* coated with gold nanoparticles / *Staphylococcus carnosus* opłaszczony nanocząstkami złota**

Preparation and imaging / Preparatyka i obrazowanie:

Dorota Ochońska, MSc, Department of Molecular Medical Microbiology; Chair of Microbiology, Faculty of Medicine UJCM;
Wojciech Pajerski PhD, Materials and Surface Chemistry Group, Department of Inorganic Chemistry,
Faculty of Chemistry, Jagiellonian University;
Cwiklik's lab, J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry, The Czech Academy of Sciences,
Olga Woźnicka, Department of Cell Biology and Imaging, Faculty of Biology, Jagiellonian University

P O L I S H S O C I E T Y O F M I C R O B I O L O G I S T S
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

UTILITY OF MACHINE LEARNING TECHNOLOGY IN MICROBIAL IDENTIFICATION: A CRITICAL REVIEW

Alok Bharadwaj*, Mansi Gupta, Akanksha Shakya

Department of Biotechnology, GLA University, Mathura (U.P.), India

Submitted in October 2022, accepted in February 2023

Abstract: Microorganisms are ubiquitous and have far-reaching effects on human life. Since their discovery in the 19th century, microorganisms have fascinated biologists. Microbes play a crucial role in the material and elemental cycles of the natural world. Growing own microbes for research purposes requires a significant time and financial investment. On the other hand, high-throughput sequencing technology cannot advance at the same clip as the culture method. The area of microbiology has made substantial use of machine learning (ML) methods to tackle this problem.

Classification and prediction have emerged as key avenues for advancing microbial community research in computational biology. This research compares the advantages and disadvantages of using different algorithmic approaches in four subfields of microbiology (pathogen and epidemiology; microbial ecology; drug development; microbiome and taxonomy).

1. Introduction. 2. Machine learning. 2.1. Supervised learning. 2.2. Unsupervised learning. 2.3. Deep learning. 2.4. Reinforcement learning. 3. Evaluation criteria and algorithmic workflows. 4. Classification and prediction. 4.1. Prediction of microbial species. 4.2. Prediction of Environmental and Host Phenotypes. 4.3. Using Microbial Communities to Predict Disease. 5. Interaction and association in microbiology. 5.1. Interaction between Microorganisms. 5.2. Microbiome-Disease Association. 6. Conclusion.

Keywords: Identification and classification, machine learning, microbial community

1. Introduction

The first known microorganisms appeared on Earth roughly 3.5 billion years ago [54]. Microorganisms include bacteria, viruses, fungi, microscopic protozoa and algae. These organisms [44] have both good and bad applications: they are used in food production, medicine [60, 91], agriculture [52, 73], industry [64], and environmental protection [11, 93].

Recent trends in microbiology research have included community classification and its relationship to the environment [11, 93], regulation of host-microbiome interactions and the gut microbiome [33, 49, 66, 79], and attempts to conflate the microbiome with genome engineering, molecular modification, ecology, resource utilisation, biocatalysis, synthesis, pharmaceutical vaccine development, and pathogenic bacteria. Combining microbiology with multiomics (genomes, epigenomics, transcriptomics, proteomics,

and metabolomics) has also given rise to a number of multi-scale new areas [8, 46].

Recent breakthroughs in microbial sequencing have made the microbiome study increasingly popular. High-throughput sequencing methods have allowed to generate a huge body of microbiological data. Machine-learning techniques have been slowly incorporated into microbial investigations [30, 31, 59, 81–83, 88, 95] due to the high cost and lengthy nature of traditional methods involving microscopes and biological cultures. With the advent of the Big Data era, researchers' most pressing concerns have shifted to include questions such as how to rapidly and effectively filter/condense this exponential growth of information to obtain generalised quality data and how to transform the enormous amounts of microbiota data into knowledge that is easily understood and visualised.

McCarthy first proposed AI at the Dartmouth Conference in the summer of 1956. Emulating human

* Corresponding Author: Alok Bharadwaj, Department of Biotechnology, GLA University, NH2 Mathura-Delhi Highway, Chaumuhan, Mathura- 281406, India; e-mail: alok.bhardwaj@gla.ac.in

© 2023 Alok Bharadwaj, 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/>)

Cite as:

Utility of Machine Learning technology in microbial identification: a critical review, Alok Bharadwaj, et al., *Advancements Microbiol.*, 2023, 62, 2, 65–74, DOI: 10.2478/am-2023-0006

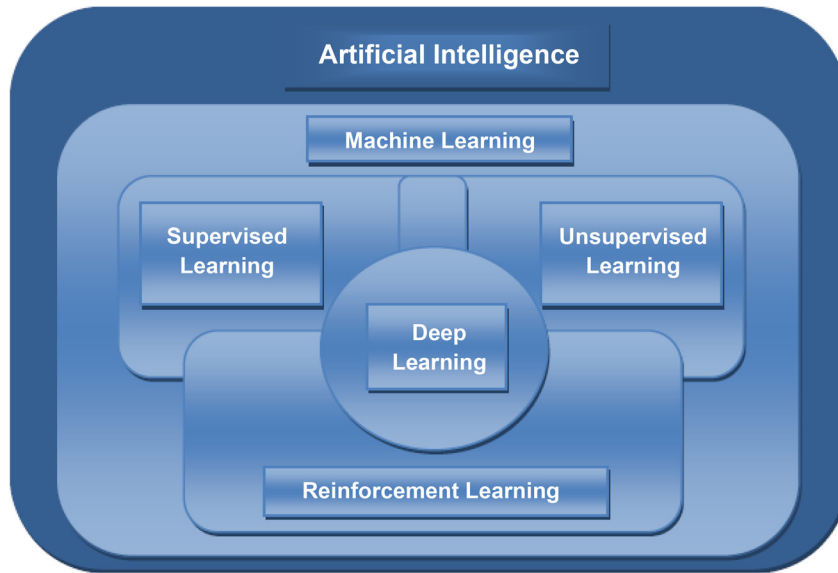


Fig. 1. The relationship among Artificial Intelligence, Machine Learning and Deep Learning

intellect expansions is a primary goal of artificial intelligence (AI), along with studying and improving related theoretical frameworks, methodological tools, and system architectures. The advent of AI has sped up the development of microbiology and brought about a paradigm shift in the field as a whole [6]. With the use of big data, automation, modelling, and AI, the study of microbiology has expanded into new areas, such as systems biomedicine and systems ecology.

In 1959 (Bell Labs, IBM, Stanford), Arthur Samuel proposed the concept of machine learning (ML) with the intention of extracting features from large datasets with varying structures. The simplest approach is using algorithms to analyse data, automatically assess patterns, and base predictions and decisions on those evaluations [34]. Systematically presenting interactions between microflora and hosts using machine learning is made possible by multiomics integration, cross-scale microbial community integration, and multiomics integration with complex microbial communities.

Deep learning (DL) is a game-changing machine learning strategy that models high-level abstractions of data with parametric models learned via gradient descent across several layers of processing units in a deep network [41]. DL is a technology for machine learning (ML), which is used to implement AI (Fig. 1).

2. Machine learning

To develop ML algorithms, four steps must be taken [57]. Features extraction is the initial step in the ML methodology [47]. The operational classification units (OTU) table can be generated using clustering. Then, we pick the most important parts to help us be more

precise and productive. After a model is trained using a training dataset, it is evaluated using a test set. An overview of the process is shown in Figure 2.

Machine learning (ML), or learning from unstructured data, is a necessary capability for every AI system. To derive insights from raw data, ML algorithms are fed

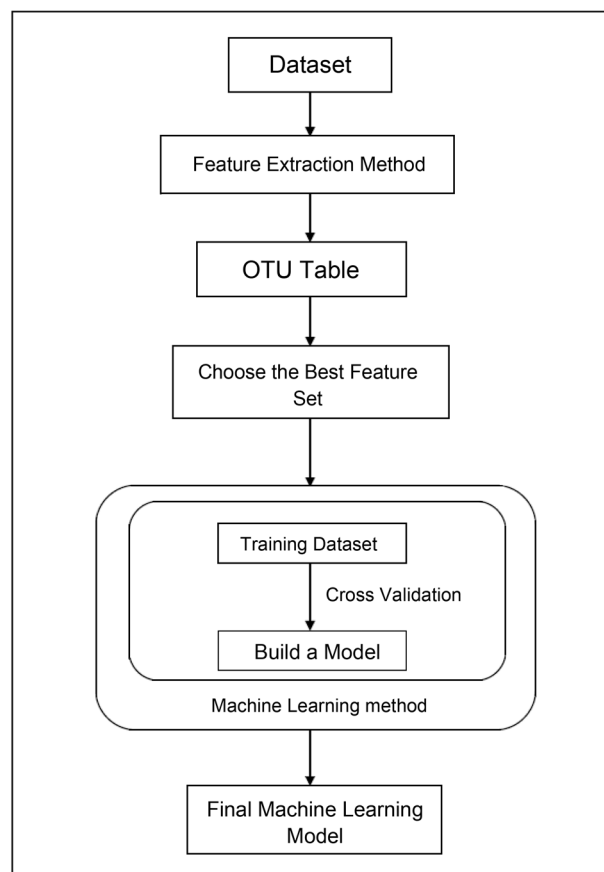


Fig. 2. Various stages of Machine Learning employed in Microbiology

features derived from carefully crafted pattern recognition methods. The earliest known machine learning algorithms were developed in the early 20th century, and numerous established methods have been developed since then (Figure 2). Reinforcement learning, supervised learning, unsupervised learning, and DL are the four classic algorithms covered here (RL).

2.1. Supervised learning

In statistics, supervised learning approaches include regression analysis and classification. These methods utilise training sets comprised of examples drawn from well-established categories to instruct models. Before machine learning (ML) was conceived of, Fisher (1936) developed the supervised data dimensionality reduction technique linear discriminant analysis (LDA) [23]. With its ability to handle a wide variety of classification tasks and its suitability for incremental training, the naive Bayes (NB) model is a strong contender for small-scale data analysis. It is easy to use, and the categorisation accuracy remains stable over time [94].

Because of this, the accuracy of the final conclusion depends on the form the input data are given in. Logistic regression (LR) features a simple model, good parameter interpretability, and is fast and easy to use in situations involving large amounts of data, all of which contribute to its ability to forecast the likelihood that a sample will be a positive sample. The year 1980 is a watershed moment in the development of machine learning algorithms, which up until that time had followed a more diffuse and haphazard path of enlightenment-inspired algorithms. Due to its fast calculation, high accuracy, and high interpretability in the 1980s and 1990s, decision trees (DT) are still utilised in some issues today; nevertheless, their trait of easy overfitting makes it simple to ignore the importance of attributes in the dataset. Among the most common DT implementations are ID3 [61], CART [89], and C4.5 [62]. On the 1990s, we saw the development of two widely used algorithms: the support vector machine (SVM), which is grounded in statistical learning theory, and AdaBoost [16, 25]. The latter (SVM) solves nonlinear classification problems with simple classification principles (maximising the interval between samples and decision surfaces) using kernel functions that can be mapped to a high-dimensional space; however, this method is challenging to solve the multiclassification problem, sensitive to missing data, and thus difficult to achieve large-scale training samples. The latter (AdaBoost) can combine the use of simple weak classifiers and significantly enhance learning accuracy whether the data are synthetic or real; nevertheless, it is vulnerable to noise interference and requires a lengthy training period. There is also no need for familiarity with feature filtering or weak classifiers.

2.2. Unsupervised learning

When learning from fresh data, unsupervised learning is a method used to search for recognisable patterns in the original data. Two schools of thinking in research are clustering and dimensionality reduction. A number of early implementations of hierarchical clustering, such as SLINK [71] and CLINK [17], are still in use today. The expectation-maximisation (EM) method is frequently used to master the variational inference of latent-dirichlet-affiliation (LDA) topic models, Gaussian mixture model (GMM) parameters, and hidden-Markov model (HMM) hidden-state variables. It has been used to solve numerous missing data extreme likelihood estimation problems in machine learning (HMM). Mean shift [15, 3], the density-based spatial clustering of applications with noise (DBSCAN) technique, and the ordering points to identify the clustering structure (OPTICS) algorithm are all examples of density-based clustering methods developed in the 1990s. A novel approach to clustering was introduced at the turn of the century, which involved recasting the clustering problem as a graph cutting problem. The prototypical method for this novel idea is called spectral clustering. Some of the advantages of using the classic PCA approach include the fact that it has no parameter limitations, can remove data redundancy and noise, reduces dataset size through compression and preprocessing, and yields findings that are straightforward to interpret. For quite some time, there has existed a data dimension reduction technique [58]. There have been many nonlinear techniques developed since then [9, 28, 65, 78], such as locally linear embedding (LLE), Laplacian eigenmaps, locality-preserving projections, and isometric mapping. Then, t-distributed stochastic neighbour embedding (t-SNE) [80] was created. For the most part, this nonlinear method is preferred for showing and comprehending high-dimensional data since it provides the best visualisation result compared to other dimensionality reduction algorithms. Despite its slow development and lack of substantial improvements, unsupervised learning has occupied a large role in human and animal learning and is a vital avenue to explore potent artificial intelligence.

2.3. Deep learning

Deep learning, in contrast to conventional ML, is multidimensional and intends to capture all associations present in the raw data. DL can be broken down into supervised, unsupervised, and hybrid models depending on whether or not labelled data is required. The term “hybrid model” is commonly used to describe the practise of incorporating the results of an unsupervised model into the training process of a supervised

model. The technological precursor and basis of DL is artificial neural networks (ANNs). The ancestor of ANN, the Perceptron model, was first proposed in 1958 (Rosenblatt, 1958), but it was not practical because it was extremely simplistic and could only be used for linear classification tasks (it couldn't even deal with the XOR problem). Therefore, it is of little practical value, but rather serves to lay the ideological framework for subsequent algorithms. Until the 1980s, progress in the study of neural networks slowed significantly. Consider the back propagation (BP) method [67] for training sigmoid-functioned multilayer neural networks and multilayer perceptrons. Long short-term memory (LSTM) and convolutional neural networks (CNN) were developed and are still widely employed to address vision issues. However, "gradient disappearance" [42] becomes a problem for the BP approach as the scale of the neural network increases. One of them is LeNet-5 [43]. For most deep convolutional neural networks, it has become the gold standard (DCNNs). Prior to Hinton and Salakhutdinov's (2006) introduction of the concept of DL, the problem of "gradient disappearance" had already been handled; the method had been taught layer by layer by unsupervised learning, and then tuned via a supervised back-propagation methodology [29]. Hinton and his student Alex Krizhevsky won the ImageNet competition using AlexNet [72], an early example of the deep learning technique that is currently popular. A self-attention mechanism [19] is at the heart of the transformer network structure developed by Devlin et al (2019). using the bidirectional encoder representation from transformers (BERT) model. Because of its flexibility, natural language processing (NLP) excels at a wide variety of jobs. DL is essentially a developing statistical technique having benefits and downsides in the areas of speech recognition, NLP, and CV.

2.4. Reinforcement Learning

Reinforcement learning is a special category of machine learning algorithms in which learning from experience is a central tenet [37, 35]. This technique, known as "automatic scoring and escalation," involves continuously determining, based on interactions, if an activity is related to the objective, producing rewards or penalties accordingly, and repeatedly carrying it out in order to finally maximise the predicted advantages. One active area of study, deep reinforcement learning (DRL) uses deep learning's strengths in perception and decision-making to provide programmers complete command over an algorithm's behaviour from input to output. It's useful in fields like as healthcare, NLP, linguistics, and medical robotics [21, 24, 39, 50].

3. Evaluation criteria and algorithmic workflows

There is no "best" algorithm because they all have their own advantages and disadvantages. In reality, all that computers do is make people more productive by making decisions for them. In light of this, it is preferable to select the most applicable model rather than the one with the most bells and whistles. There are four considerations to make when weighing the advantages of machine learning algorithms [27]. 1) Accuracy, which is the single most important criterion by which an algorithm should be judged. (2) The algorithm's fault tolerance refers to its ability to detect and correct for incorrect data. (3) It is far faster to debug, adapt, and expand on algorithms that are well-documented and easy to understand. (4) Time and space complexity refer to the amount of processing power and storage space required to execute the algorithm.

The following five procedures in Figure 3 can commonly be followed when using machine learning (ML) as a technical tool to tackle scientific challenges [27].

First, you need to recognise the problem, collect and process your data, and pick an evaluation method. The data was split up into three sets: training, validation, and test. The prototype's capacity to utilise the training data should be successively evaluated using the validation set, test set, and training set, all of which are related to the data samples that were used to create the prototype.

Construct the prototype with reconciling the dichotomy between optimisation and generalisation in such a way that are more optimised than the benchmark. By optimising generalisation abilities, the boundary between underfitting and overfitting can be established.

Validate the prototypes. Prototypes having effective statistical significance required to be scaled up first. Then with the help of overfitting threshold check the training losses and validation losses.

Testing of prototypes. Here the aim is to evaluate the prototype's predictive power employing entirely fresh data rather than validating the data.

Modifying the prototype by enhancing the algorithm with additional features, new characteristics, or fine-tuned parameters. The previous steps are continuously repeated, until the desired performance is attained. With the aid of model regularisation and tuning of hyperparameters prototype performance can be checked through validation set.

4. Classification and prediction

Here, we give a brief introduction to ML's potential applications in the field of microbiology. We focus on classification and an interaction problem because

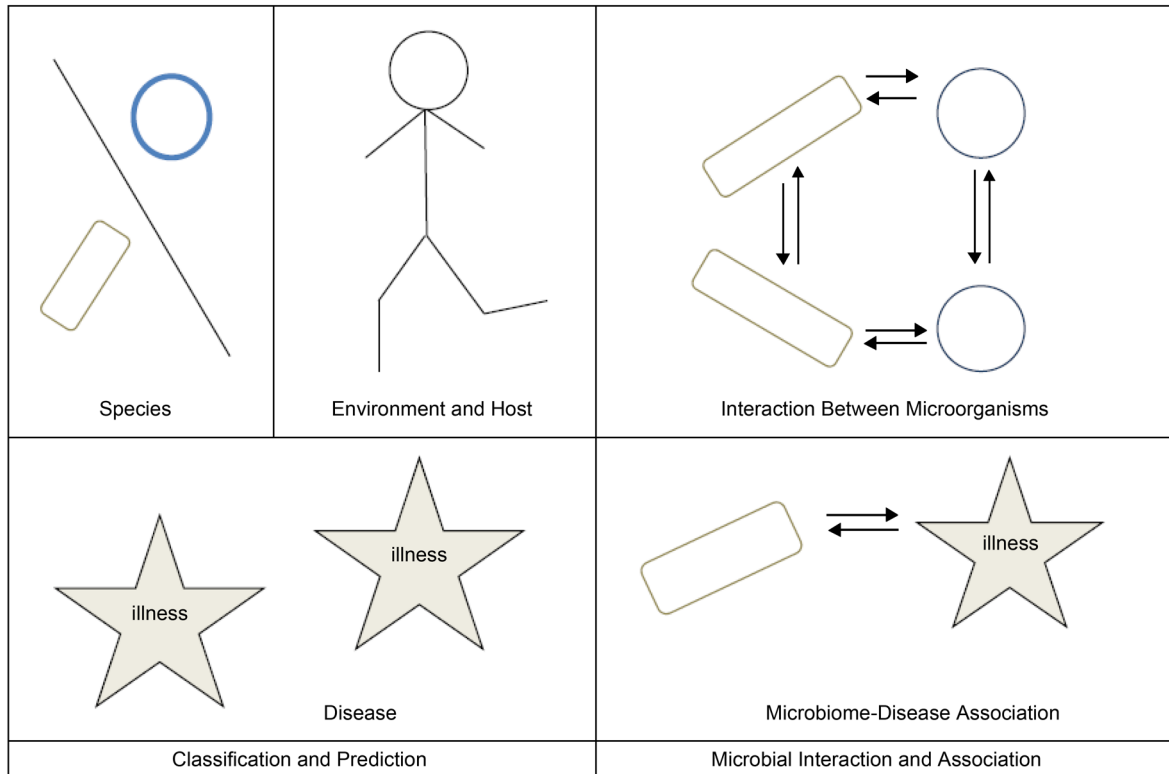


Fig. 3. Outline of present study

they are two of the most common applications of ML. Figure 3 displays the document's overall structure.

4.1. Prediction of microbial species

Bacteria and archaea fall under the category of prokaryotes, while eukaryotes, which include fungi and single-celled algae, are the other major grouping of microorganisms based on cellular form [84, 55]. There are primarily two approaches of identifying microorganisms. It is important to determine the microbe's domain, kingdom, phylum, class, order, family, genus, and species while trying to identify it. Species classification of a hitherto unrecognised microbial species is another objective. In order to classify different kinds of microorganisms, [53] researchers employed IDTAXA's LearnTaxa and IdTaxa tools.

These features are available thanks to the DECIPHER R package, which is part of the Bioconductor and released under the GPLv3 licence. DECIPHER offers resources for processing and making sense of high-throughput genomic data. Isolating and identifying individual microbial genomes from complex metagenomics collections is an important skill. Currently, the typical task of categorising prokaryotic and host organisms from mixed samples is often accomplished using genome-based similarity algorithms. There have been many subsequent attempts to find more precise methods of distinguishing amongst bacteria. In the field of

metagenomics, Amgarten et al. (2018). 's MARVEL programme is a helpful tool for predicting double-stranded DNA bacteriophage sequences [1]. MARVEL employs the RF technique, with 1,247 phage and 1,029 bacterial genomes serving as training data, and 335 bacterial and 177 phage genomes serving as test data. The authors presented six properties to aid in phage identification; however, feature selection using random forests revealed that just three variables were particularly informative.

Those methods are used to classify microorganisms in granular detail, fulfilling a wide range of needs. Murali et al. (2018) have proposed a method for studying the classification of microorganisms [53]. As an added bonus, MARVEL, VirSort, and VirFinder can all tell the difference between various microbial species. While all three methods had comparable specificity, MARVEL had the highest recall (sensitivity) [1] according to the research conducted by Amgarten et al. To execute the aforementioned steps, we have amassed the materials shown in Table I.

Table I
Web links of Microbiome – Disease Association

Studies	Availability of data and materials
Zhou et al.	https://www.nature.com/articles/ncomms5212#supplementary.information
KATZHMDA	http://dwz.cn/4oX5mS
BMCMDA	https://github.com/JustinShi2016/ISBRA2017

4.2. Prediction of environmental and host phenotypes

High-throughput sequencing and next-generation DNA technology have opened up previously unknown area for microbial researchers in recent years. Disease outbreaks and precision medicine can both benefit from research into the interactions between microbial populations, phenotypes, and ecological environments [5]. It is well established that parasitic bacteria do exist, and that both environmental conditions and host cells play critical roles in defining the precise make-up of any given microbiome. As a result of differences in food supply and environmental conditions, various microbial communities emerge [51]. A deeper understanding of both the surroundings and the host is provided here for the benefit of both parties. There has been a rise in study in recent years into the potential of microorganisms to foretell host and environment traits. In this article, we offer a survey of research along these lines.

To do this, Asgari et al. (2018) used a shallow subsample representation based on k-mer and deep learning, random forests, and support vector machines [4] to predict environmental and host features from 16S rRNA gene sequencing. OTU was found to be inferior to a shallow subsample representation based on k-mer in terms of both recognising a person's physical location and producing accurate predictions for Crohn's illness. Furthermore, deep learning beats RF and SVM on huge datasets. This method may help improve efficiency and prevent the risk of overfitting.

Statnikov et al. (2013) developed the following data processing pipeline with OTUs as input features [75]. After sequencing the original DNA, the authors removed any traces of human DNA so that they could utilise the data to construct operational taxonomic units (OTUs). Thereafter, the total number of sequences present inside each OTU was counted. The authors utilised numerous probabilistic neural networks, such as support vector machines, kernel ridge regression, regularised logistic regression, Bayesian logistic regression, the KNN technique, the RF method, and others. The group studied 18 unique ML methods. They also used five separate feature extraction methods. The results showed that the RF, SVM, kernel-regression, and Bayesian logic with Laplacian prior regression produced the best outcomes. In forensics, it is crucial to have an accurate time of death estimate. After using KNN regression to datasets with ear and nose samples, Johnson et al. (2016) were able to estimate the time of death. According to these findings, the skin's microbiota may be a useful tool for identifying the cause of death [32]. Because microbes tend to live in certain niches, we can learn more about their surroundings and their hosts. The existence of microbes can also tell us about the health of the surrounding environment and the host's prospects of survival.

4.3. Using microbial communities to predict disease

Both health and illness are significantly impacted by the microbiota [10]. Inhabitants of the human body include a wide variety of microorganisms. Illness develops when the human body's microbiome shifts out of whack or when foreign microorganisms invade. Modifications to the microbiota of the intestines [45] and the lungs [70] have both been linked to obesity. It is difficult to pinpoint the offending microorganisms in a microbial community as the root of an illness. Recent studies have examined the possibility that microbiome communities can serve as predictors [26] for a variety of disorders, including bacterial vaginosis [74, 18] and inflammatory bowel disease (IBD). An understanding of the microbiome is essential for making informed decisions about how to diagnose and treat disease.

Progression of bacterial vaginosis has been linked to the vaginal microbiome (BV). Beck and Foster (2014) employed the genetic algorithm (GP), RF, and logistic regression (LR) [7] to classify BV based on its microbial populations. Two criteria for BV [56, 63, 77] are the Nugent score, which relies on counting gram-positive cells, and the Amsel standard, which considers the discharge, smell, clue cells, and pH [2]. The approach taken in this article begins with dividing BV into subtypes based on vaginal microbiota and associated environmental factors, and then

In a different study [86], the author primarily aimed to predict inflammatory bowel disease. The intestinal mucosa and lumen of people with Crohn's disease and ulcerative colitis were compared to those of healthy individuals in that study. The Relief technique [38] was used for feature selection, and Metastats [85] was used for differential feature identification. Finally, the author used KNN and SVM classifiers to examine illness and site specificity.

5. Interaction and association in microbiology

5.1. Interaction between microorganisms

Because of the diversity of interactions among its members, microbial communities in biomes exhibit complicated collective behaviour. These interactions include metabolic exchange, signalling and quorum sensing, and the reduction or eradication of growth [40, 20]. Understanding the activities of natural ecosystems and the development of artificial coalitions requires an understanding of the interspecific interactions within microbial communities [48]. To better deduce the missing edges in the network and establish the connection [20], DiMucci et al. (2018) demon-

strated a possible link between the microbial interaction network and the level of identifying characteristics of individual bacteria.

Chang et al. (2017) employed the random forest technique to forecast productivity in light of soil microorganisms [12], as it is possible that microbial interactions in the soil have an impact on crop yields. Variations in the soil microbiome were linked to enhancements in agricultural yields. There are examples of both cooperative and competitive interactions within any given population of microorganisms. Microbes can have any of eight different kinds of relationships with one another: neutral, commensal, synergistic, mutualistic, competitive, amenable, parasitic, and predatory.

An in-depth knowledge of the dynamics at play between various microbial communities is useful for both the research of microbial species and the application of microorganisms. However, despite its significance, there has been a dearth of ML research in this area.

5.2. Microbiome-disease association

The diverse population of microorganisms that call our bodies home play an essential role in maintaining our health. Inflammatory bowel diseases [13], like ulcerative colitis, colorectal cancer, atherosclerosis, diabetes, and obesity, have been linked to microbial imbalances in the gut. Understanding the relationship between microbes and disease is important because it helps doctors better diagnose and treat human illness [22, 69, 76, 90, 92]. However, there have been very few studies that have attempted to predict the microbe-disease relationship. For this reason, in this section, we present an introduction of how ML can be used to explore connections between microorganisms and health issues.

Through the combination of many data sets from the human microbe-disease consortium (MDPH HMDA) and path-based HeteSim scores [22], Fan et al. (2019) suggested a novel method for investigating the microbial-disease connection. In the beginning, heterogeneity networks were constructed. HeteSim scores were aggregated from the microbe-disease-microbe and microbe-disease-microbe pathways, and microbe-disease pairs were weighted in accordance with standard HeteSim measuring practise. We eventually settled on a strategy for totaling up the supposed strength of connections between individual microgenome areas. Katz introduced a network-based measurement technique he termed KATZ [36] to address the issue of link prediction. This method computes the degree to which nodes in a heterogeneous network are connected to one another. The KATZ technique has been implemented in many different settings, such as disease-gene association prediction [87] and lncRNA-disease association prediction [14]. To forecast links between the human

microbiota and chronic diseases, a novel KATZ-based method was presented (named KATZHMDA). In the first step, the KATZHMDA uses previously recognised associations between microorganisms and diseases to construct an adjacency matrix A .

In order to solve this problem, the BMCMDA method was presented [68]; it is predicated on the full filling of binary matrices. The BMCMDA treats microbiome-disease association (MDA) matrices as though they were incomplete because it assumes that they are the result of a parameterisation and a noise matrix. In addition, the independent subscripts of the MDA matrix are presumed to be valid under the binomial model in the BMCMDA. In their comparisons, Shi et al. (2018) employed the same dataset as HMDAD [68], which included 292 microorganisms and 39 human illnesses. From what we can see, BMCMDA outperforms KATZHMDA in terms of AUC. Furthermore, this method can be used to different forms of forecasting. Table I presents a summary of the currently available datasets and methods.

6. Conclusion

Microorganisms have an effect on their surrounding environment and the organisms that inhabit it, and they are involved in a wide range of biological activities. Human well-being, agricultural output, animal husbandry, environmental regulation, chemical manufacture, and food production all rely heavily on microorganisms. Since the microscope was invented in the 19th century, scientists have been able to observe and learn about microscopic species not previously accessible to the naked eye. However, the advent of high throughput sequencing methods has led to a deluge of microbiological information. Due to this, machine learning methods are now being used to the study of microbes. Here, we will discuss the current applications of ML to the microbiome. We discovered that ML is commonly used in the research of classification and interaction problems in the realm of microbiology. Although significant progress has been made in the field of microbiology, there are still many obstacles that must be overcome by interdisciplinary teams of researchers (including biology, informatics and medicine). Recent advances in link prediction and computational intelligence show promise in clarifying the link between diseases and microorganisms.

References

1. Amgarten D., Braga L.P.P., da Silva A.M., Setubal J.C.: MARVEL, a Tool for prediction of bacteriophage sequences in metagenomic bins. *Front. Genet.* **9**, 304 (2018)

2. Amsel R., Totten P.A., Spiegel C.A., Chen K.C., Eschenbach D., Holmes K.K.: Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am. J. Med.* **74**, 14–22 (1983)
3. Ankerst M., Breunig M.M., Kriegel H.P., Sander J.: OPTICS: ordering points to identify the clustering structure. *ACM SIGMOD*, **1**, 49–60 (1999)
4. Asgari E., Garakani K., McHardy A.C., Mofrad M.R.K.: MicroPheno: predicting environments and host phenotypes from 16S rRNA gene sequencing using a k-mer based representation of shallow sub-samples. *Bioinformatics*, **34**, 32–42 (2018)
5. Atlas R.M., Bartha R.: Microbial ecology: fundamentals and applications. *Acta Ecol. Sin.* **70**, 977 (1981)
6. Arrieta A.B. & Díaz-Rodríguez N. et al.: Explainable artificial intelligence (XAI): concepts, taxonomies, opportunities and challenges toward responsible AI. *Inf. Fusion*, **58**, 82–115 (2020)
7. Beck D., Foster J.A.: Machine learning techniques accurately classify microbial communities by bacterial vaginosis characteristics. *PLoS One*, **9**, e87830 (2014)
8. Beck L.C., Granger C.L., Masi A.C., Stewart C.J.: Use of omic technologies in early life gastrointestinal health and disease: from bench to bedside. *Expert Rev. Proteomics*, **18**, 247–259 (2021)
9. Belkin M., Niyogi P.: Laplacian eigenmaps for dimensionality reduction and data representation. *Neural Comput.* **15**, 1373–1396 (2003)
10. Bourne D.G., Garren M., Work T.M., Rosenberg E., Smith G.W., Harvell C.D.: Microbial disease and the coral holobiont. *Trends Microbiol.* **17**, 554–562 (2009)
11. Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S., Van Themaat E.V.L., Schulze-Lefert P.: Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 807–838 (2013)
12. Chang H.X., Haudenshield J.S., Bowen C.R., Hartman G.L.: Metagenome-wide association study and machine learning prediction of bulk soil microbiome and crop productivity. *Front. Microbiol.* **8**, 519 (2017)
13. Chen X., Huang Y.A., You Z.H., Yan G.Y., Wang X.S.: A novel approach based on KATZ measure to predict associations of human microbiota with non-infectious diseases. *Bioinformatics*, **33**, 733–739 (2017)
14. Chen X., Yan C.C., Luo C., Ji W., Zhang Y., Dai Q.: Constructing lncRNA functional similarity network based on lncRNA-disease associations and disease semantic similarity. *Sci. Rep.* **5**, 11338 (2015)
15. Cheng Y.Z.: Mean shift, mode seeking, and clustering. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **17**, 790–799 (1995)
16. Cortes C., Vapnik V.: Support-vector networks. *Mach. Learn.* **20**, 273–297 (1995)
17. Defays D.: Efficient algorithm for a complete link method. *Comput. J.* **20**, 364–366 (1977)
18. Deng Z.L., Gottschick C., Bhujju S., Masur C., Abels C., Wagner-Dobler I.: Metatranscriptome analysis of the vaginal microbiota reveals potential mechanisms for protection against metronidazole in bacterial vaginosis. *MSphere*, **3**, e00262–18 (2018)
19. Devlin J., Chang M.W., Lee K., Toutanova K.: Bert: pre-training of deep bidirectional transformers for language understanding. *Hum. Lang. Technol.* **7**, 4171–4186 (2019)
20. DiMucci D., Kon M., Segre D.: Machine learning reveals missing edges and putative interaction mechanisms in microbial ecosystem networks. *Msystems*, **3**, e00181–18 (2018)
21. Erev I., Roth A.E.: Predicting how people play games: reinforcement learning in experimental games with unique, mixed strategy equilibria. *Am. Econ. Rev.* **88**, 848–881 (1998)
22. Fan C.Y., Lei X. J., Guo L., Zhang A.D.: Predicting the associations between microbes and diseases by integrating multiple data sources and path based Het eSim scores. *Neurocomputing*, **323**, 76–85 (2019)
23. Fisher R.A.: The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Ann. Eugenics*, **7**, 179–188 (1936)
24. Frank M.J., Seeberger L.C., O'reilly R.C.: By carrot or by stick: cognitive reinforcement learning in parkinsonism. *Science*, **306**, 1940–1943 (2004)
25. Freund Y.: Boosting a weak learning algorithm by majority. *3rd Annual workshop on computational learning theory*, **1**, 202–216 (1990)
26. Gillevet P., Sikaroodi M., Keshavarzian A., Mutlu E.A.: Quantitative assessment of the human gut microbiome using multitag pyrosequencing. *Chem. Biodivers.* **7**, 1065–1075 (2010)
27. Greener J.G., Kandathil S.M., Moffat L., Jones D.T.: A guide to machine learning for biologists. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 40–55 (2022)
28. He X.F., Niyogi P.: Locality preserving projections. *17th Annual conference on neural information processing systems*, **1**, 153–160 (2003)
29. Hinton G.E., Salakhutdinov R.R.: Reducing the dimensionality of data with neural networks. *Science*, **313**, 504–507 (2006)
30. Huang Y.A., You Z.H., Chen X., Huang Z.A., Zhang S.W., Yan G.Y.: Prediction of microbe-disease association from the integration of neighbor and graph with collaborative recommendation model. *J. Transl. Med.* **15**, 209 (2017)
31. Huang Z.A., Chen X., Zhu Z.X., Liu H.S., Yan G.Y., You Z.H., Wen Z.: PBHMDA: path-based human microbe-disease association prediction. *Front. Microbiol.* **8**, 233 (2017)
32. Johnson H.R., Trinidad D.D., Guzman S., Khan Z., Parziale J.V., DeBruyn J.M., Lents N.H.: A machine learning approach for using the postmortem skin microbiome to estimate the post-mortem interval. *PLoS One*, **11**, e0167370 (2016)
33. Jones M.L., Ganopolsky J.G., Martoni C.J., Labbe A., Prakash S.: Emerging science of the human microbiome. *Gut Microbes*, **5**, 446–457 (2014)
34. Jordan M.I., Mitchell T.M.: Machine learning: trends, perspectives, and prospects. *Science*, **349**, 255–260 (2015)
35. Kaelbling L.P., Littman M.L., Moore A.W.: Reinforcement learning: a survey. *J. Artif. Intell. Res.* **4**, 237–285 (1996)
36. Katz L.: A new status index derived from sociometric analysis. *Psychometrika*, **18**, 39–43 (1953)
37. Keerthi S.S., Ravindran B.: A tutorial survey of reinforcement learning. *Sadhana Acad. Proc. Eng. Sci.* **19**, 851–889 (1994)
38. Kira K., Rendell L.A.: A practical approach to feature selection. *19th International workshop on machine learning*, **1**, 249–256 (1992)
39. Kober J., Bagnell J.A., Peters J.: Reinforcement learning in robotics: a survey. *Int. J. Robot. Res.* **32**, 1238–1274 (2013)
40. Langille M.G.I. & Zaneveld J. et al.: Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* **31**, 814–821 (2013)
41. Lecun Y., Bengio Y., Hinton G.: Deep learning. *Nature*, **521**, 436–444 (2015)
42. Lecun Y., Boser B., Denker J.S., Henderson D., Howard R.E., Hubbard W., Jackel L.L.: Backpropagation applied to handwritten zip code recognition. *Neural Comput.* **1**, 541–551 (1989)
43. Lecun Y., Bottou L., Bengio Y., Haffner P.: Gradient-based learning applied to document recognition. *Proc. IEEE*, **86**, 2278–2324 (1998)
44. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I.: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, **444**, 1022–1023 (2006)
45. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Samuel K., Gordon J.I.: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, **444**, 1022–1023 (2006)

46. Liang J., Luo W., Yu K., Xu Y., Chen J., Deng C., Ge R., Su H., Huang W., Wang G.: Multi-Omics revealing the response patterns of symbiotic microorganisms and host metabolism in Scleractinian coral *Pavonaminuta* to temperature stresses. *Meta*, **12**, 18 (2021)
47. Liu B., Liu F., Wang X., Chen J., Fang L., Chou K.C.: Pse-in-One: a web server for generating various modes of pseudo components of DNA, RNA, and protein sequences. *Nucleic Acids Res.* **43**, 65–71 (2015)
48. Mainali K.P. & Bewick S. et al.: Statistical analysis of co-occurrence patterns in microbial presence/absence datasets. *PLoS One*, **12**, e0187132 (2017)
49. Malla M.A., Dubey A., Kumar A., Yadav S., Hashem A., Abdallah E.F.: Exploring the human microbiome: the potential future role of next-generation sequencing in disease diagnosis and treatment. *Front. Immunol.* **9**, 2868 (2018)
50. Mnih V. & Kavukcuoglu K. et al.: Human-level control through deep reinforcement learning. *Nature*, **518**, 529–533 (2015)
51. Moran, M.A.: The global ocean microbiome. *Science*, **350**, 8455 (2015)
52. Morris O.N., Cunningham J.C., Finney-crawley J.R., Jaques R.P., Kinoshita G.: Microbial insecticides in Canada: their registration and use in agriculture, forestry and public and animal health. *Bull. Entomol. Soc. Canada*, **18**, 1–43 (1986)
53. Murali A., Bhargava A., Wright E.S.: IDTAXA: a novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome*, **6**, 140 (2018)
54. Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G., Renella G.: Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* **54**, 655–670 (2010)
55. Nowrousian M.: Next-generation sequencing techniques for eukaryotic microorganisms: sequencing-based solutions to biological problems. *Eukaryot. Cell*, **9**, 1300–1310 (2010)
56. Nugent R.P., Krohn M.A., Hillier S.L.: Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardised method of gram stain interpretation. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 297–301 (1991)
57. Oudah M., Henschel A.: Taxonomy-aware feature engineering for microbiome classification. *BMC Bioinformatics*, **19**, 227 (2018)
58. Pearson K.: On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philos. Mag.* **2**, 559–572 (1901)
59. Peng L.H., Yin J., Zhou L.Q., Liu M.X., Zhao Y.: Human microbe disease association prediction based on adaptive boosting. *Front. Microbiol.* **9**, 2440 (2018)
60. Petrof E.O., Claud E.C., Gloor G.B., Allenvercoe E.: Microbial ecosystems therapeutics: a new paradigm in medicine? *Benef. Microbes*, **4**, 53–65 (2012)
61. Quinlan J.R.: Induction of decision trees. *Mach. Learn.* **1**, 81–106 (1986)
62. Quinlan J.R.: Bagging, boosting, and C4.5. *13th National Conference on Artificial Intelligence*, **1**, 725–730 (1996)
63. Ravel J. & Gajer P. et al.: Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 4680–4687 (2011)
64. Reiff C., Kelly D.: Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 25–33 (2010)
65. Roweis S.T., Saul L.K.: Nonlinear dimensionality reduction by locally linear embedding. *Science*, **290**, 2323 (2000)
66. Ruff W.E., Greiling T.M., Kriegel M.A.: Host-microbiota interactions in immune-mediated diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 521–538 (2020)
67. Rumelhart D.E., Hinton G.E., Williams R.J.: Learning representations by back-propagating errors. *Nature*, **323**, 533–536 (1986)
68. Shi J.Y., Huang H., Zhang Y.N., Cao J.B., Yiu S.M.: BMCMDA: a novel model for predicting human microbe-disease associations via binary matrix completion. *BMC Bioinformatics*, **19**, 169–176 (2018)
69. Shi J.Y., Li J.X., Lu H.M.: Predicting existing targets for new drugs base on strategies for missing interactions. *BMC Bioinformatics*, **17**, 282 (2016)
70. Sibley C.D., Parkins M.D., Rabin H.R., Kangmin D., Norgaard J.C., Surette M.G.: A polymicrobial perspective of pulmonary infections exposes an enigmatic pathogen in cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 15070–15075 (2008)
71. Sibson R.: Slink- optimally efficient algorithm for single-link cluster method. *Comput. J.* **16**, 30–34 (1973)
72. Smirnov E.A., Timoshenko D.M., Andrianov S.N.: Comparison of regularization methods for ImageNet classification with deep convolutional neural networks. *2nd AASRI CIB*, **1**, 89–94 (2013)
73. Souza P.M.D.: Application of microbial α -amylase in industry – A review. *Braz. J. Microbiol.* **41**, 850–861 (2010)
74. Srinivasan S. & Hoffman N.G. et al.: Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One*, **7**, e37818 (2012)
75. Statnikov A., Henaff M., Narendra V., Konganti K., Li Z.G., Yang L.Y., Pei Z., Blaser M.J., Aliferis C.F., Alekseyenko A.V.: A comprehensive evaluation of multiclassification methods for microbiomic data. *Microbiome*, **1**, 11 (2013)
76. Su R., Wu H., Xu B., Liu X., Wei L.: Developing a multi-dose computational model for drug-induced hepatotoxicity prediction based on toxicogenomics data. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.* **16**, 1231–1239 (2018)
77. Sujatha S. & Hoffman N.G. et al.: Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One*, **7**, e37818 (2012)
78. Tenenbaum J.B., De Silva V., Langford J.C.: A global geometric framework for nonlinear dimensionality reduction. *Science*, **290**, 2319 (2000)
79. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I.: The human microbiome project. *Nature*, **449**, 804–810 (2007)
80. Van Der Maaten L., Hinton G.: Visualising Data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* **9**, 2579–2605 (2008)
81. Wang F., Huang Z.A., Chen X., Zhu Z.X., Wen Z.K., Zhao J.Y., Yan G.Y.: LRLSHMDA: laplacian regularised least squares for human microbe disease association prediction. *Sci. Rep.* **7**, 7601 (2017)
82. Wei L.Y., Wan S.X., Guo J.S., Wong K.K.L.: A novel hierarchical selective ensemble classifier with bioinformatics application. *Artif. Intell. Med.* **83**, 82–90 (2017)
83. Wei L.Y., Xing P.W., Zeng J.C., Chen J.X., Su R., Guo F.: Improved prediction of protein-protein interactions using novel negative samples, features, and an ensemble classifier. *Artif. Intell. Med.* **83**, 67–74 (2017)
84. Weinbauer M.G.: Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 127–181 (2010)
85. White J.R., Nagarajan N., Pop M.: Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000352 (2009)
86. Wisittapanit N.: Machine learning approach for profiling human microbiome. Ph.D. dissertation, George Mason University, Fairfax (2019)
87. Yang X., Gao L., Guo X., Shi X., Wu H., Song F., Wang B.: A network based method for analysis of lncRNA-disease associations and prediction of lncRNAs implicated in diseases. *PLoS One*, **9**, e87797 (2014)

88. Yang H., Qiu W.R., Liu G.Q., Guo F.B., Chen W., Chou K.C., Lin H.: iRSpot-Pse6NC: identifying recombination spots in *Saccharomyces cerevisiae* by incorporating hexamer composition into general PseKNC. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 883–891 (2018)
89. Yeh C.H.: Classification and regression trees (Cart). *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **12**, 95–96 (1991)
90. Yu L., Huang J.B., Ma Z.X., Zhang J., Zou Y.P., Gao L.: Inferring drug-disease associations based on known protein complexes. *BMC Med. Genomics*, **8**, 2 (2015)
91. Yu L., Zhao J., Gao L.: Predicting potential drugs for breast cancer based on miRNA and tissue specificity. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 971–980 (2018)
92. Yu L., Ma X.K., Zhang L., Zhang J., Gao L.: Prediction of new drug indications based on clinical data and network modularity. *Sci. Rep.* **6**, 32530 (2016)
93. Zhang J., Liu Y.X., Guo X., Qin Y., Garrido-Oter R., Schulze-Lefert P., Bai Y.: High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota. *Nat. Protoc.* **16**, 988–1012 (2021)
94. Zhang M.L., Pena J.M., Robles V.: Feature selection for multi-label naive Bayes classification. *Inf. Sci.* **179**, 3218–3229 (2009)
95. Zou Q., Lin G., Jiang X., Liu X., Zeng X.: Sequence clustering in bioinformatics: an empirical study. *Brief. Bioinform.* **21**, 1–10 (2020)

ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ – DOKĄD ZMIERZAMY?

Waleria Hryniewicz^{1*}, Izabella Strużycka²

¹Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków, Warszawa

²Zakład Stomatologii Zintegrowanej, Wydział Lekarsko-Stomatologiczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Wpłynęło w grudniu 2022 r.

Zaakceptowano w styczniu 2023 r.

Streszczenie: Wprowadzenie antybiotyków do terapii stanowiło przełomowy moment w medycynie nie tylko ratując miliony ludzi ale także zaowocowało rozwojem wielu nowych dziedzin jak transplantologia, neonatologia, hematologia. Sukcesowi antybiotyków towarzyszyło już od samego początku pojawianie się bakteryjnych szczepów o coraz szerszym profilu oporności. Największym motorem powstawania i szerzenia się oporności jest nadużywanie i niewłaściwe stosowanie antybiotyków zarówno w medycynie, jak i w weterynarii, a także hodowli zwierzęcej. Coraz częściej izolowane są szczepy wielooporne, ekstremalnie oporne oraz wszystkie dostępne antybiotyki. Są one identyfikowane wśród najczęstszych czynników etiologicznych zakażeń u człowieka. Jako przykłady szybkiej ewolucji oporności omówiono oporność *Staphylococcus aureus* na najważniejsze antybiotyki stosowane w leczeniu wywołanych przez ten drobnoustroj infekcji, a także pojawienie się i rozprzestrzenianie pałeczek Enterobacterales wytwarzających beta-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBLs). Przedstawiono działania po stronie UE i WHO zmierzające do ograniczenia problemu oporności na świecie.

Wstęp. 2. Rys historyczny. 3. Antybiotykooporność wybrane przykłady: *S. aureus*, β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBLs). 4. Przyczyny powstawania i szerzenia się antybiotykooporności. 5. Konsekwencje antybiotykooporności. 6. Działania niezbędne do ograniczenia powstawania i rozprzestrzeniania się bakterii opornych na antybiotyki. 7. Wnioski. 8. Piśmiennictwo

ANTIBIOTIC RESISTANCE – WHERE ARE WE GOING?

Abstract: Introduction of antibiotics into clinical practice is considered as a turning point in medicine resulting in saving millions of lives and allowing for the development of new fields of medicine such as transplantology, neonatology, hematology and many others. From the very beginning, this success was accompanied by the emergence of antibiotic resistant strains with its continuous rise. Overuse and misuse of antibiotics in medicine, veterinary practice and animal and plant production are the main reasons the resistance has emerged. Presently, an increase in isolation of multidrug resistant (MDR), excessively resistant (XDR) and pandrug resistant (PDR) bacteria is being observed worldwide in the most common human etiologic bacterial agents. As examples of rapid evolution of resistance, *S. aureus* and Enterobacterales producing extended-spectrum beta-lactamases are presented. Some initiatives of WHO and EU aiming to tackle antibiotic resistance are also discussed.

1. Introduction. 2. Historical overview. 3. Antibiotic resistance – selected examples: *S. aureus*, extended-spectrum β-lactamases (ESBLs). 4. Causes of emergence and of antibiotic resistance spread. 5. Consequences of antibiotic resistance. 6. Action needed to reduce the emergence and spread of antibiotic-resistant bacteria. 7. Conclusions. 8. References

Słowa kluczowe: antybiotyki, antybiotykooporność, przyczyny i konsekwencje

Keywords: antibiotics, antibiotic resistance, causes and consequences

1. Wstęp

Po 80. latach stosowania antybiotyków, antybiotykooporność stała się jednym z największych zagrożeń dla zdrowia publicznego i przybrała charakter pandemii, dynamicznie rozwijającej się w cieniu pandemii COVID-19. Dane KORLD (Krajowego Ośrodka

Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów) wskazują na 20% wzrost udziału w zakażeniach pałeczek Enterobacterales wytwarzających karbapenemazy [17]. Znaczący wzrost w zakażeniach wieloopornych patogenów w trakcie pandemii COVID-19 zarejestrowała także amerykańska agencja CDC (ang. Centers for Diseases Control and Prevention). Wykazano 15%

* Autor korespondencyjny: Prof. dr hab. Waleria Hryniewicz, Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa; w.hryniewicz@nil.gov.pl

© 2023 Waleria Hryniewicz, Izabella Strużycka

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

Cite as:

Antibiotic resistance – where are we going?, Waleria Hryniewicz, Izabella Strużycka, *Advancements Microbiol.*, 2023, 62, 2, 75–82, DOI: 10.2478/am-2023-0007

wzrost śmiertelności z powodu zakażeń bakteriami wieloopornymi. Nadużywanie antybiotyków odnotowano już w pierwszym roku pandemii, w którym ponad 80% pacjentów z COVID-19 je otrzymało, zaś wskazania dotyczyły mniej niż 15%. Odnotowano wzrost o 78% zakażeń powodowanych przez *Acinetobacter baumannii* z opornością na karbapenemy, o 35% przez *Enterobacterales* z opornością na karbapenemy i o 32% z ESBLs (ang. extended-spectrum β -lactamases), także wzrost o 32% zakażeń powodowanych przez *Pseudomonas aeruginosa* z wieloopornością, o 14% powodowanych przez enterokoki z opornością na wankomycynę i o 13% przez MRSA (ang. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) [8].

2. Rys historyczny

Antagonistyczne działania pomiędzy pleśniami i bakteriami zaobserwował w końcu XIX wieku francuski uczone Ernest Duchene, jednak odkrycie to przeszło bez większego echa. Aleksander Fleming potwierdził tę obserwację w r. 1928, pokazując przeciwgronkowcową aktywność substancji wydzielanej przez *Penicillium notatum* (obecnie *Penicillium chrysogenum*) nazwanej penicyliną. Ten fakt najczęściej uznaje się za początek ery antybiotykowej. Jednak penicylina, którą ten gatunek, a także wiele innych pleśni wytwarza, stał się lekiem wiele lat później. W 1938 r. dzięki wspólnym pracom Fleminga i dwóch wybitnych uczonych, farmakologa Howarda Waltera Florey'a i biochemika Ernesta Borisa Chaina, udało się wyizolować penicylinę – związek odpowiedzialny za aktywność przeciwbakteryjną wytwarzany przez *P. notatum*. Za to wspaniałe osiągnięcie Fleming, Chain i Florey otrzymali w roku 1945 nagrodę Nobla.

Kolejnym wyzwaniem dla nauki na drodze do zastosowania penicyliny jako leku, było uzyskanie jej na skalę przemysłową. Amerykańskie, a następnie brytyjskie firmy farmaceutyczne wdrożyły produkcję penicyliny na skalę przemysłową, dzięki czemu stała się ona dostępna podczas II wojny światowej, ratując życie tysiącom ludzi dotkniętych zakażeniami, najczęściej gronkowcowymi i paciorkowcowymi. Sukces penicyliny w leczeniu zakażeń był tak wielki, że dano jej przydomek „leku cudownego” (ang. miracle drug). Później ten przydomek stosowano do wszystkich antybiotyków.

Odkrycie penicyliny jako produktu metabolizmu pleśni zapoczątkowało intensywne poszukiwania związków naturalnych o działaniu przeciwbakteryjnym i przeciwgrzybiczym. Na uwagę zasługuje wykrycie przez Selmana Waksmana streptomycyny, pierwszego antybiotyku do leczenia gruźlicy, wytwarzanego przez *Streptomyces griseus*. Otrzymał on za to odkrycie nagrodę Nobla w 1952 r. Waksman wprowadził także nazwę antybiotyk, oznaczającą anti (przeciwko) bios (życie).

Poszukiwania dalszych naturalnych produktów drobnoustrojów zaowocowało wykryciem i wprowadzeniem do terapii wielu antybiotyków zarówno o szerokim spektrum działania, jak tetracykliny, chloramfenikol i o wąskim spektrum, jak makrolidy. Na uwagę zasługuje wyizolowanie przez włoskiego uczonego Giuseppe Brozu na Sardynii pierwszej cefalosporyny z *Cephalosporium acremonium* (obecnie *Acremonium*), która zapoczątkowała niezwykle rozwój tej grupy antybiotyków.

Ten „złoty okres” antybiotykoterapii odnotowywał spektakularne sukcesy. Znacząco zmniejszyła się śmiertelność z powodu zakażeń. Wg danych statystycznych USA śmiertelność z powodu najczęstszych zakażeń bakteryjnych wyniosła w 1930 r. 293 693, a w 1952 r. 93 014. Przed wprowadzeniem penicyliny odsetek śmiertelności z powodu zakażeń gronkowcowych był bardzo wysoki i wynosił 80%, z czego 70% z nich stanowiły zakażenia krwiopochodne. Rozpoczęcie stosowania penicyliny znacząco obniżyło śmiertelność z powodu zakażeń gronkowcowych.

Dzięki wprowadzeniu antybiotyków nastąpił rozwój wielu nowych specjalności medycznych, takich jak neonatologia, transplantologia, hematologia. Antybiotyki znalazły zastosowanie nie tylko w leczeniu, ale także w profilaktyce zakażeń. Ponadto, szybki rozwój chemii umożliwił modyfikowanie naturalnych produktów drobnoustrojów, co umożliwiło uzyskanie antybiotyków półsyntetycznych o poszerzonym spektrum działania, wyższej aktywności i niższej toksyczności. Powstało także wiele związków syntetycznych (np. chinolony, linkozamidy), które dla uproszczenia także nazywamy antybiotykami.

Niżej opisano dwa arbitralnie wybrane przykłady antybiotykoodporności drobnoustrojów odpowiedzialnych za najczęstsze zakażenia u ludzi.

3. Antybiotykoodporność – wybrane przykłady

W świetle sukcesu antybiotykoterapii nie zwracano wystarczającej uwagi na zjawisko, które odnotowywano od samego początku, tj. pojawianie się szczepów opornych na antybiotyki. W swoim wykładzie noblowskim Fleming postulował, że niewłaściwe, nadmierne stosowanie antybiotyków zaowocuje wzrostem liczby szczepów opornych, co w przypadku oporności *S. aureus* na penicylinę nastąpiło już na początku lat 40. [5].

Antybiotyki zaczęto masowo stosować nie tylko w medycynie, ale także w weterynarii, hodowli zwierzęcej i roślinnej.

Staphylococcus aureus

Pierwszą ważną informacją wskazującą na szybkie pojawienie się oporności drobnoustrojów na antybiotyki dostarczyły gronkowce złociste [3]. W wyniku wytwa-

rzania penicylinaz, β -laktamaz o wąskim spektrum działania w końcu lat 60. 80% szczepów tego gatunku było opornych na penicylinę [5]. Sytuacja była bardzo poważna, bowiem gronkowce złoście odpowiadają za szereg zakażeń o ciężkim przebiegu, m.in.: skóry i tkanki podskórnej, krwi, czy płuc. Po zakażeniu może dochodzić do rozsiewu bakterii drogą krwi, prowadząc do uogólnienia zakażenia, zakażeń układowych lub tworzenia ropni wewnątrznarządowych. W 1958 r. w laboratoriach firmy Beecham, jako odpowiedź na coraz mniejszą skuteczność penicyliny w leczeniu zakażeń gronkowcowych, związaną z powszechnym wytwarzaniem przez gronkowce penicylinaz, opracowano metycylinę, nową półsyntetyczną penicylinę przeciwo-gronkowcową, która wykazywała aktywność wobec szczepów wytwarzających te enzymy. Zapoczątkowała ona wprowadzenie kolejnych półsyntetycznych penicylin przeciwo-gronkowcowych, takich jak penicyliny izoksazolilowe (np. kloksacylina) i nafcylina.

Jednak już w 1961 r. wyizolowano w Anglii pierwszy szczep *S. aureus* oporny na metycylinę MRSA, który wykazywał oporność na wszystkie dostępne w tym czasie antybiotyki β -laktamowe [16], a także na wiele innych leków z niespokrewnionych grup terapeutycznych. Pozostawały one często wrażliwe jedynie na glikopeptydy, tj. wankomycynę i teikoplaninę. Oporność na metycylinę nie ma charakteru enzymatycznego i jest wynikiem nabycia genów *mecA*, *mecB* lub *mecC*, kodujących odpowiednio nowe białka wiążące penicylinę (PBPs), takie jak PBP2', PBP2b lub PBP2c odpowiedzialne za ostatni etap syntezy ściany komórkowej. Aktywność tych białek nie jest hamowana przez antybiotyki β -laktamowe, dlatego szczepy *S. aureus* z obecnością wymienionych genów pozostają odporne na wszystkie antybiotyki tej grupy, z wyjątkiem niedawno wprowadzonych cefalosporyn V generacji, takich jak ceftobiprol i ceftarolina. Geny *mecA* i *mecC* są zlokalizowane w chromosomie i stanowią część gronkowcowej kasety chromosomalnej *SCCmec* (ang. Staphylococcal Cassette Chromosome mec), natomiast *mecB* zlokalizowany jest na plazmidzie [12] w otoczeniu genów regulatorowych podobnych do *mecR*, *mecI* oraz genów warunkujących oporność na inne antybiotyki. Gen *mecA* występuje w niespokrewnionych szczepach gronkowców izolowanych zarówno od ludzi, jak i od zwierząt [9]. Najczęściej wykazano klonalne (wraz ze szczepem) rozprzestrzenienie mechanizmu oporności na metycylinę zaś znacznie rzadziej ma miejsce horyzontalne przekazanie, genu *mecA* w kasecie *SCCmec* szczepom MSSA (ang. Methicillin Susceptible *S. aureus*) lub wrażliwym na metycylinę gronkowcom koagulazoujemnym, MSCNS (ang. Methicillin Sensitive Coagulase Negative Staphylococci) [32, 33]. Źródłem genów warunkujących oporność *S. aureus* na metycylinę są szczepy odzwierzęce koagulazoujemnych gronkow-

ców i tak w przypadku *mecA* jest nim *Staphylococcus fleuretti*, *mecB* *Macroccoccus caseolyticus*, [12] *mecC* najprawdopodobniej *Staphylococcus stepanovici*, *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus sciuri*, co jednak wymaga dalszych badań [26]. Niedawno opisano obecność genu *mecD* u *Macroccoccus caseolyticus* izolowanego od krów i psów, który warunkuje oporność także na nowe cefalosporyny V generacji [28]. Wydaje się, że jest tylko kwestią czasu, kiedy *mecD* zostanie nabyty przez *Staphylococcus* spp. i poszerzy jego spektrum oporności.

Pojawienie się szczepów MRSA znacząco ograniczyło możliwości skutecznej terapii zakażeń gronkowcowych. Przez wiele lat w leczeniu pozostawała jedynie wankomycyna i teikoplanina, których zużycie znacząco wzrosło. Doprowadziło to do pojawienia się szczepów o zmniejszonej wrażliwości na te leki. Okazało się, że jest ono wynikiem kolejnych mutacji prowadzących do zmian w peptydoglikanie i pogrubienia ściany komórkowej (wzmoczona produkcja PBP2 i PBP2'), co skutkuje podwyższonymi wartościami MIC. Opisano dwa fenotypy warunkujące średnią wrażliwość na glikopeptydy: hVISA i VISA. Są one trudne do wykrywania w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej i często prowadzą do braku identyfikacji tej oporności [13, 14, 32]. Opisano także przeniesienie na plazmidzie koniugacyjnym genu *vanA* od *Enterococcus faecalis* do MRSA nadając im wysoki poziom oporności na glikopeptydy [2]. Dobrą informacją na chwilę obecną jest to, że szczepy te nie szerzą się epidemicznie. Tak więc pomimo niedawnego wprowadzenia kilku nowych antybiotyków aktywnych wobec MRSA, takich jak ceftarolina czy daptomycyna, problem skutecznego leczenia zakażeń gronkowcowych o ciężkim przebiegu pozostaje prawdziwym wyzwaniem dla medycyny.

Początkowo uważano, że szczepy MRSA wywołują jedynie zakażenia szpitalne HA-MRSA (ang. Hospital-Associated MRSA), ale w 1990 roku opisano serię przypadków zakażeń skóry i tkanki podskórnej nabytych poza szpitalem, które nie poddawały się standardowemu leczeniu cefalosporynami I generacji. Okazało się, że zakażenia te zostały wywołane przez niespokrewnione MRSA, najczęściej z heterogennym typem ekspresji oporności na metycylinę, tzw. CA-MRSA (ang. Community-Associated MRSA). Wprowadzicie CA-MRSA często wykazują wrażliwość na antybiotyki, na które HA-MRSA są odporne, ale szereg z nich wytwarza leukocydynę PVL (ang. Panton-Valentine Leucocidin), która może przyczyniać się do ciężkiego przebiegu zakażenia [32, 33].

Obecnie te dwie populacje mieszają się wymieniając geny oporności i obserwujemy ich szybkie rozprzestrzenianie, nie tylko w obrębie jednego szpitala czy kraju, ale także na skalę międzynarodową [32, 33]. Okazało się, że problem MRSA nie tylko dotyczy zakażeń u człowieka. W 2005 r. opisano MRSA, wyizolowane od świń,

a następnie innych zwierząt hodowlanych (krowy, konie, drób), należące do kompleksu klonalnego CC398 [34]. Mamy więc do czynienia z nowym źródłem wieloopornych szczepów o poważnym znaczeniu ekonomicznym, wpływającym negatywnie na dobrostan zwierząt, a także stanowiących rezerwuar zoonotycznych zakażeń człowieka. Opublikowana ostatnio metaanaliza i przegląd systematyczny wykazał dalsze szerzenie się tej nowej populacji odzwierzęcych metycylinoopornych szczepów MRSA, LA-MRSA (ang. *Livestock-associated MRSA*) i to nie tylko u osób bezpośrednio zaangażowanych w hodowlę zwierzęcą, ale także w ogólnej populacji [6].

β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym, ESBLs (*extended-spectrum beta-lactamases*)

Kolejnym przykładem sukcesu drobnoustrojów, tym razem pałeczek Gram-ujemnych, w walce o przeżycie jest wytwarzanie β-laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym, tzw. ESBLs. Ich występowanie i szerokie rozprzestrzenianie zbiega się z wprowadzeniem do terapii cefalosporyn III gen., tzw. oksymino-cefalosporyn (cefotaksym i ceftazydym) i ich bardzo szerokiego stosowania. Enzymy te opisano w 1983 r. i od tego czasu obserwujemy ich szybką ewolucję i globalne rozprzestrzenianie [11]. Obecnie szczególnie ważną rolę odgrywają w szerzeniu się tej oporności pałeczki *Enterobacteriales*, a przede wszystkim najszerszej rozprzestrzeniona *Escherichia coli* odpowiedzialna za najczęstsze zakażenia u ludzi, ale także izolowana od zwierząt hodowlanych, dzikich i ze środowiska. Zgodnie z danymi uzyskanymi w ramach Europejskiej Sieci Monitorowania Lekowrażliwości (EARS-Net), najczęstszym producentem ESBLs spośród patogenów człowieka odpowiedzialnych za zakażenia łożyska krwi są pałeczki *Klebsiella pneumoniae*. Polska należy do liderów w tym obszarze, bowiem ponad 50% izolatów tego gatunku wytwarza te enzymy [17]. Należy także pamiętać o pałeczkach *Salmonella*, które odgrywają istotną rolę w epidemiologii zakażeń u zwierząt hodowlanych i stanowią ważny rezerwuar genów ESBLs w środowisku. ESBLs należą do β-laktamaz serynowych i zostały zaklasyfikowane do klasy A wg Amblera. *Enterobacteriales* najczęściej wytwarzają TEM, SHV i CTM. Zidentyfikowano co najmniej 243 warianty TEM i 228 wariantów SHV [7, 11]. Wytwarzanie ESBLs stanowi ogromne ograniczenie w wyborze skutecznej terapii, bowiem nadaje szczepom oporność na wszystkie penicyliny oraz cefalosporyny od I-jej generacji, do IV generacji (cefepim). Co więcej szczepy ESBL-dodatnie są zazwyczaj odporne na wiele innych grup leków, pozostając niekiedy wrażliwe jedynie na karbapenemy. Wprawdzie ESBLs mogą być hamowane *in vitro* przez stare inhibitory, takie jak kwas klawulanowy, sulbaktam i tazobaktam, są one obecnie klinicznie rzadko skuteczne. Natomiast nowe inhibitory awibaktam, waborbaktam i relebaktam będące w kombinacji

z dotychczasowymi antybiotykami takimi jak ceftazydym, meropenem i imipenem/cylastatyna skutecznie je hamują. Wytwarzanie ESBLs stanowi także poważny problem epidemiologiczny bowiem geny je kodujące zlokalizowane są na ruchomych elementach genetycznych, takich jak transpozony/plazmidy, co skutkuje ich łatwym przekazywaniem nie tylko między szczepami w obrębie danego gatunku, ale także między gatunkami. Należy podkreślić, że coraz częściej w obrębie plazmidu koniugującego niosącego geny ESBL identyfikowane są geny warunkujące oporność na aminoglikozydy i fluorochinolony, co czyni je wielolekoopornymi.

Rozprzestrzenianie genów ESBLs jak i szczepów je niosących jest powszechne nie tylko wśród pałeczek *Enterobacteriales*, ale także innych pałeczek Gram-ujemnych izolowanych z zakażeń od ludzi i zwierząt, w tym także dzikich, a także z nosicielstwa i ze środowiska. Podkreśla się rolę ścieków, także szpitalnych w rozprzestrzenianiu się szczepów antybiotykoopornych do środowiska i dalszego ich szerzenia, a także nabywania przez dzikie zwierzęta [4, 19, 24].

Wprawdzie wytwarzanie ESBLs stanowi ze względu na rozmiar i znacząco ograniczone możliwości skutecznej terapii najpoważniejszy obecnie problem spośród mechanizmów oporności pałeczek Gram-ujemnych, to pojawienie się w 1996 r. *K. pneumoniae* wytwarzającej karbapenemazę (KPC) a następnie metaloenzymów (np. NDM), czy OXA-48 stało się największym z dotychczasowych wyzwań zarówno dla diagnostyki, terapii jak i kontroli zakażeń, prowadząc do dalszego zmniejszenia wyborów terapeutycznych [18, 20].

4. Przyczyny powstawania i szerzenia się antybiotykooporności

Oporność na antybiotyki może powstawać w wyniku mutacji w genach chromosomalnych, lub zlokalizowanych na elementach ruchomych, bądź poprzez horyzontalny transfer determinant oporności drogą koniugacji, transformacji, czy transdukcji. Proces ten ulega znacznemu przyspieszeniu w obecności antybiotyków. Dlatego nadużywanie i niewłaściwe stosowanie tej grupy leków odgrywa kluczową rolę w powstawaniu i szerzeniu się opornych szczepów bakteryjnych. Stąd niezwykle ważne jest monitorowanie zużycia antybiotyków zarówno w medycynie, jak i w weterynarii i hodowli zwierzęcej. W UE zadanie to jest realizowane przez dwie agencje: ECDC (ang. European Centre for Diseases Control) i EFSA (ang. European Food Safety Agency). Najbardziej efektywny jest horyzontalny przekaz genów oporności poprzez różnego rodzaju ruchome elementy genetyczne jak plazmidy, transpozony. Tak szerzą się, np. ESBLs i karbapenemazy. Natomiast pneumokoki nabyły geny oporności na β-laktamy drogą transformacji gene-

tycznej, pozyskując je od paciorkowców z grupy viridans (*Streptococcus oralis*) i wbudowując je w geny kodujące różne białka PBPs, co daje obraz „genów mozaikowych”. Natomiast wysoki poziom oporności MRSA na wankomycynę przekazany został drogą transdukcji od *Enterococcus faecalis* [2]. Szczególnie niebezpieczna jest oporność wśród gatunków bakterii wywołujących najczęstsze zakażenia, takie jak wspomniane wyżej wywołane przez *S. aureus* i pałeczki *Enterobacterales*. Ważną rolę w szerzeniu się oporności odgrywa epidemiologia zakażeń. Jeśli spojrzymy na chorobotwórczość *Neisseria gonorrhoeae* i wzrost izolacji szczepów o charakterze XDR a nawet PDR (patrz niżej), to wydaje się trudne do uwierzenia, że będzie trzeba rzeżączkę leczyć w szpitalu i coraz częściej nie móc jej wyleczyć [27].

Na świecie opisano rezerwuary opornych bakterii, w tym opornych na antybiotyki ostatniej szansy, takie jak karbapenemy czy kolistyna. Najlepszym przykładem rozległego geograficznie rezerwuaru pałeczek *Enterobacterales* wytwarzających karbapenemazę klasy B, zwaną NDM (*New Delhi metallo-β-lactamase*), są Indie, kraje Subkontynentu Indyjskiego, kraje Bliskiego Wschodu, Afryki oraz Bałkanów [20]. Nazwa tego niebezpiecznego także pod względem epidemiologicznym mechanizmu oporności związana jest z wykryciem go w 2008 r. po raz pierwszy u *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* izolowanych od obywatela szwedzkiego, który powrócił do Sztokholmu po hospitalizacji w New Delhi [18]. Gen *bla_{NDM}* kodujący NDM zlokalizowany na plazmidzie, został znaleziony wśród różnych gatunków *Enterobacterales* [34]. W Polsce, wg danych KORLD, NDM stanowi najczęściej identyfikowaną karbapenemazę u pałeczek *Enterobacterales*. W roku 2021 potwierdzono 3036 zakażeń wywołanych przez pałeczki *Enterobacterales*, głównie *Klebsiella pneumoniae*, wytwarzających karbapenemazę typu NDM, co oznacza ponad dwukrotny wzrost w porównaniu z rokiem 2019 [17].

Źródłem opornych na kolistynę pałeczek Gram-ujemnych stały się *E. coli* wyizolowane od drobiu w Chinach niosące gen *mcr-1* na plazmidzie, które zyskały zasięg międzynarodowy [21], a gen szybko ewoluuje. Obecnie znanych jest już 8 wariantów tego genu [21]. *E. coli* z *mcr-1* izolowano także w Polsce [15] od pacjentki z zakażeniem dróg moczowych, która nie miała kontaktu z zakładem opieki zdrowotnej, ani nie wyjeżdżała za granicę [13].

Szerzeniu oporności sprzyja także niewystarczające wykorzystanie diagnostyki mikrobiologicznej w medycynie, pozwalającej na podejmowanie celowanej terapii i interwencji w sytuacji pojawienia się wieloopornych bakterii. Brak restrykcyjnych programów kontroli zakażeń i polityki antybiotykowej stanowi istotny problem w ograniczaniu antybiotykooporności. Szerzeniu się opornych szczepów sprzyja niski poziom higieny produkcji zwierzęcej [38].

5. Konsekwencje antybiotykooporności

Konsekwencje narastającej oporności są bardzo szerokie. Szczególnie niepokojący jest wzrost śmiertelności powodowany przez wielooporne patogeny bakteryjne ze względu na coraz bardziej ograniczający się wybór skutecznych opcji terapeutycznych. Międzynarodowe badanie przeprowadzone w 2019 pokażało, że z powodu zakażeń wywołanych przez wielooporne bakterie zmarło na świecie 4 950 000 (95% UI 3-62–6-57), w tym 1 270 000 (95% UI 0-911–1-71) zgonów było spowodowanych przez patogeny bakteryjne oporne na wszystkie dostępne antybiotyki [1] MRSA był odpowiedzialny za ponad 100 000 z nich a pozostałe patogeny, tj. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii* i *P. aeruginosa* od 50 000–100 000 każdy (929 000 (660 000–1 270 000)). Raport przygotowany pod kierownictwem wybitnego brytyjskiego ekonomisty O’Neila przewiduje, że w przypadku braku podjęcia wszechstronnych, restrykcyjnych działań ograniczających powstawanie i szerzenie się opornych bakterii, w roku 2050 zginie z powodu zakażeń przez nie wywołanych nawet 10 mln osób rocznie, co będzie stanowiło wyższą śmiertelność niż z powodu nowotworów. Konsekwencje ekonomiczne tego zjawiska będą bardzo poważne wraz ze wzrostem obszaru biedy, szczególnie w krajach rozwijających się [25].

Ze względu na coraz powszechniejsze izolowanie na całym świecie szczepów opornych, międzynarodowy zespół specjalistów opracował definicje epidemiologiczne nabytej oporności celem porównywania danych uzyskiwanych z różnych krajów [22].

MDR (ang. multidrug resistance) oporność na co najmniej jeden antybiotyk z trzech lub więcej grup terapeutycznych.

XDR (ang. extensive resistance) oporność na co najmniej jeden antybiotyk ze wszystkich grup terapeutycznych z wyjątkiem dwóch lub mniej (tj. izolat bakteryjny pozostaje wrażliwy na jedną lub dwie grupy terapeutyczne).

PDR (ang. pandrug resistance) oporność na wszystkie dostępne antybiotyki.

Wszystkie powyższe typy oporności są obecne wśród patogenów bakteryjnych izolowanych z zakażeń w Polsce.

6. Działania niezbędne do ograniczenia powstawania i rozprzestrzeniania się bakterii opornych na antybiotyki

Problem antybiotykooporności dotyczy wszystkich patogenów i wszystkich krajów świata, aczkolwiek istnieją między nimi ogromne różnice. Tam gdzie rozumiano, że poziom antybiotykooporności jest ściśle

powiązany z poziomem konsumpcji antybiotyków, a także kluczową rolę kontroli zakażeń w szpitalu i konieczność wysokiej higieny produkcji zwierzęcej i rolnej, sytuacja jest pod kontrolą. Pozytywnymi działaniami w tym obszarze mogą poszczycić się kraje skandynawskie i Holandia. Unia Europejska już w 2006 r. wprowadziła zakaz stosowania antybiotyków w tuczu zwierząt (promotory wzrostu) podczas gdy USA dopiero w 2017 r.

Wypracowano wiele strategii w walce z antybiotykoopornością w zależności od nasilenia tego zjawiska, możliwości finansowych danego kraju, istniejących struktur i świadomości zagrożeń jakie niesie narastająca oporność. Ważnym jej elementem jest monitorowanie oporności kluczowych czynników etiologicznych zakażeń u ludzi i u zwierząt hodowlanych. Musi ono być połączone z pozyskiwaniem danych o poziomie i strukturze konsumpcji antybiotyków. Monitorowanie stanowi niezbędne narzędzie bieżącej oceny szerzenia się oporności, ale także bardzo ważne jest przekazywanie aktualnych danych jednostkom odpowiedzialnym za politykę zdrowotną państwa, służbom sanitarnym i całemu społeczeństwu o poziomie zagrożeń. To one powinny wdrażać strategie ograniczenia antybiotykooporności. Najbardziej aktywne w walce z antybiotykoopornością są kraje UE, co znajduje odzwierciedlenie w wielu aktach prawnych i działaniach. Kraje członkowskie, zwłaszcza Skandynawia i Holandia bardzo wcześnie rozpoznały zagrożenia związane z narastającą opornością na antybiotyki, co spowodowało bardzo intensywne działania w tym obszarze Komisji Europejskiej. Holandia była inicjatorem dwóch ważnych sieci monitorowania, tj. EARS-Net (Europejska Sieć Monitorowania Lekooporności Drobnoustrojów) oraz ESAC-Net (Europejska Sieć Konsumpcji Antybiotyków), które obecnie są koordynowane przez ECDC, a ze strony Polski są realizowane przez Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej Narodowego Instytutu Leków, w tym KORLD. Na poziomie UE działania te są koordynowane przez ECDC, EMA (ang. European Medicines Agency) i EFSA. Ta ostatnia monitoruje oporność i zużycie antybiotyków w weterynarii i w hodowli zwierzęcej. Na uwagę zasługuje kolejna inicjatywa UE w walce z antybiotykoopornością, a mianowicie wprowadzenie monitorowania opornych drobnoustrojów w ścięgach, co pozwoli oceniać ryzyko dalszej transmisji [38]. Kraje UE uzgodniły wprowadzenie do 2017 r. krajowych strategii walki z antybiotykoopornością. Niestety Polska do chwili obecnej nie opracowała takiej strategii, a należy do krajów UE o najwyższym poziomie antybiotykooporności i jest w czołówce państw europejskich o wysokim poziomie zużycia antybiotyków w POZ.

Na uwagę zasługują działania w walce z antybiotykoopornością Światowej Organizacji Zdrowia (WHO).

Od końca ubiegłego wieku zaangażowała się ona w opracowywanie raportów na temat sytuacji antybiotykooporności wśród krajów członkowskich. A także uznała ten temat za priorytetowy w swoich działaniach. W 2014 ogłosiła, że wiek XXI może stać się erą postantybiotykową, w której nawet łagodne zakażenia mogą skutkować zgonem. Podkreślono, że nie jest to apokaliptyczny wytwór fantazji, ale realny obraz XXI w. [36].

W kolejnym bardzo ważnym dokumencie opublikowanym w roku 2017 przedstawiła podział opornych patogenów bakteryjnych na kategorie pod względem pilności wprowadzenia nowych, skutecznych leków [37]. Ta kategoryzacja oparta została na przeprowadzonej analizie sytuacji epidemiologicznej w krajach członkowskich. Może różnić się między krajami, ale przedstawione są w niej wszystkie najważniejsze wielooporne patogeny bakteryjne odpowiedzialne za najczęstsze zakażenia u człowieka. Do pierwszej kategorii zaliczono pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* odporne na karbapenemy (różne mechanizmy), pałeczki *Enterobacterales* odporne na cefalosporyny III gen. i karbapenemy. Ponadto, w grupie tej znalazło się *Mycobacterium tuberculosis* z opornością na rifampicynę.

W drugiej kategorii znalazły się *S. aureus* (metycylicyna i wankomycyna), *E. faecium* (wankomycyna), *H. pylori* (klarytromycyna), *Campylobacter* i *Salmonella* spp. (fluorochinolony), *Neisseria gonorrhoeae* (cefalosporyny 3-gen. i fluorochinolony).

W trzeciej kategorii umieszczono wielooporne *S. pneumoniae* (penicylina), *H. influenzae* (cefalosporyny III gen.) i *Shigella* spp. (fluorochinolony). Należy podkreślić fakt, że w grupie drugiej i trzeciej znalazły się gatunki odpowiedzialne za zakażenia pozaszpitalne, a więc pilnie potrzebne są nowe antybiotyki do podawania doustnego.

WHO powołała 22 października 2015 r. sieć monitorowania GLASS (ang. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System) obejmującą wszystkie kraje członkowskie i ściśle współpracującą z ECDC i sieciami monitorowania UE. W Polsce zaangażowany w tę inicjatywę jest Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. Pierwsze dane potwierdzają, że oporność na antybiotyki dotyczy wszystkich krajów świata, a wiodącymi wieloopornymi patogenami są najczęstsze czynniki zakażeń człowieka i zwierząt. Szczególnie niebezpieczny obraz rysuje się w krajach rozwijających się, w których dostęp do nowoczesnej terapii i diagnostyki, a także czystej wody jest ciągle niewystarczający.

Bardzo ważnym obszarem działań w ochronie zdrowia jest podnoszenie świadomości, zarówno wśród profesjonalistów, jak i całym społeczeństwie, na temat zagrożeń jakie niesie narastająca oporność. Badania wiedzy w tym obszarze w Polsce pokazało konieczność roz-

szerzenia w trakcie studiów medycznych i weterynaryjnych tematyki dotyczącej antybiotyków ich racjonalnego stosowania i konsekwencji nadużywania tej grupy leków [29, 30, 31], a także szerszego wykorzystania nowoczesnych narzędzi diagnostyki mikrobiologicznej. Jednocześnie powinna być prowadzona szeroka i ciągła działalność edukacyjna całego społeczeństwa [23]. Podobne wnioski sformułowano w ramach Europejskiego badania Eurobarometr dotyczącego wiedzy i postaw obywateli UE wobec stosowania antybiotyków [10].

7. Wnioski.

Oporność bakterii na antybiotyki ze względu na jej zakres stanowi jedno z największych wyzwań dla zdrowia publicznego na świecie. Brak natychmiastowego podjęcia wielosektorowych działań doprowadzi do dalszego rozprzestrzeniania problemu zwiększając śmiertelność i straty ekonomiczne. Niezbędne są wielosektorowe działania, obejmujące: monitorowanie oporności i zużycia antybiotyków, rozwijanie nowoczesnej diagnostyki mikrobiologicznej, szerokie badania naukowe nad nowymi lekami, szczepionkami i biologią drobnoustrojów, szeroką edukację społeczeństwa, profesjonalistów i decydentów w ochronie zdrowia. Ustanowienie w każdym kraju strategii Jedno Zdrowie obejmującej zdrowie człowieka, zwierząt i zdrowe środowisko jest odpowiedzią na pojawiające się poważne zagrożenie jakim jest antybiotykooporność.

8. Piśmiennictwo

1. Antimicrobial Resistance Collaborators: Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis *Lancet*, **399**, 629–655 (2022)
2. Appelbaum P.C.: The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin – resistant *Staphylococcus aureus*, *Clin. Microbiol. Infect.* **12** (Suppl. 1), 16–23 (2006)
3. Barber M., Rozwadowska-Dowzenko M.: Infections by penicillin – resistant Staphylococci. *Lancet*, **2**, 641–644 (1948)
4. Blak H., de Kruijff P., Hamidjaja A., van Hoek A.H.A.M., de Roda Husman A.M., Schets F.M.: Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewaters treatment plants. *Vet. Microbiol.* **17**, 448–459 (2014)
5. Chambers H.F.: The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 178–182 (2001)
6. Chen C, Wu F.: Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) colonisation and infection among livestock workers and veterinarians: a systematic review and meta-analysis. *Occup. Environ. Med.* **78**, 530–540 (2021)
7. Costanheira M., Simmer P.J., Bardford P.A.: Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrob. Resist.* DOI:10.1093/jacamr/dlab092 (2021)
8. CDC. <http://www.cdc.gov/drugresistance/covid19.html> (01.12.2022)
9. Empel J., Żabicka D., Hryniewicz W.: Ziarenkowce Gram-dodatnie z rodzaju *Staphylococcus*. Oznaczenie wrażliwości i wykrywanie mechanizmów oporności na antybiotyki β -laktamowe. NPOA. Rekomendacje. www.antybiotyki.edu.pl (01.12.2021)
10. Eurobarometer (Special) Antimicrobial Resistance 478 <http://ec.europa.eu/commfrontoffice/publicopinion/index.cfm> (01.12.22)
11. Gniadkowski M: Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 597–608 (2001)
12. Gomez-Sanz E., Schwendener S., Thomann A., Gobeli Brawand S., Perreten V.: Correction for Gómez-Sanz et al., “First Staphylococcal Cassette Chromosome mec containing a mecB – carrying gene complex independent of transposon Tn6045 in a *Macrococcus caseolyticus* isolate from a canine infection”. *Antimicrob. Agents Chemother.* DOI:10.1128/AAC.01916-18 (2018)
13. Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T., Tenover F.C.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 35–136 (1997)
14. Howden B.P., Davies J.K., Johnson P.D.R., Stinear R.: Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* **23**, 99–139 (2010)
15. Izdebski R., Baraniak A., Bojarska K., Urbanowicz P., Fiett J., Pomorska-Wesołowska M., Hryniewicz W., Gniadkowski M., Żabicka D.: Mobile MCR-1-associated resistance to colistin in Poland. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, (8): 2331–2333 (2016)
16. Jevons M.P.: “Celbenin” – resistant staphylococci. *Br. Med. J.* **1**, 124–125 (1961)
17. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. www.korld.edu.pl (01.12.22)
18. Kumarasamy K.K., Woodford V., et al.: Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* **10**, 597–602 (2010)
19. Larsson J., Flach C.F., Laxminarayan R: Sewage surveillance of antibiotic resistance holds both opportunities and challenges. *Nature Rev. Microbiol.* DOI:10.1038/s41579-022-00835-5–602 (2022)
20. Lee Y-L., Chen H-M, Hiji I-M, Hsueh P-R.: Carbapenemases-producing Enterobacterales infections: recent advances in diagnosis and treatment. *Int. J. Antimicrob. Agents*, DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106528 (2022)
21. Ling Z., Yin W., Shen Z., Wang Y., Shen J., Walsh T.R.: Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 3087–3095 (2020)
22. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B.: Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 268–281 (2012)
23. Mazinska B., Struzycka I., Hryniewicz W.: Surveys of public knowledge and attitudes with regard to antibiotics in Poland: Did the European Antibiotic Awareness Day campaigns change attitudes? *PLoS One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0172146 (2017)
24. Miltgen G, Bertrand X. et al.: One Health compartmental analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* on Reunion Islands reveals partitioning between humans and livestock. *J. Antimicrob. Chemother.* **77**, 1254–1262 (2022)
25. O’Neill J.: Tackling crisis for the health and wealth of nations. The review on antimicrobial resistance. Wellcome Trust, London (2014)

26. Paterson G.K., Harrison E.M., Holmes M.A.: The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **22**, 42–47 (2014)
27. Pleininger, S., Indra A., Golparian D., Heger F., Schindler S., Jacobsson S., Heidler S., Unemo M.: Extensively drug-resistant (XDR) *Neisseria gonorrhoeae* causing possible gonorrhoea treatment failure with ceftriaxone plus azithromycin in Austria, April. *Eurosurveillance*, DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.24.2200455 (2022)
28. Schwendener S., Cotting K., Perreten V.: Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Macrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. *Sci. Rep.* **7**, 43797 (2017)
29. Sobierajski T., Mazinska B., Chajeka-Wierzchowska W., Smialek M., Hryniewicz W.: Antimicrobial and antibiotic resistance from perspective of Polish veterinary students: an inter-university study. *Antibiotics*, **11**, 115 (2022)
30. Sobierajski T., Mazinska B., Wanke-Rytt M., Hryniewicz W.: Knowledge-based attitudes of medical students in antibiotic therapy and antibiotic resistance. A cross-sectional study. *Environ. Res. Public Health*, DOI: 10.3390/ijerph18083930 (2021)
31. Struzycka I., Hryniewicz W. et al.: Knowledge of antibiotics and antimicrobial resistance amongst final year dental students of Polish medical schools-A cross-sectional study. *Eur. J. Dent. Educ.* **23**, 295–303 (2019)
32. Tsubakishita S., Kuwahara-Arai K., Sasaki T., Hiramatsu K.: Origin and Molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**, 4352–9 (2010)
33. Turner N.A., Sharma B.K., Maskarinec S.A., Eichenberger E.M., Shah P.P., Carugati M., Holland T.L., Fowle V.G.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 203–218 (2019)
34. van Duin D., Doi Y.: The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*, **8**, 460–469 (2017)
35. Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klassen C., Wulf M.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg Infect Dis.* **11**, 1965–1966 (2005)
36. World Health Organization: Antimicrobial resistance: global report on surveillance. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642> (2014)
37. World Health Organization: Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. 2017(WHO/EMP/IAU/2017.12) (2017)
38. Xu C., Kong L., Gao H., Cheng X., Wang X.: A review of current bacterial resistance to antibiotics in food animals. *Frontiers Microbiol.* DOI:10.3389/fmicb.2022.822689 (2022)

ALKHUMRA HEMORRHAGIC FEVER VIRUS (AHFV): CURRENT STATUS AND FUTURE PROSPECTS

Leena Esam Azhar

Preventive Medicine Program, General Directorate of Health Affairs, Jeddah, Makkah Region, Saudi Arabia
Special Infectious Agents Unit – BSL3, King Fahd Medical Research Center, King Abdulaziz University,
Jeddah – 21362, Saudi Arabia

Submitted in December 2021, accepted in October 2022

Abstract: The objective of this review to summarize the current status of information about the Alkhumra hemorrhagic fever caused by Alkhumra hemorrhagic fever virus an Arboviral infection. This virus was identified in Alkhumra district of Jeddah, Saudi Arabia in 1995 from a butcher patient. The infected individual develops symptoms febrile flu-like illness, hemorrhagic manifestations and less like encephalitis. Several cases have been reported from various locations of Saudi Arabia and a few from Egypt and is further expanding in tropical and subtropical regions of Western Asia. The virus is transmitted to human by direct contact to animal, raw meat, and biproducts as well as either tick or mosquito bites. Based on the recent status, a great concern of public health was raised with the AHFV epidemics and infection. Currently, there is no effective vaccine and antiviral therapeutics against AHFV. So, there is an urgent need to design and develop an effective preventive measure using interdisciplinary approach. This review will provide the status of research work based on the latest published information about AHFV. The provided information will be highly useful to design the effective preventive measures to control the disease in the Kingdom of Saudi Arabia.

1. Introduction. 2. Molecular characterization. 3. Transmission of AHFV. 4. Diagnosis and Sero-surveillance of AHFV. 5. Clinical features, mortality of AHFV infection and manifestations. 6. Prevention control and management of AHFV. 7. Conclusion and future prospects

Keywords: AHFV, Alkhumra, diagnosis, prevention and management, transmission

1. Introduction

A new viral disease known as Alkhumra hemorrhagic fever caused by Alkhurma hemorrhagic fever virus (AHFV) was reported from the Alkhumra, Jeddah, Kingdom of Saudi Arabia in 1995 [27]. Later, the causative agent was identified and characterized and was designated as “Alkhumra hemorrhagic fever virus” (AHFV) based on the first case of identification from Alkhumra district [11, 30]. The AHFV belongs to the Flaviviridae family with ss positive sense RNA. Based on current status few clinical cases of this virus has also been reported from Makkah (20 cases), Najran (8 cases), and bordering Yemen (70 cases) Taif, Alqunfuda and Jazan [2, 17, 22]. The was isolated as well from different hosts in Egypt, Italy [4, 23, 28] and Djibouti [3, 8]. These reports warrants to an alarming situation and suggesting the expansion of geogra-

phic distribution beyond the origin. The emergence and re-emergence of AHFV has significant impact on human and animal health.

2. Molecular characterization

The molecular characterization of AHFV has been done by many research groups. Like other Flaviviruses, AHFV genome size ranges from 10.5 to 10.7 kb and codes a polyprotein which cleaves into structural and non-structural proteins (Coat, Pre- Membrane and Envelop- Structural proteins) and non-structural protein known as NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5 by viral and host proteases [1, 9, 10, 12, 18, 19, 24, 26, 29]. The 5' and 3' untranslated regions (UTRs), of the viral genome consist the coding sequence responsible for viral pathogenicity. The trypsin-like serine

* Corresponding author: Leena Esam Azhar Preventive Medicine Program, General Directorate of Health Affairs, Makkah Region, Jeddah, Saudi Arabia; e-mail: Leenaazhar@gmail.com

© 2023 Leena Esam Azhar

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

Cite as:

Alkhumra hemorrhagic fever virus (ahfv): current status and future prospects, Leena Esam Azhar, *Advancements Microbiol.*, 2023, 62, 2, 83–86, DOI: 10.2478/am-2023-0008

protease and helicase domains are localized on NS3 region and methyl transferase and RNA-dependent RNA polymerase domains are present on NS5 region. The NS2B works as a cofactor for protease activity of NS3 [24, 25]. The first report about full genome sequencing and analysis of AHFV strain 1176 which was identified from an infected patient was published by Charrel et al in 2001. The complete genome had 10248 nucleotides with 3416 amino acids polyprotein [7]. Based on the genetic characterization relationship, Kyasanur forest disease virus (KFDV) showed the closest cluster, and it was likely to be the common ancestor and represent two genetic subtypes of the same virus species. Additionally, the sequence analysis of 11 AHFV isolates collected from Makkah and Jeddah as well as one isolate from *Ornithodoros savignyi* tick, sand tampan (tick JE7), showed the sequences similarity with AHFV strain 1176 and KFDV especially in the envelop protein gene but less similarity was observed in NS3 and NS5 gene which indicates low microevolution [5, 6]. In 2014, another full genome sequencing and analysis of AHFV strain isolated from Najran was performed by Madani et al and the results showed the AHFV-Najran strain had 10546 nucleotides as compared to other strains had 10,685–10,749. The sequence similarity showed 99% identity to other 18 AHFV strains and the phylogenetic relationship showed the AHFV formed closed cluster with previously reported AHFV strains while KFDV, Langat virus, TBEV, and OHFV isolates formed a separate cluster. This sequence analysis concluded that the AHFV-Najran strain could have resulted from possible recombination with circulating strains in Saudi Arabia [18].

3. Transmission of AHFV

The possible mode of transmission of AHFV has been reported in many studies. The direct contact with animals and their by products such as raw milk, raw meat, secretions and blood, and exposure to ticks and plays an important role in transmission [11, 22, 27, 30]. But there were several reports suggest that mosquito bites can also play important role because some affected patients were not in the direct contact with animals and their bi-products. Tick and tick bites may be suspected as the reservoir and possible source of virus spread to humans [11, 17, 20]. But in another study, a significant risk factors of AHFV infection are possible after multivariate modeling, animal contact, neighboring farms, and tick bites [2]. The human-to-human transmission of AHFV has not been reported but based on some reports 32.1–71.4% cases were the part of same family cluster [2, 17]. In an interesting study, it was observed that the successful propagation of

AHFV in mosquito cell lines and based on this study it may be hypothesized that mosquito could be an important vector for virus transmission [14, 16, 20].

4. Diagnosis and Sero-surveillance of AHFV

The laboratory diagnosis of AHFV infection can be performed by both standard serological and molecular techniques [17, 30]. The AHFV can be detected with immunofluorescence assay (IFA) by using the flavivirus-specific monoclonal antibody 4G2. Additionally, NS5-gene specific PCR also successfully detect the AHFV infection and provides the 220 bp amplicon. The detection of AHFV by Realtime-PCR is more sensitive than viral culture and it has been shown by the detection of virus in serum, plasma, and the buffy coat [13, 15]. Serosurveillance data on AHFV antibodies in humans in the KSA or elsewhere are scarce. The study report suggests that the prevalence of AHFV-IgG was 1.3% among 1024 soldiers from different regions of the KSA [21]. The positive sera in different locality such as Tabouk (61.5%), 23.1% from the Eastern region, 7.7% from Asir and Jazan (7.7%). In an interesting study, it was observed that the individuals were AHFV- IgG-positive and there were no reported cases of AHFV in their locality in the past and this suggests that they may had mild infection earlier with AHFV.

5. Clinical features, mortality of AHFV infection and manifestations

The first case of AHFV was detected in Alkhumra district and total 37 suspected cases were notified in 2001–2003. The clinical features of ALKV is extremely severe. Only 20 cases were confirmed by laboratory diagnosis and 11 have hemorrhagic manifestations and finally 5 of them died confirming the high (up to 30%) case fatality rate which reflects that the ALKV is the deadliest virus [2]. The frequency of multiple features including clinical, and laboratory have been described in the outbreak occurred in Jeddah, Makkah and Najran [2, 4, 11, 17, 22]. The clinical manifestations range from mild to severe and includes fever, headache, retro-orbital pain, arthralgia, myalgia, anorexia, vomiting, leukopenia, thrombocytopenia, and elevated liver enzymes, creatine kinase, and lactate dehydrogenase. Additionally, gastroenteritis-like illness, rhabdomyolysis, severe muscle weakness and as well as severe neurologic and hemorrhagic symptoms have also been reported [1, 22, 28]. The mortality rate of AHFV infection ranged from 20–30% in Jeddah and Makkah [11, 30]. But based on the recent outbreak in Najran (2003–2009), Taif, Jazan (2010–2015), and in Aljun-

fuda in April 2017, the mortality rate was ranged from (<0.5–1%) [2, 11, 17, 22, 30]. The rate of low mortality in these regions suggests that the protective herd immunity among the inhabitants has been developed against this virus [17].

6. Prevention control and management of AHFV

As per latest published information and epidemiological data, the livestock animal, tick and mosquito bites play an important role in the possible transmission of AHFV in both human and animals. Currently, there is no specific vaccines and antiviral therapy to control and manage the AHFV infection. The effective patient supportive care with intravenous fluids, ionotropic support, blood and fresh frozen plasma transfusions and mechanical ventilation suggests the proper control and management of virus infection. The infection of AHFV can be prevented by the direct contact with these animals and their biproducts as well as avoidance of mosquito and tick bites. The immediate information should be provided to Health and agriculture ministry about the virus infection and risk factors in a particular locations and municipality animal handlers, slaughterhouses, and workers. The preventive measures should be taken by all the workers, and they should protect themselves by using personal protective equipment during handling of their animals and biproducts. The control measure of mosquito bites and ticks should be undertaken by concerned ministries and authorities. A national program for controlling the ticks and mosquitos should be established. The assessment of clinical manifestations in livestock animals as well as animal handlers should also be frequently performed to control the virus spread. The continuous collection of fecal, urine and blood samples and their proper storage should be performed so that the presence of virus and neutralizing antibodies can be detected by both serological and molecular techniques. The interdisciplinary teamwork should also be performed by including health ministry, agriculture ministry, municipality manager, slaughterhouse in charge and vector control authorities of Kingdom of Saudi Arabia.

7. Conclusion and future prospects

Based on the status and published reports, there is no effective vaccine and therapy available for AHFV infection in the Kingdom of Saudi Arabia. This virus was reported from Jeddah in 1995 and not much work has been done about the virus disease spread, vectors (Ticks and mosquitos), virus reservoir, emergence and re-emergence, virus genetic diversity, recombination,

factors of virus and disease spread as well as pathological and clinical manifestations. To date there is no established reports and study about the virus hosts, their bi-products, and their role in virus transmission and maintenance even though the virus has been detected from various hosts and ticks. The role of vectors in virus disease spread to human and animals needs to be elucidated in research studies including biological role, epidemiology, seroprevalence of AHFV antibodies in both human and animals and transmission of the virus. An effective preventive measure should be taken by involving both human and veterinary sectors, manager of slaughterhouses, ministry of Agriculture, ministry of health. Additionally, the research and academic institutes should also be included so that an effective vaccines and antiviral therapies can be designed and developed to control and manage the AHFV disease in the Kingdom of Saudi Arabia.

References

1. Abdulhaq A.A., Hershan A.A., Karunamoorthi K., Al-Mekhlafi H.M.: Human Alkhurma hemorrhagic Fever: Emergence, history and epidemiological and clinical profiles. *Saudi J. Biol. Sci.* **29**, 1900–1910 (2022)
2. Alzahrani A.G. & Memish Z.A. et al.: Alkhurma hemorrhagic fever in humans, Najran, Saudi Arabia. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1882–1888 (2010)
3. Andayi F., Charrel R.N., Kieffer A., Richet H., Pastorino B., Leparc-Goffart I., Ahmed A.A., Carrat F., Flahault A., de Lamballerie X.: A sero-epidemiological study of Arboviral fevers in Djibouti, Horn of Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e3299 (2014)
4. Carletti F. & Castilletti C. et al.: Alkhurma hemorrhagic fever in travelers returning from Egypt, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1979–1982 (2010)
5. Charrel R.H., Zaki A.M., Fakeeh M., Yousef A.I., de Chesse R., Attoui H., de Lamballerie X.: Low diversity of Alkhurma hemorrhagic fever virus: Saudi Arabia, 1994–1999. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 683–688 (2005)
6. Charrel R.N., Fagbo S., Moureau G., Alqahtani M.H., Temmam S., de Lamballerie X.: Alkhurma hemorrhagic fever virus in *Ornithodoros savignyi* ticks. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 153–155 (2007)
7. Charrel R.N., Zaki A.M., Attoui H., Fakeeh M., Billoir F., Yousef A.I., de Chesse R., De Micco P., Gould E.A., de Lamballerie X.: Complete coding sequence of the Alkhurma virus, a tick-borne flavivirus causing severe hemorrhagic fever in humans in Saudi Arabia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 455–461 (2001)
8. Horton K.C., Fahmy N.T., Watany N., Zayed A., Mohamed A., Ahmed A.A., Rollin P.E., Dueger E.L.: Crimean congo hemorrhagic fever virus and Alkhurma (Alkhurma) virus in ticks in Djibouti. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **16**, 680–682 (2016)
9. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B.: The most recent report of the ICTV: virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on taxonomy of viruses. *Elsevier*, San Diego (2012)
10. Liebert U.G.: Controversy on virus designation: Alkhurma sive alkhurma hemorrhagic fever flavivirus. *Intervirology*, **55**, 257–258 (2012)

11. Madani T.A.: Alkhurma virus infection, a new viral hemorrhagic fever in Saudi Arabia. *J. Infect.* **51**, 91–97 (2005)
12. Madani T.A.: Abuelzein ETME Alkhurma hemorrhagic fever virus infection. *Arch. Virol.* **166**, 2357–2367 (2021)
13. Madani T.A., Abuelzein T.M., Azhar E.I., Al-Bar H.M., Abu-Araki H., Ksiazek T.G.: Comparison of RT-PCR assay and virus isolation in cell culture for the detection of Alkhurma hemorrhagic fever virus. *J. Med. Virol.* **86**, 1176–1180 (2014)
14. Madani T.A., Abuelzein T.M., Azhar E.I., Al-Bar H.M., Hassan A.M., Ksiazek T.G.: Growth characteristics of Alkhurma hemorrhagic fever virus in mammalian cell lines. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **16**, 722–727 (2016)
15. Madani T.A., Abuelzein T.M., Azhar E.I., Kao M., Al-Bar H.M., Abu-Araki H., Ksiazek T.G.: Superiority of the buffy coat over serum or plasma for the detection of Alkhurma virus RNA using real time RT-PCR. *Arch. Virol.* **157**, 819–823 (2012)
16. Madani T.A., Abuelzein T.M., Bell-Sakyi L., Azhar E.I., Al-Bar H.M., Abu-Araki H., Hassan A.M., Masri B.E., Ksiazek T.G.: Susceptibility of tick cell lines to infection with Alkhurma haemorrhagic fever virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **107**, 806–811 (2013)
17. Madani T.A., Azhar E.I., Abuelzein T.M., Kao M., Al-Bar H.M., Abu-Araki H., Niedrig M., Ksiazek T.G.: Alkhurma (Alkhurma) virus outbreak in Najran, Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *J. Infect.* **62**, 67–76 (2011)
18. Madani T.A. & Azhar E.I. et al.: Complete genome sequencing and genetic characterization of Alkhurma hemorrhagic fever virus isolated from Najran, Saudi Arabia. *Intervirology*, **57**, 300–310 (2014)
19. Madani T.A., Azhar E.I., Abuelzein T.M., Kao M., Al-Bar H.M., Niedrig M., Ksiazek T.G.: Alkhurma, not alkhurma, is the correct name of the new hemorrhagic fever flavivirus identified in Saudi Arabia. *Intervirology*, **55**, 259–260 (2012)
20. Madani T.A., Kao M., Azhar E.I., Abuelzein T.M., Al-Bar H.M., Abu-Araki H. Ksiazek T.G.: Successful propagation of Alkhurma (misnamed as Alkhurma) virus in C6/36 mosquito cells. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **106**, 180–185 (2012)
21. Memish Z.A. & Albarrak A. et al.: Seroprevalence of Alkhurma and other hemorrhagic fever viruses, Saudi Arabia. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 2316–2318 (2011)
22. Memish Z.A., Fagbo S.F., Ali A.O., AlHakeem R., Elnagi F.M., Bangboye E.A.: Is the epidemiology of alkhurma hemorrhagic fever changing? A three-year overview in Saudi Arabia. *PLoS One*, **9**, 1–6 (2014)
23. Musso M., Galati V., Stella M.C., Capone A.: A case of alkhurma virus infection. *J. Clin. Virol.* **66**, 12–14 (2015)
24. Palanisamy N., Akaberi D., Lennerstrand J., Lundkvist A.: Comparative genome analysis of Alkhurma hemorrhagic fever virus with Kyasanur forest disease and tick-borne encephalitis viruses by the in silico approach. *Pathog. Glob. Health.* **112**, 210–226 (2018)
25. Pastorino B.A.M., Peyrefitte C.N., Grandadam M., Thill M.C.E., Toulou H.J., Bessaud M.: Mutagenesis analysis of the NS2B determinants of the Alkhurma virus NS2B-NS3 protease activation. *J. Gen. Virol.* **87**, 3279–3283 (2006)
26. Pletnev A. & Gould E. et al.: Flaviviridae. Virus taxonomy, ninth report of the International Committee on viruses. *Elsevier*, 1003–1020 (2011)
27. Qattan I., Akbar N., Afif H., Abu Azmah S., Al-Khateeb T., Zaki A., Al-Hamdan N., Fontaine R.E.: A novel flavivirus: Makkah Region 1994–1996. *Saudi Epidemiol. Bull.* **3**, 1–3 (1996)
28. Ravanini P., Hasu E., Huhtamo E., Crobu M.G., Ilaria V., Brustia D. Salerno A.M., Vapalahti O.: Rhabdomyolysis and severe muscular weakness in a traveler diagnosed with Alkhurma hemorrhagic fever virus infection. *J. Clin. Virol.* **52**, 254–256 (2011)
29. Ul-Rahman A.: Genetic diversity of Alkhurma hemorrhagic fever virus in Western Asia. *Infect. Genet. Evol.* **70**, 80–83 (2019)
30. Zaki A.M.: Isolation of a flavivirus related to the tick-borne encephalitis complex from human cases in Saudi Arabia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**, 1 (1997)

CRISPR/CAS SYSTEM: AN EFFECTIVE TOOL AGAINST PATHOGENIC DISEASES

Shakira Aslam¹, Ali Umair², Zaid Aslam², Muhammad Zafar Saleem¹, Hamid Bashir^{1*}

¹ Center for Applied Molecular Biology, University of the Punjab, Pakistan

² Mohi-ud-Din Islamic Medical College, Mirpur, AJK, Pakistan

Submitted in November 2022, accepted in December 2022

Abstract: Viral pathogens are major concern nowadays. Bacterial CRISPR/Cas systems help in defending the host body against different pathogens including viruses too. This system contains restriction enzymes that introduce dsDNA breaks on target site to make the virus non-functional by damaging its genes. Coronavirus, HIV and Herpes viruses are causing mortality all around the world. To control the spread of disease, early detection and treatment is required. CRISPR system due to its high efficiency provides a platform to restrict the viral entry into host cell, viral genome editing and eliminate the latent infections. In this review, the CRISPR strategies against three major viral diseases are put under consideration: Coronavirus, Acquired Immunodeficiency Syndrome and Herpesvirus associated diseases. Three CRISPR/Cas systems have been discussed including CRISPR/Cas12, CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cas13 that are used against the above listed viruses.

1. Introduction. 2. CRISPR/Cas system based genome editing. 3. CRISPR/Cas strategy against the viral diseases. 3.1. COVID-19. 3.2. AIDS. 3.3. Herpes Virus. 4. Limitations of CRISPR technology. 5. Conclusion

Keywords: AIDS, ABACAS, COVID-19, CRISPR/Cas system, DETECTR, Herpesvirus, PAC-MAN, SHERLOCK

1. Introduction

A major cause of morbidity and mortality around the world is infectious diseases. One of the major agent responsible for causing emerging infectious diseases is the virus [4]. Many diagnostic and therapeutic approaches have been developed till now for treating the viral diseases. But due to evolution, the genome of viral pathogens changes and in this way the treatment approach used for the same virus previously becomes ineffective.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats) Cas (CRISPR-associated protein) system is natural defense mechanism of bacteria against pathogens. It uses guide RNA for specifically manipulating the specified region of genome. At target site, Cas enzymes introduce dsDNA break. PAM (Protospacer Adjacent Motif) helps in recognition of target site [53]. PAM also helps distinguishing self and non-self-sequences [72]. If any mutation occurs in PAM region the ability of Cas enzyme to work properly will be compromised [54]. In this way, target pathogen will suc-

cessfully escape from immune response of host [7, 53]. CRISPR provides application in introducing foreign DNA into host chromosomes as new spacer [3], this prevents the invasion of same pathogen in future.

There are six types of CRISPR systems. Different Cas proteins with crRNA are used for each class in CRISPR interference [116]. Type-I and type-III CRISPR systems uses complex of multiple Cas proteins for binding of crRNA and degradation of target sequence [106]. Type II CRISPR systems uses only one Cas protein for target recognition and cleavage with different nuclease domains: RuvC or HNH [38, 39, 54]. In Type II CRISPR systems, tracrRNA is small non-coding RNA required for maturation of crRNA [26].

The genes cas1 and cas2 are absent in type IV CRISPR/Cas systems, which are frequently not connected to CRISPR arrays. A significantly reduced large subunit (csf1) and two genes for Receptor Activity-Modifying Proteins (RAMP) from the Cas5 (csf3) and Cas7 (csf2) groups make up effector complex of type IV systems [71]. The presence of single effector protein termed Cas12 is the most important aspect of type V

* Corresponding Author: Hamid Bashir, Center for Applied Molecular Biology, 87-West canal, Bank Road, University of the Punjab, Lahore-53700, Pakistan; e-mail: hamid.camb@pu.edu.pk

© 2023 Shakira Aslam 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/>)

Cite as:

Criscpr/Cas system: an effective tool against pathogenic diseases , Shakira Aslam et al., *Advancements Microbiol.*, 2023, 62, 2, 87–99, DOI: 10.2478/am-2023-0009

CRISPR/Cas system [123]. The active endonuclease Cas12a in type V CRISPR/Cas system is able to perform targeted cleavage without the aid of an additional tracrRNA [127]. In the type VI CRISPR/Cas system, higher Eukaryotes and Prokaryotes nucleotide-binding (HEPN) domains constitute a distinguishing characteristic. It has been concluded that type VI systems are, in terms of substrate recognition, less strict than other types since they only target RNA, which has fewer negative side effects on the cell [16].

CRISPR/Cas system provides platform for genome imaging, editing genomes and epigenetic modulation. This technology allows the study of function of specific genes in disease onset and progression, activation or deactivation of cancer suppressor genes and oncogenes respectively [15, 29, 49, 113]. CRISPR/Cas9 based genome engineering is used for treating different diseases: sickle-cell anemia, viral infections, cancer, cystic fibrosis, muscular dystrophy, genetic, neurodegenerative, cardiovascular, and immunological disorders [5, 45, 70, 101, 120]. In this review CRISPR system application against viral diseases will be discussed. It involves CRISPR system for studying, detecting, and treating AIDS, COVID-19 and Herpes virus. The limitations and challenges of CRISPR/Cas system will also be discussed.

2. CRISPR/Cas system based genome editing

Recognition, cleavage and repair are three steps that make up CRISPR/Cas9 system for editing of genome [74]. Chosen sgRNA drives Cas9 and recognizes target sequence in gene of interest via its crRNA comple-

mentary base pair component. Without sgRNA, Cas9 protein remains dormant. A brief conserved DNA sequence downstream of cut site, PAM is made at a position 3 base pairs upstream from where the Cas9 nuclease generates double-stranded breaks (DSBs) [13]. PAM size varies based on species of bacteria. The Cas9 protein, most popular nuclease in genome editing tools, can identify PAM sequence at 5-NGG-3 (N can be any nucleotide base). When Cas9 locates target site with right PAM, it causes local DNA melting, which is followed by synthesis of an RNA-DNA hybrid. However, process through which Cas9 enzyme melts target DNA sequence is still not fully known. After that, Cas9 protein is activated to begin cleaving DNA. RuvC and HNH domains separate target DNA into its complementary and non-complementary strands, primarily causing blunt-ended double-strand breaks (DSBs). Host cellular machinery then fixes DSB (Fig. 1) [73, 53].

Non-homologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HDR) pathways are used for repairing the DSBs caused due to Cas9 protein in the CRISPR/Cas9 process [68]. NHEJ participates in DSB repair throughout the whole cell cycle by joining DNA fragments via an enzymatic mechanism in external homologous DNA absence. Despite being most common and efficient cellular repair method, it is error-prone and can result in small random insertions or deletions at the cleavage site, which could cause frame shift mutations or premature stop codons [124]. HDR is incredibly precise and needs homologous DNA template usage. The late S and G2 phases of the cell cycle are when it is most active. A significant number of donor (exogenous) DNA templates bearing sequence

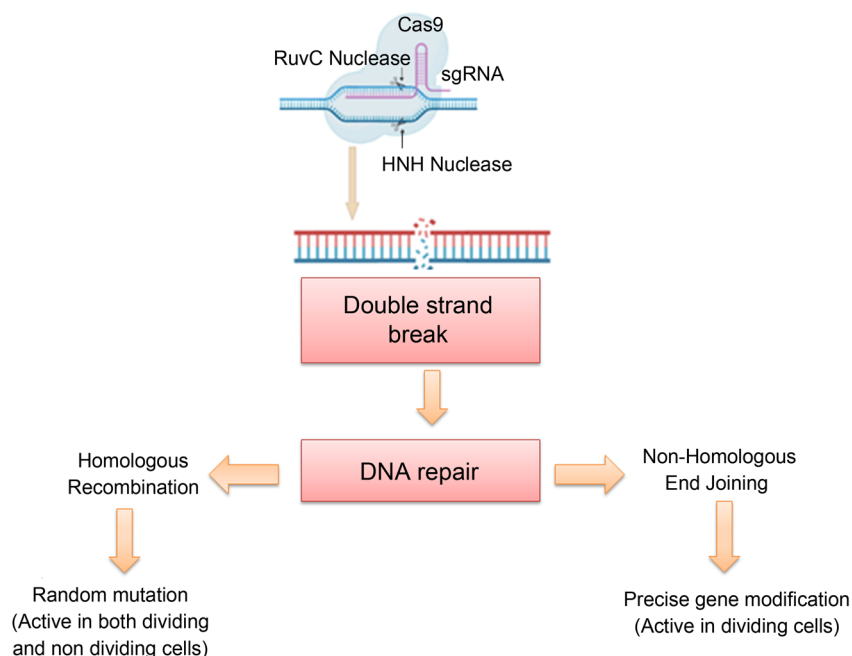


Fig. 1. CRISPR/Cas system mechanism of action

of interest are necessary for HDR in CRISPR gene editing. By inserting donor DNA template with sequence homology at anticipated DSB site, HDR carries out precise gene insertion or replacement [124].

3. CRISPR/Cas strategy against the viral diseases

CRISPR/Cas system provides application in:

1. Restricting viral entry in host: disease is caused only if the virus had got successful entry into host cell. If the receptors responsible for viral entry are modified, then viral entry can be prohibited. CRISPR/Cas9 helps in modification of viral receptors.
2. Editing the genome of virus for make it unable to replicate by introducing mutations in genes.
3. Target the latent infections and helps in their complete removal.

The contributions of CRISPR system against Coronavirus Disease-2019, Acquired Immunodeficiency Syndrome and Herpes virus will be discussed below.

3.1. COVID-19

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) closely resembles SARS-CoV-1 and World Health Organization named the disease as COVID-19 [42] due to its emergence in 2019. It is infection of upper and lower respiratory system. It has an animal origin first reported in Wuhan city of China where 102, 103 people were infected from this virus [14]. The virus spread extensively in the Wuhan region of China and then this disease spread worldwide.

The family of Coronaviruses is Coronavirinae and they are the largest group in Nidovirales [95]. There are four types of corona viruses on basis of their host: α and β (MERS-CoV, SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2) are human pathogens while γ and δ are avian pathogens [132]. Seven coronaviruses have been discovered till now [24, 130] including SARS-CoV-1, MERS-CoV, OC43, 229E, NL63 and HKU1 [102] and seventh one is SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 contains single stranded genomic material (RNA) and is beta-coronavirus [118, 129] which size is approximately 29.9 kb [35]. Its genome encodes 16 nonstructural, 4 structural and 5 to 8 accessory proteins [118]. It contains replicase genes which encodes essential proteins [99, 105, 117] for nucleocapsid formation, viral replication, and spikes formation [24, 99, 105, 117]. Coronavirus spike proteins identifies ACE2 receptor in host and binds to it [25] and helps in fusing virus & host cell plasma membrane [97]. SARS-CoV-2 then enters the cell by endocytosis [61, 114] & releases its genetic material to be translated by host machinery and produces new viral particles [86].

CRISPR/Cas system against COVID-19

Coronaviruses are involved in respiratory diseases containing RNA as genetic material [67]. Therapies, drugs, and vaccines discovered to cure coronavirus focus on the inhibition of virus entry in cells [87]. Many diagnostic techniques are also developed but they have low accuracy & efficiency. CRISPR system on the other hand identifies and degrades the genome of virus and diagnoses the virus with higher efficiency. COVID-19 can be detected via CRISPR based technologies including: SHERLOCK, DETECTR and CREST [32]. CRISPR system also provides therapeutic approaches for COVID-19 targeting different regions of Coronavirus genome.

CRISPR based restriction of viral entry into host cell

The cells which contain ACE2 on their surface are highly targeted by SARS-CoV-2. ACE2 high expression is on kidney, lungs, and heart cells surface [28]. ACE2 helps in maintaining blood pressure [98]. It can be made target for preventing entry of SARS-CoV-2 into host cell but in such a way that its function is not disturbed. For this purpose, only its binding domain can be edited by use of CRISPR.

In-silico study, Pedro Tanaka et al. evaluated the impact of replacing particular residues of amino acid in ACE2 alpha-helix, which are important in SARS-CoV-2 viral binding, using techniques for protein modeling. To interact with the virus, they created a CRISPR/Cas9 model system that destabilizes a portion of the ACE2 protein (N-terminal alpha-helix amino acid residues Phe28, Lys31 and Tyr41). The destabilizing effect of the edited alterations preserved the helicoidally structure at the ACE2 side while weakening interface connection between SARS-CoV-2 S protein and ACE2 alpha-helix [104]. Most important amino acid residues for ACE2 catalytic action, Arg273, His505, His345, Arg169, Arg514, and Tyr515, are preserved while also maintaining the structural shape of this system [44].

PAC-MAN strategy for treating COVID-19

PAC-MAN is a therapy for treating coronavirus based on CRISPR technology developed by Abbott et al. [1, 122]. PAC-MAN reorients Cas13d system capacity to cut RNA of coronavirus in humans and thus inhibiting its life cycle. This CRISPR/Cas13d system is extracted from *Ruminococcus flavefaciens* XPD3002 [60]. Cas13d calls up crRNAs containing 22 nucleotides-spacer seq. crRNA helps the Cas13d proteins in degrading the target viral genome [11, 39, 54]. Cas13d PAC-MAN strategy minimizes the replication and expression of coronavirus by its action of cleaving SARS-CoV-2 RNA genome. It thus results in degradation of viral mRNAs that can produce viral essential proteins [94] (Fig. 2).

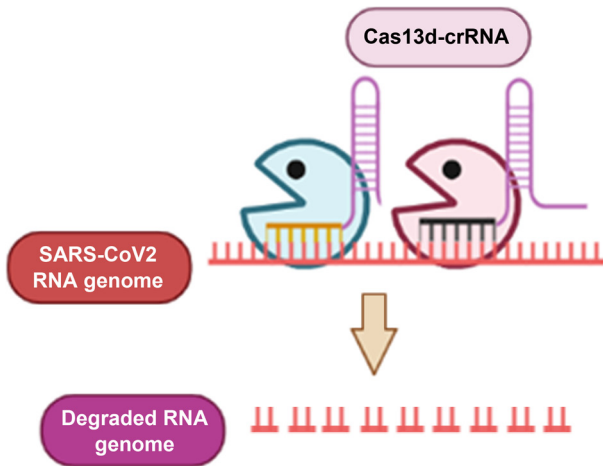


Fig. 2. Anti-SARS-CoV-2 effect produced by CRISPR/Cas13d that inhibits the replication of virus by crRNA-guided viral mRNA and genome degradation

Abbott et al. reported two conserved regions in SARS-CoV-2 important for its functioning and replication: Nucleocapsid and RdRP genes [1]. They target these genes and constructed crRNA library. They tested 40 designed crRNAs on human lung epithelial A549 cells. For this purpose, proteins of SARS-CoV-2 were tagged with fluorescent reporter genes and then transfected them to lung epithelial cells under study along with crRNA and Cas13d. They reported that many crRNA effectively worked in reducing the formation of mRNA from RdRP and nucleocapsid genes with 85% and 70% reduced GFP signal, respectively [1].

Coronavirus NSP1 to NSP16 proteins can be targeted by CRISPR/Cas13 in treatment. Polyprotein encoding ORF1a/b plays role in pathogenesis of SARS-

CoV-2 could be a target for CRISPR. gRNA have been designed for targeting the regions of ORF1a/b coding peptides [1, 79].

In treating the COVID-19 pandemic, the suggested CRISPR-based antiviral medicines show considerable promise. However, the justification for the effective use of antiviral CRISPR therapeutics in humans is solely based on an in vitro trial. However, the main obstacle preventing clinical use is the transport of CRISPR components into patients. Even though current delivery techniques like polymer-based, liposomal, and adeno-associated virus (AAV) vectors seem doable, they are only somewhat effective [111]. Engineering Cas13 nuclease so that it can adhere to viral particles and deliver CRISPR components along with virus into host cell is one possible method to achieve selective and effective delivery. Once virus, that possesses its own shredding machinery (CRISPR/Cas), reaches cell, the CRISPR system can quickly target viral RNA and cleave it before Viral RNA is replicated or translated. Ironically, the virus itself may be employed to help distribute information selectively and effectively [76].

ABACAS

ABACAS is therapeutic strategy against virus in which Cas13 fuse with specific AB (antibody) of S protein of SARS-CoV-2 helping in delivery of Cas13 in infected cells. Detection of SARS-CoV-2 S-protein could be made by using ABACAS fused antibody that helps in delivery of virus along with Cas13 in cells being infected [56, 125]. RNA of virus is degraded when it is exposed to ABACAS in infected cell (Fig. 3). In this way off-tissue effects are reduced by this approach due to target deliv-

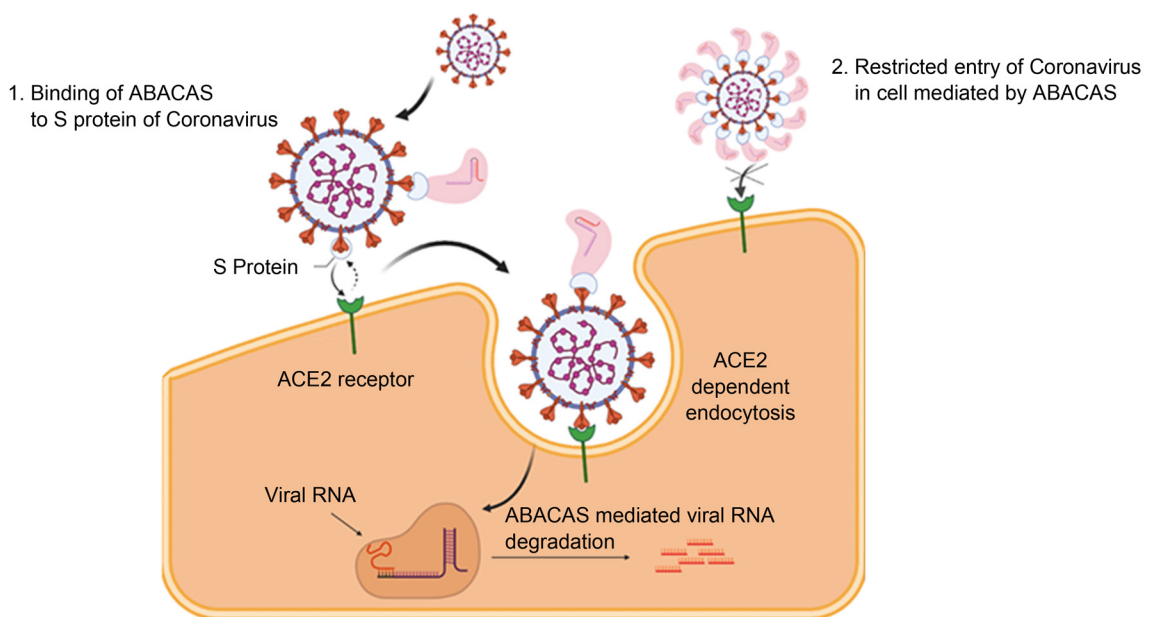


Fig. 3. Mechanism of ABACAS strategy. ABACAS strategy captures S protein of Coronavirus and successfully delivers the components of CRISPR into infected cells. CRISPR components then attack viral RNA and degrade it. This strategy also helps in preventing viral entry into cell

ery by virus. CR3022, LY-COV555 and REGN-COV2 are ideal for ABACAS development because they bind SARS-CoV-2 S protein tightly. The efficiency of CR3022 was tested on 293F cell lines by Joyce et al. [56].

SHERLOCK

SHERLOCK (Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) is FDA approved detection method [40] introduced to detect COVID-19 with sensitivity of 10–100 copies/ μ l of input [128]. This technique is based on CRISPR Cas13 of type VI. It includes combined action of RT-RPA and Cas13a nuclease activity [41]. crRNA-Cas13a complex bind & then cleave specific target (RNA) along with non-target fluorescent reporter coupled RNA. As a result of cleavage fluorescence is produced that enables real time & rapid virus detection [119].

CREST

CREST (Cas13-based, rugged, equitable, scalable testing), developed by Rauch et al. is used for SARS-CoV-2 detection. This involves utilizing Cas13 detection along with PCR, transcription, and then final detection of positive results by using fluorescence detector. It targets viral RNA with LOD 10 copies/ μ l [88].

DETECTR

Cas12 based DETECTR (DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter) detects SARS-CoV-2. It also uses RNA sample of patient. Its principle is based on RT-LAMP [82], that amplifies RNA in sample extracted from oropharyngeal or nasopharyngeal. Reporter molecule cleaves from the target coronavirus sequence followed by its recognition by Cas12. The target is then cleaved by Cas12. The overall procedure takes half an hour for completion. In this time, RT-LAMP reaction takes 20 minutes at 62°C temperature followed by Cas12 detection requiring 10 min at 37°C and final visualized or detection of virus on dipstick. Detection of Nucleoprotein and Envelope protein genes is required for positive test output to confirm infection caused by SARS-CoV-2. Detection limit for DETECTR is 10 copies/ μ l [10].

3.2. AIDS

AIDS is an immune system suppressing disease caused by Human Immunodeficiency Virus infections [9] transmitted by vertical transmission, sex, and intravenous injections [23, 46].

HIV-1 & HIV-2 are two types of HIV, causing AIDS, having numerous similar characteristics [81]. Pathogenicity and transmissibility of HIV-2 is less in comparison to HIV-1. The RNA genomic size of HIV-1 is 9.8 kb. LTRs present at the edges of genome are respon-

sible for coding viral proteins functional in viral replication and invasion: gag, vif, pol, vpr, env, rev, vif, tat, ASP and nef [12, 69].

HIV-1 invades immune cells, and its receptor is CD4 on which it binds with the help of gp120 envelope protein. CCR5 or CXCR4 are the co-receptors with which virus interacts in progressing disease. Main target host cells are monocytes, astrocytes, dendritic cells, T cells, microglial cells and macrophages. Viral life cycle is intricate due to which it is difficult to eliminate virus completely (Fig. 2). Active and latent infections are caused because of entry of HIV-1 [17]. In case of active infection, provirus keeps on replicating and host cell buds to produce progeny virions.

Latent infections are arbitrated by environment of chromatin [37], integration sites of HIV-1 provirus [103], RNA interference [92] and transcription factors [63]. As a result of latent infection reservoirs of resting infected astrocytes [77], microglial cells [78], T helper cells [21] and macrophages [98] are formed. It is difficult for antiviral drugs to reach these reservoirs which are in brains [36], gastro-intestinal tracts and lymphoid tissues [21].

CRISPR/Cas system based therapeutic & diagnostic approach against AIDS

HAART is used for treating AIDS inhibiting replication of Human Immunodeficiency Virus [96]. Highly active antiretroviral therapy (HAART) is medical regimen used for treatment and control of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). It contains a variety of drugs from the antiretroviral groups [33]. Although latent viral reservoirs can be reduced in number by highly active antiretroviral therapy (HAART), they cannot be completely eliminated in HIV-1/AIDS patients. With the potential to treat HIV-1/AIDS, the CRISPR/Cas9 system has just been developed. To diminish HIV-1 infection and eradicate the provirus, it could be used to target cellular co-factors or the HIV-1 genome. It can also be employed to promote transcriptional activation of latent virus in latent viral reservoirs for eradication. [71, 51]. CRISPR technology is being used for inactivating viral genome by gRNAs with specific viral genes or LTR promoter site as a target [131].

To test the effectiveness of lentivirus-mediated intravenous delivery of CRISPR in editing HIV-1 genome from circulating peripheral blood mononuclear cell engrafts, Bella et al. used the NRG mouse model, which has multiple immunodeficiencies that are primarily caused by the absence of T, B, and NK cells [84]. Targeted area of the viral genome, which was located inside the HIV-1 LTR, was excised from human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) placed in NRG mice spleens via lentivirus-mediated delivery of a multiplex of guide RNAs and Cas9 endonuclease. After being treated

with lentiviral vectors producing Cas9 and gRNAs, Sanger sequence analysis of the viral DNA confirmed the editing and removal of the proviral DNA fragment from the viral genome at the expected places [6].

CRISPR based restriction of viral entry into host cell

To eliminate host cell permeability to be infected by HIV-1, its receptors are targeted by CRISPR. Cocchi et al. reported that the viral entry can be prohibited by blocking or altering the receptors responsible for HIV-1 entry into host cell that are CD4 receptor and two co-receptors: CXCR4 & CCR5. We cannot alter CD4 receptor because it plays a necessary role in immune system but co-receptors can be edited. CRISPR/Cas9 has been widely used in disrupting CCR5 and CXCR4 expression. Cho et al. reported that CRISPR/Cas9 could be used to silence CCR5 receptor gene in HEK-293 T-cells by transfecting sgRNAs and Cas9 [20]. Biti et al. stated that if a person has missing homozygous 32 base pair in gene of CCR5 (CCR5132) shows a natural resistance against R5-tropic HIV-1 [8]. When CCR5 is being inactivated by CRISPR the viral envelope is susceptible to mutation that will result in shift of the usage of viral receptor from CCR5 to CXCR4 [34, 109].

Li et al. disrupted CCR5 expression by combining sgRNAs that target the fourth exon of CCR5 with adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. In TZM-BL cells, two particular sgRNAs can generate more than 60% cutting efficiency. The outcomes were also confirmed in human T cell lines and Chinese hamster ovary (CHO) cell lines. Finally, they delivered the CRISPR/Cas9 system to human CD4+ T cells using a chimeric Ad5/F35 adenovirus vector in order to mute CCR5 expression, which protected cells from HIV-1 infection with high efficiency and little off-target consequences [64]. Meanwhile, numerous studies have documented CRISPR/Cas9-induced CXCR4 gene disruption. With the use of two sgRNAs that selectively target conserved CXCR4 regions and CRISPR/Cas9 supplied by lentivirus, Hou

et al. successfully disrupted CXCR4 expression in human CD4+ T cells and rhesus macaque CD4+ T cells [101]. The CXCR4 [48] co-receptor or other replication factors of virus can be targeted by CRISPR strategy [52, 83].

CRISPR based genome editing virus

Ebina et al. used CRISPR technology for HIV-1 infection prevention for the first time in 2013. They used CRISPR for setting viral LTRs as target and thus suppressing the gene expression in cell line of immortalized T lymphocytes [31]. They used CRISPR/Cas9 to inhibit Human Immunodeficiency Virus-1 provirus replication and transcription. For this purpose, they targeted the NF- κ B binding cassettes in TAR sequence of R region and LTR sequence of U3 region [31].

Hu et al. worked to remove genome of HIV-1 by using CRISPR/Cas9 technology in 2014. Cas9-gRNA was used by Hu et al. for targeting the conserved spots in HIV-1 LTR U3 region with no off-target editing and small geno-toxicity. They inactivated the replication and gene expression of virus in cell lines that were latently infected by HIV-1. The studied cell lines include microglial, pro-monocytic and T cell line [50].

In the past few years, CRISPR/Cas9 technology has been widely used in HIV/AIDS research employing experimental, laboratory-adapted HIV-1 strains due to its simple, high-efficiency, and limited off-target effect properties [30]. CRISPR/Cas9 systems are used for effective elimination of HIV-1 proviruses by targeting the viral genomic regions like: LTR region and several genes and proteins (Rev, Pol, Env, and Gag). Some of the studies based on the targeted viral regions for the elimination of HIV-1 by targeted delivery of CRISPR system via transfection and lentiviruses are explained in Table I.

Targeting latent infections by CRISPR system

CRISPR/Cas9 strategy was used to target provirus LTR in infected (HIV-1) T cell lines and then treating it with TNF- α [131]. Sequencing showed that target sites

Table I
CRISPR/Cas systems for elimination and targeting HIV-1 provirus

CRISPR-Cas system used	Delivery method for CRISPR components	Targeted regions	Cell line or organism studied	Targeted locus	Efficiency	References
SpCas9	Transfection	LTR (U3 region)	293T, Jurkat & HeLa	465–484	30–90%	[104]
SpCas9	Transfection	LTR (U3 region)	CHME5, TZM-BI, & U937	101–127 312–341	30–90%	[105]
SpCas9	Lentivirus	LTR (R region)	293T-CD4-CCR5, hPSC, & 293 Primary T cells	464–486 485–507	20–90%	[107]
SpCas9	Transfection	Rev (the second exon)	JLat10.6	8513–8532	30%	[93]
SpCas9	Lentivirus	Gag/ Pol/ Rev/ Env	SupT1	2249–2277 8497–8525	30–90%	[135]
SpCas9	Lentivirus	LTR (U3 and R region)	J.Lat FL & SupT1	300–408 463–482	35–98%	[108]

were mutated that causes the lowered replication and expression of virus [131].

When various sites of Human Immunodeficiency Virus-1 genome is targeted then deletion and interference of un-integrated part of proviral genome can be increased by using CRISPR technology [66]. When using two sgRNAs together for targeting various genomic regions of HIV-1, the escape and replication of virus can be prevented [62].

Wang G et al. reported that CRISPR editing by sgRNA causes the target site mutations in HIV-1 provirus resulting in its inactivation [126]. Although sgRNA causes inactivation of viral genes but some viruses escape from being cleaved by sgRNA. These viruses can be made less infectious by using CRISPR/Cas9 approach [62]. In presence of specific stimuli, the resting HIV-1 infected cells will become activated and undergo replication and starts infecting the neighboring cells. This will cause the re-formation of latent reservoirs and thus these reservoirs are the most important challenge for potent cure of AIDS.

The mutations caused by CRISPR/Cas9 differs from that of antiviral drugs [110]. Targets of CRISPR system in viral genome, which were poorly conserved showed insertions or deletions by action of Cas9 while substitutions were observed in highly conserved regions. gRNA directs the Cas9 to target site on HIV DNA. Upon recognition Cas9 introduces dsDNA break at distance of three nucleotides from PAM. HIV DNA will then be repaired by host cell DNA repair mechanisms that results in mutations: nucleotide deletion, insertion, or substitutions at the site where Cas9 has cleaved. These mutations can either activate or inactivate the viral replication. Sometimes these mutations result in preventing recognition of HIV DNA by gRNA and virus will escape from the treatment [65].

3.3. Herpes Virus

Herpesviridae is a virus family that includes DNA viruses infecting birds, reptiles, and mammals. They are also capable of causing latent infections. There are three families of herpes viruses on basis of the sequence and organization of their genome: α , β , and γ herpes viruses. There are eight Herpes viruses that infect humans including: HSV-1, HSV-2, VZV, HCMV, HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, EBV, and KSHV [108]. Their genetic material constitutes linear dsDNA having sequence of 125 to 295 kilo base pairs. When linear DNA of herpes virus enters nucleus of host it becomes circularized [85]. Genome of Herpesvirus encode approximately 70 to 200 ORF [100].

Latent infection development in permissive cells is one of the characteristics of these viruses. Viruses are

difficult to be detected by immune system of host during resting stage because protein expression of virus is prohibited during latency [43]. When the resting virus got signals, they start replication again. HSV-1 causes herpes simplex keratitis, cold sores and corneal blindness while HSV-2 causes genital ulcers [91].

CRISPR based strategy against Herpesvirus

Herpes viruses cause many diseases and some of them lack symptoms. For treating the Herpesvirus-based diseases treatments involve using nucleoside analogs. These analogs can limit the replication of virus by restricting the activity of polymerase [75] but due to negligible effectiveness against latent viruses [22] they are to be replaced by some effective treatment strategies. Along with these issues' viruses develop nucleoside analog resistance, such as against ganciclovir and acyclovir [22]. CRISPR/Cas9 is effective in providing protection to cell against infection and removing latent virus from the infected cell. This technology is also easy to use. It also allows the formation of mutant herpes virus to treat existing ones [93, 121]

CRISPR/Cas9 system for Herpesvirus-Host interaction studies

CRISPR/Cas9 is used in studying the role of different factors involved in controlling viral progression. Human antiviral factor IFI-16 binds DNA of virus and facilitates the antiviral response [27]. IFI-16 plays role in regulating induction and transcription of IFN- β . Diner BA et al and Johnson KE et al used CRISPR/Cas9 for determining IFI-16 role in HSV infection control. They generated IFI-16 knockouts [27, 55]. They reported that IFI-16 lowers gene expression of HSV-1 and prevent the attachment of transcription factors with promoters of HSV-1. Thus, ultimate result is the inhibition of viral replication and it might have played role in modification of histone [27, 55].

Anti HSV gRNAs against Herpesvirus

Besides editing the viral genome and constructing mutants of virus, CRISPR provides therapeutic approaches too to kill HSV within host body. anti-HSV gRNAs for targeting viral genome can cause change in specific genes making it non-functional. PC Roehm et al. and Van Diemen et al. reported in their studies that anti-HSV-1 sgRNAs can restrict the replication of virus in both human & non-human cell lines [90, 108]. PC Roehm et al. performed tests on human oligodendrogloma cells to check the effectiveness of anti-ICP0 sgRNAs that were designed by them against HSV-1. ICP0 is a viral protein responsible for viral replication and gene expression. They reported that these gRNAs had effectively reduced the viral replication lowering the load of HSV-1 to ~ 10-folds [90].

Multiple gRNAs strategy and latent Herpesvirus

Van Diemen et al. used CRISPR/Cas9 lentiviruses for inhibition of HSV-1 replication in cells of human lung fibroblast (MRC5). When one gRNA was used for inhibition of viral replication, viral titer lowered up to 4-log but resistant virus outgrowth was still present. Mutations were displayed at target site of gRNA by variants that results in making these variants resistant to be edited by CRISPR/Cas9. But if two gRNAs are used instead of one, multiple sites of viral genes can be targeted. In this way the chances of virus to become resistant is reduced resulting in complete removal of viral particles [107].

When the genome of HSV-1 is in its resting state in MRC5 infected cells, Van Diemen et al. reported that CRISPR/Cas9 was unable to target their genome while it targeted the genomes of viruses that produced from the re-activated HSV-1. They concluded that Cas9 activity might be interfered by resting genome of HSV-1 [107]. Latent genomes of HSV-1 are in inactivated state having close association with nucleosome [80]; nucleosome presence inhibits the binding and functioning of Cas9 at target site [19, 47].

Herpes viruses enter the cell and its dsDNA serve as target for CRISPR/Cas9. sgRNA induces viral gene disruption while multiple gRNAs result in viral genome fragmentation. If repair template is present, then mutation is inserted in herpes virus (Fig. 4).

Replication of herpes virus in lytic and latent infection is reduced by using CRISPR/Cas9 as reported by Diemen et al [107]. They determined efficiency of CRISPR against HSV, EBV, and HCMV. They designed sgRNAs for targeting EBV latent and lytic infection. Viral miR-BART6, smiR-BART5, and miR-BART16

were set as target of designed sgRNAs for models with latent infections. Transduction of gastric carcinoma cells latently infected by EBV was made to check the efficacy of CRISPR/Cas9 based sgRNAs. Viral EBNA1 and EBV Ori were set as target of designed sgRNAs for models with latent infections. In this way they successfully edited and downregulated the miRNAs, antigens, and Ori under study. In the same way, gene editing by CRISPR showed viral infections suppression [107].

Wang and Quake designed sgRNAs for targeting specific genomic regions of EBV that are responsible for transformation, structure, and latency of virus. They used this designed CRISPR/Cas9 strategy to treat EBV latently infected cells derived from patients. They successfully removed genome of EBV and decreased load of virus in quarter and half of cell respectively [115].

EBV genome EBNA1, W repeats and OriP regions were targeted by Yuen et al. sRNAs were designed by them. Copy number of EBV genome was reduced up to 50%. EBV latent infected cells were not affected by this suppression but it produced effect in other infected cells [126].

4. Limitations of CRISPR technology

The features of CRISPR/Cas enable its use in diagnostic and therapeutic. Tools of CRISPR as are no doubt simple to use, efficient and cheap as compared to other gene editing technologies but there are some limitations too (Fig. 5).

With its advantages of being safe, effective, and straightforward to utilize, CRISPR/Cas9 technology has been widely applied to cure human disorders such

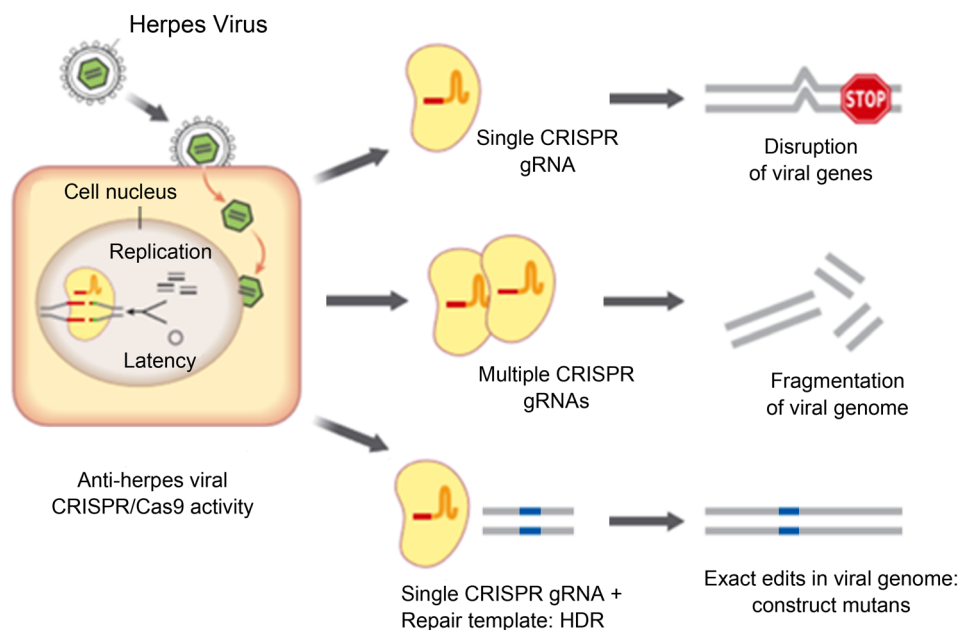


Fig. 4. CRISPR-Cas strategy against herpes virus [108]

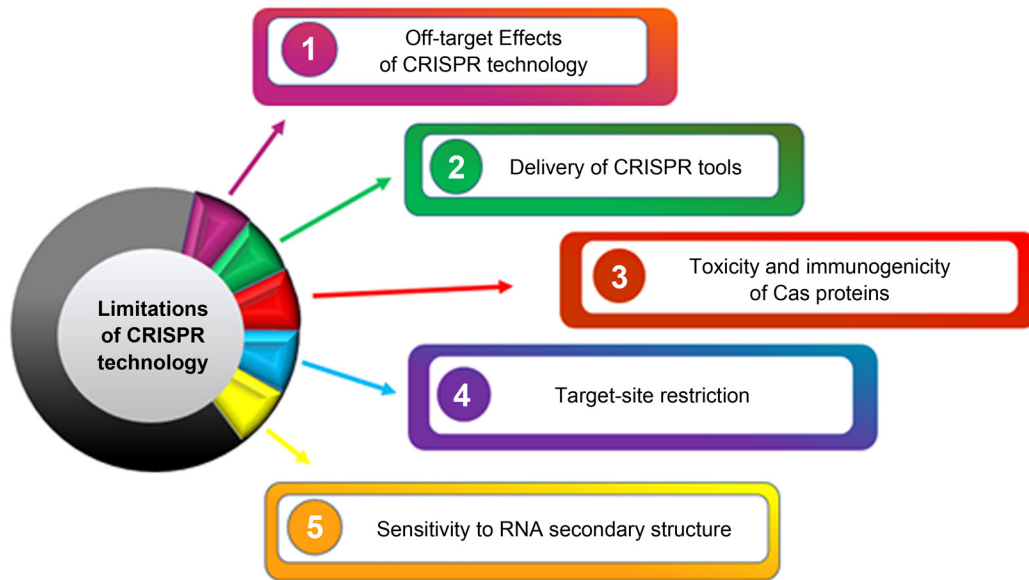


Fig. 5. Limitations of CRISPR/Cas

as Parkinson's disease (PD) Duchenne muscular dystrophy (DMD) and HIV/AIDS [18]. However, various restrictions must be taken into account while planning clinical trials. Potential off-target effects, which could result in significant gene changes and chromosomal translocations, are a big worry [59]. By using ChIP-seq, some researchers demonstrated that the off-target cleavage caused by Cas9 was significantly less than that caused by ZFNs, TALENs, and homing endonucleases [30]. By putting the Cas9 gene under the control of a minimum HIV-1 promoter, which is activated by viral transcriptional activator Tat, Kaminski et al. modified the CRISPR/Cas9 system. With this method, Cas9-expressing HIV-1 infectious cells are created, while difficulties brought on by unnecessarily high Cas9 expression in cells are diminished [58]. If not, the off-target effects can be reduced by directly delivering Cas9 RNPs rather than expressing plasmid in target cells. RNP treatment has been demonstrated to cause cytotoxicity in cells by inducing innate immune responses in some types of cells. Inhibiting innate immune responses and reducing cell mortality can be accomplished by chemically creating sgRNA and using phosphatase to remove its 5'-ppp [58].

How to successfully transfer this big complex into cells that are HIV-1-infected is still another significant hurdle in the application of CRISPR/Cas9. Adenoviral, lentiviral, and adeno-associated viral vectors are the main delivery vehicles, according to prior publications [112]. Since adenoviral vectors can incorporate large DNA fragments and their immunogenic effects in clinical trials have improved, they can be employed in a variety of CRISPR/Cas9 systems. However, production of recombinant adenoviral vectors may still be a significant drawback [2].

5. Conclusion

Traditional therapies used to treat viral diseases focus on boosting the immune response of the patient. So that their immune system can determine the viral proteins and prohibit them from entering the cells and controlling the spread of disease. CRISPR/Cas9/12/13 systems serve as a potential tool against the viral pathogens. They introduce dsDNA breaks followed by its repairing and editing through host repair machinery. CRISPR systems are new in therapeutics and got attention after its first usage in 2013 by Ebina et al. [31]. When combined with other treatment strategies it increases treatment efficiencies. When pathogenic viruses are studied, viruses of Coronaviridae, Retroviridae and Herpesviridae family are said to be belonged to highly lethal ones. These viruses are targeted by CRISPR/Cas13/9/12 that inhibits the viral proteins and ORF. Among them it also provides platform to study new viruses, their pathogenicity, and treatments for their infections. Where there are advantages of CRISPR systems it has some challenges including its safe delivery into host body and less effectivity due to some viral proteins.

References

1. Abbott T.R. & Dhamdhare G. et al.: Development of CRISPR as an antiviral strategy to combat SARS-CoV-2 and influenza. *Cell*, **181**, 865–876 (2020)
2. Afkhami S., Yao Y., Xing Z.: Methods and clinical development of adenovirus-vectored vaccines against mucosal pathogens. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **3**, 16030 (2016)
3. Amitai G., Sorek R.: CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 67 (2016)

4. Artika I.M., Wiyatno A., Ma'roef C.N.: Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. *Infect. Genet. Evol.* **81**, 104215 (2020)
5. Barrangou R., Doudna J.A.: Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat. Biotechnol.* **34**, 933–941 (2016)
6. Bella R. & Kaminski R. et al.: Removal of HIV DNA by CRISPR from Patient Blood Engrafts in Humanized Mice. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **12**, 275–282 (2018)
7. Bikard D., Hatoum-Aslan A., Mucida D., Marraffini L.A.: CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during in vivo bacterial infection. *Cell Host Microbe*, **12**, 177–186 (2012)
8. Biti R., Ffrench R., Young J., Bennets B., Stewart G., Liang T.: HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nature med.* **3**, 252–253 (1997)
9. Bowers N.L., Helton E.S., Huijbregts R.P., Goepfert P.A., Heath S.L., Hel Z.: Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS Pathog.* **10**, e1003993 (2014)
10. Broughton J.P., Deng X., Yu G., Fasching C.L., Servellita V., Singh J., Miao X., Streithorst J.A., Granados A., Sotomayor-Gonzalez A.: CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat. Biotechnol.* **38**, 870–874 (2020)
11. Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slijkhuys R.J., Snijders A.P., Dickman M.J., Makarova K.S., Koonin E.V.: Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, **321**, 960–964 (2008)
12. Cassan E., Arigon-Chifolleau A.M., Mesnard J.M., Gross A., Gascuel O.: Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 11537–11542 (2016)
13. Ceasar S.A., Rajan V., Prykhozhiy S.V., Berman J.N., Ignacimuthu S.: Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. *Biochem. Biophys. Acta*, **1863**, 2333–2344 (2016)
14. Center C.R.: Center for Systems Science and Engineering, Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. *COVID-19 Dashboard*, <https://coronavirus.jhu.edu/map.html> (2022)
15. Charpentier E., Marraffini L.A.: Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering. *Curr. Opin. Microbiol.* **19**, 114–119 (2014)
16. Chaudhuri A., Halder K., Datta A.: Classification of CRISPR/Cas system and its application in tomato breeding. *Theor. Appl. Genet.* **135**, 367–387 (2022)
17. Chavez L., Calvanese V., Verdin E.: HIV latency is established directly and early in both resting and activated primary CD4 T cells. *PLoS Pathog.* **11**, e1004955 (2015)
18. Chen S., Yu X., Guo D.: CRISPR-Cas targeting of host genes as an antiviral strategy. *Viruses*, **10**, 40 (2018)
19. Chen X., Rinsma M., Janssen J.M., Liu J., Maggio I., Gonçalves M.A.: Probing the impact of chromatin conformation on genome editing tools. *Nucleic Acids Res.* **44**, 6482–6492 (2016)
20. Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.S.: Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat. Biotechnol.* **31**, 230–232 (2013)
21. Chun T.W., Nickle D.C., Justement J.S., Meyers J.H., Roby G., Hallahan C.W., Kottitil S., Moir S., Mican J.M., Mullins J.I.: Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* **197**, 714–720 (2008)
22. Coen D.M., Schaffer P.A.: Antitherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 278–288 (2003)
23. Cohen M.S., Shaw G.M., McMichael A.J., Haynes B.F.: Acute HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1943–1954 (2011)
24. Cui J., Li F., Shi Z.L.: Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 181–192 (2019)
25. De Wit E., Van Doremalen N., Falzarano D., Munster V.J.: SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 523 (2016)
26. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E.: CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, **471**, 602–607 (2011)
27. Diner B.A., Lum K.K., Toettcher J.E., Cristea I.M.: Viral DNA sensors IFI16 and cyclic GMP-AMP synthase possess distinct functions in regulating viral gene expression, immune defenses, and apoptotic responses during herpesvirus infection. *MBio*, **7**, e01553 (2016)
28. Donoghue M., Hsieh F., Baronas E., Godbout K., Gosselin M., Stagliano N., Donovan M., Woolf B., Robison K., Jeyaseelan R.: A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *Circ. Res.* **87**, 1–9 (2000)
29. Doudna J.A., Charpentier E.: The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, **346**, 6213 (2014)
30. Duan J., Lu G., Xie Z., Lou M., Luo J., Guo L., Zhang Y.: Genome-wide identification of CRISPR/Cas9 off-targets in human genome. *Cell res.* **24**, 1009–1012 (2014)
31. Ebina H., Misawa N., Kanemura Y., Koyanagi Y.: Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.* **3**, 1–7 (2013)
32. Ebrahimi S., Khanbabaei H., Abbasi S., Fani M., Soltani S., Zandi M., Najafimemar Z.: CRISPR-Cas System: A Promising Diagnostic Tool for Covid-19. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* **14**, 3–9 (2022)
33. Eggleton J.S., Nagalli S.: Highly active antiretroviral therapy (HAART). *StatPearls*, **4** (2020)
34. Fätkenheuer G., Nelson M., Lazzarin A., Konourina I., Hoepelman A.I., Lampiris H., Hirschel B., Tebas P., Raffi F., Trottier B.: Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1442–1455 (2008)
35. Fehr A.R., Perlman S.: Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* **1282**, 1–23 (2015)
36. Fischer-Smith T., Croul S., Sverstiuk A.E., Capini C., L'Heureux D., Régulier E.G., Richardson M.W., Amini S., Morgello S., Khalili K.: CNS invasion by CD14⁺/CD16⁺ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection. *J. Neuro Virology*, **7**, 528–541 (2001)
37. Gallastegui E., Millán-Zambrano G., Terme J.M., Chávez S., Jordan A.: Chromatin reassembly factors are involved in transcriptional interference promoting HIV latency. *J. Virol.* **85**, 3187–3202 (2011)
38. Garneau J.E., Dupuis M.-È., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadán A.H., Moineau S.: The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, **468**, 67–71 (2010)
39. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V.: Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, e2579 (2012)
40. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., Joung J., Collins J.J., Zhang F.: Multiplexed and portable nucleic acid detection platform with Cas13, Cas12a, and Csm6. *Science*, **360**, 439–444 (2018)
41. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W., Essletzbichler P., Dy A.J., Joung J., Verdine V., Donghia N., Daringer N.M., Freije C.A.: Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, **356**, 438–442 (2017)

42. Gorbalenya A.E. & Baker S.C. et al.: The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* **5**, 536 (2020)
43. Griffin B.D., Verweij M.C., Wiertz E.J.: Herpesviruses and immunity: the art of evasion. *Vet. Microbiol.* **143**, 89–100 (2010)
44. Guy J.L., Jackson R.M., Jensen H.A., Hooper N.M., Turner A.J.: Identification of critical active-site residues in angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* **272**, 3512 (2005)
45. Heidenreich M., Zhang F.: Applications of CRISPR-Cas systems in neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 36 (2016)
46. Hladik F., McElrath M.J.: Setting the stage: host invasion by HIV. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 447–457 (2008)
47. Horlbeck M.A., Witkowsky L.B., Guglielmi B., Replogle J.M., Gilbert L.A., Villalta J.E., Torigoe S.E., Tjian R., Weissman J.S.: Nucleosomes impede Cas9 access to DNA *in vivo* and *in vitro*. *Elife*, **5**, e12677 (2016)
48. Hou P., Chen S., Wang S., Yu X., Chen Y., Jiang M., Zhuang K., Ho W., Hou W., Huang J.: Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci. Rep.* **5**, 1–12 (2015)
49. Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F.: Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, **157**, 1262–1278 (2014)
50. Hu W., Kaminski R., Yang F., Zhang Y., Cosentino L., Li F., Luo B., Alvarez-Carbonell D., Garcia-Mesa Y., Karn J.: RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 11461–11466 (2014)
51. Huang S.H. & Ren Y. et al.: Latent HIV reservoirs exhibit inherent resistance to elimination by CD8+ T cells. *J. Clin. Invest.* **128**, 876–889 (2018)
52. Hultquist J.F., Schumann K., Woo J.M., Manganaro L., McGregor M.J., Doudna J., Simon V., Krogan N.J., Marson A.: A Cas9 ribonucleoprotein platform for functional genetic studies of HIV-host interactions in primary human T cells. *Cell rep.* **17**, 1438–1452 (2016)
53. Jiang F., Doudna J.A.: CRISPR/Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529 (2017)
54. Jiang W., Bikard D., Cox D., Zhang F., Marraffini L.A.: RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* **31**, 233–239 (2013)
55. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E.: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337**, 816–821 (2012)
56. Johnson K.E., Bottero V., Flaherty S., Dutta S., Singh V.V., Chandran B.: IFI16 restricts HSV-1 replication by accumulating on the hsv-1 genome, repressing HSV-1 gene expression, and directly or indirectly modulating histone modifications. *PLoS Pathog.* **10**, e1004503 (2014)
57. Joyce M.G., Sankhala R.S., Chen W.H., Choe M., Bai, H., Hajduczki A., Yan L., Sterling S.L., Peterson C.E., Green E.C.: A cryptic site of vulnerability on the receptor binding domain of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *bioRxiv.* **3**, 15 (2020)
58. Kaminski R., Chen Y., Salkind J., Bella R., Young W.B., Ferrante P., Karn J., Malcolm T., Hu W., Khalili K.: Negative feedback regulation of HIV-1 by gene editing strategy. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016)
59. Kim S., Koo T., Jee H.G., Cho H.Y., Lee G., Lim D.G., Shin H.S., Kim J.S.: CRISPR RNAs trigger innate immune responses in human cells. *Genome Res.* **28**, 367–373 (2018)
60. Kimberland M.L., Hou W., Alfonso-Pecchio A., Wilson S., Rao Y., Zhang S., Lu Q.: Strategies for controlling CRISPR/Cas9 off-target effects and biological variations in mammalian genome editing experiments. *J. Biotechnol.* **284**, 91–101 (2018)
61. Konermann S., Lotfy P., Brindeau N.J., Oki J., Shokhiev M.N., Hsu P.D.: Transcriptome engineering with RNA-targeting type VI-D CRISPR effectors. *Cell*, **173**, 665–676 (2018)
62. Kuba K., Imai Y., Ohto-Nakanishi T., Penninger J.M.: Trilogy of ACE2: A peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. *Pharmacol. Ther.* **128**, 119–128 (2010)
63. Lebbink R.J., De Jong D.C., Wolters F., Kruse E.M., Van Ham P.M., Wiertz E.J., Nijhuis M.: A combinational CRISPR/Cas9 gene-editing approach can halt HIV replication and prevent viral escape. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017)
64. Lenasi T., Contreras X., Peterlin B.M.: Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency. *Cell host microbe*, **4**, 123–133 (2008)
65. Li C., Guan X., Du T., Jin W., Wu B., Liu Y., Wang P., Hu B., Griffin G.E., Shattock R.J.: Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4+ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9. *J. Gen. Virol.* **96**, 2381–2393 (2015)
66. Liang C., Wainberg M.A., Das A.T., Berkhout B.: CRISPR/Cas9: a double-edged sword when used to combat HIV infection. *Retrovirology*, **13**, 1–4 (2016)
67. Liao H.K., Gu Y., Diaz A., Marlett J., Takahashi Y., Li M., Suzuki K., Xu R., Hishida T., Chang C.J.: Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against HIV-1 infection in human cells. *Nat. Commun.* **6**, 1–10 (2015)
68. Liu J., Zheng X., Tong Q., Li W., Wang B., Sutter K., Trilling M., Lu M., Dittmer U., Yang D.: Overlapping and discrete aspects of the pathology and pathogenesis of the emerging human pathogenic coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, and 2019-nCoV. *J. Med. Virol.* **92**, 491–494 (2020)
69. Liu M., Rehman S., Tang X., Gu K., Fan Q., Chen D., Ma W.: Methodologies for improving HDR efficiency. *Front. Genet.* **9**, 691 (2019)
70. Liu Z., Torresilla C., Xiao Y., Nguyen P.T., Caté C., Barbosa K., Rassart É., Cen S., Bourgault S., Barbeau B.: HIV-1 antisense protein of different clades induces autophagy and associates with the autophagy factor p62. *J. Virol.* **93**, e01757 (2019)
71. Maeder M.L., Gersbach C.A.: Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol. Ther.* **24**, 430–446 (2016)
72. Makarova K.S., Aravind L., Wolf Y.I., Koonin E.V.: Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol. Direct*, **6**, 1–27 (2011)
73. Marraffini L.A., Sontheimer E.J.: Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, **463**, 568–571 (2010)
74. Mei Y., Wang Y., Chen H., Sun Z.S., Ju X.D.: Recent progress in CRISPR/Cas9 technology. *J. Genet. Genomics*, **43**, 63–75 (2016)
75. Ming S., Tian-Rui X., Ce-Shi C.: The big bang of genome editing technology: development and application of the CRISPR/Cas9 system in disease animal models. *Zool. Res.* **37**, 191 (2016)
76. Mocarski E., Shenk T., Griffiths P.D., Pass R.: Cytomegaloviruses. *Fields Virology: Sixth Edition*, **1**, 1960–2014 (2013)
77. Nalawansa D.A., Samarasinghe K.T.: Double-barreled CRISPR technology as a novel treatment strategy for COVID-19. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **3**, 790–800 (2020)
78. Narasipura S.D., Kim S., Al-Harathi L.: Epigenetic regulation of HIV-1 latency in astrocytes. *J. Virol.* **88**, 3031–3038 (2014)
79. Nath A.: Eradication of human immunodeficiency virus from brain reservoirs. *J. NeuroVirology*, **21**, 227–234 (2015)
80. Nguyen T.M., Zhang Y., Pandolfi P.P.: Virus against virus: a potential treatment for 2019-nCoV (SARS-CoV-2) and other RNA viruses. *Cell Res.* **30**, 189–190 (2020)
81. Nicoll M.P., Proença J.T., Efstathiou S.: The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 684–705 (2012)

82. Nyamweya S., Hegedus A., Jaye A., Rowland-Jones S., Flanagan K.L., Macallan D.C.: Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev. Med. Virol.* **23**, 221–240 (2013)
83. Panno S., Matic S., Tiberini A., Caruso A.G., Bella P., Torta L., Stassi R., Davino S.: Loop mediated isothermal amplification: principles and applications in plant virology. *Plants*, **9**, 461 (2020)
84. Park R.J., Wang T., Koundakjian D., Hultquist J.F., Lamothe-Molina P., Monel B., Schumann K., Yu H., Krupczak K.M., Garcia-Beltran W.: A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors. *Nat. Genet.* **49**, 193–203 (2017)
85. Pearson T., Shultz L.D., Miller D., King M., Laning J., Fodor W., Cuthbert A., Burzenski L., Gott B., Lyons B.: Non-obese diabetic–recombination activating gene-1 (NOD-Rag 1 null) interleukin (IL)-2 receptor common gamma chain (IL 2 ry null) null mice: a radioresistant model for human lymphohaematopoietic engraftment. *Clin. Exp. Immunol.* **154**, 270–284 (2008)
86. Pellet P.E., Roizmann B.: Herpesviridae. *Fields virology*, **1**, 1802–1822 (2013)
87. Perlman S., Netland J.: Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 439–450 (2009)
88. Rappuoli R.: Glycoconjugate vaccines: Principles and mechanisms *Sci. Transl. Med.* **10**, 456 (2018)
89. Rauch J.N. & Valois E. et al.: A scalable, easy-to-deploy protocol for Cas13-based detection of SARS-CoV-2 genetic material. *J. Clin. Microbiol.* **59**, 4 (2021)
90. Rice G.I., Thomas D.A., Grant P.J., Turner A.J., Hooper N.M.: Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem. J.* **383**, 45–51 (2004)
91. Roehm P., Shekarabi M., Wollebo H., Bellizzi A., He L., Salkind J., Khalili K.: Inhibition of HSV-1 replication by gene editing strategy. *Sci. Rep.* **6**, 23146 (2016)
92. Roizmann B., Knipe D.M., Whitley R.: Herpes simplex viruses. *Fields virology*, **1**, 1823–1897 (2013)
93. Ruelas D.S., Chan J.K., Oh E., Heidersbach A.J., Hebbeler A.M., Chavez L., Verdin E., Rape M., Greene W.C.: MicroRNA-155 reinforces HIV latency. *J. Biol. Chem.* **290**, 13736–13748 (2015)
94. Russell T.A., Stefanovic T., Tschärke D.C.: Engineering herpes simplex viruses by infection–transfection methods including recombination site targeting by CRISPR/Cas9 nucleases. *J. Virol. Methods.* **213**, 18–25 (2015)
95. Safari F., Afarid M., Rastegari B., Haghighi A.B., Barekati-Mowahed M., Behbahani A.B.: CRISPR systems: Novel approaches for detection and combating COVID-19. *Virus Res.* **294**, 198282 (2021)
96. Siddell S.G., Walker P.J., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Adams M.J., Dutilh B.E., Gorbalenya A.E., Harrach B., Harrison R.L., Junglen S.: Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* **164**, 943–946 (2019)
97. Siliciano J.D., Kajdas J., Finzi D., Quinn T.C., Chadwick K., Margolick J.B., Kovacs C., Gange S.J., Siliciano R.F.: Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4⁺ T cells. *Nature med.* **9**, 727–728 (2003)
98. Simmons G., Reeves J.D., Rennekamp A.J., Amberg S.M., Piefer A.J., Bates P.: Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 4240–4245 (2004)
99. Smith P.D., Meng G., Salazar-Gonzalez J.F., Shaw G.M.: Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 642–649 (2003)
100. Song Z., Xu Y., Bao L., Zhang L., Yu P., Qu Y., Zhu H., Zhao W., Han Y., Qin C.: From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses*, **11**, 59 (2019)
101. Stern-Ginossar N., Weisburd B., Michalski A., Le V.T.K., Hein M.Y., Huang S.X., Ma M., Shen B., Qian S.B., Hengel H.: Decoding human cytomegalovirus. *Science*, **338**, 1088–1093 (2012)
102. Strong A., Musunuru K.: Genome editing in cardiovascular diseases. *Nature Rev. Cardiol.* **14**, 11 (2017)
103. Su S., Wong G., Shi W., Liu J., Lai A.C., Zhou J., Liu W., Bi Y., Gao G.F.: Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends microbiol.* **24**, 490–502 (2016)
104. Sunshine S. & Kirchner R. et al.: HIV integration site analysis of cellular models of HIV latency with a probe-enriched next-generation sequencing assay. *J. Virol.* **90**, 4511–4519 (2016)
105. Tanaka P. & Santos J. et al.: A Crispr-Cas9 system designed to introduce point mutations into the human ACE2 gene to weaken the interaction of the ACE2 receptor with the SARS-CoV-2 S protein. *Preprints.org.* **1**, 2020050134 (2020)
106. van Boheemen S. & de Graaf M. et al.: Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *MBio*, **3**, e00473 (2012)
107. Van Der Oost J., Westra E.R., Jackson R.N., Wiedenheft B.: Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 479–492 (2014)
108. van Diemen F.R., Kruse E.M., Hooykaas M.J., Bruggeling C.E., Schürch A.C., van Ham P.M., Imhof S.M., Nijhuis M., Wiertz E.J., Lebbink R.J.: CRISPR/Cas9-mediated genome editing of herpesviruses limits productive and latent infections. *PLoS pathog.* **12**, e1005701 (2016)
109. van Diemen F.R., Lebbink R.J.: CRISPR/Cas9, a powerful tool to target human herpesviruses. *Cell. Microbiol.* **19**, e12694 (2017)
110. Verheyen J. & Thielen A. et al.: Rapid rebound of a preexisting CXCR4-tropic human immunodeficiency virus variant after allogeneic transplantation with CCR5 Δ 32 homozygous stem cells. *Clin. Infect. Dis.* **68**, 684–687 (2019)
111. von Eije K.J., Ter Brake O., Berkhout B.: Human immunodeficiency virus type 1 escape is restricted when conserved genome sequences are targeted by RNA interference. *J. Virol.* **82**, 2895–2903 (2008)
112. Wang D., Zhang F., Gao G.: CRISPR-based therapeutic genome editing: strategies and in vivo delivery by AAV vectors. *Cell*, **181**, 136–150 (2020)
113. Wang G., Zhao N., Berkhout B., Das A.T.: CRISPR-Cas9 can inhibit HIV-1 replication but NHEJ repair facilitates virus escape. *Mol. Ther.* **24**, 522–526 (2016)
114. Wang H., La Russa M., Qi L.S.: CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 227–264 (2016)
115. Wang H., Yang P., Liu K., Guo F., Zhang Y., Zhang G., Jiang C.: SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin- and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell res.* **18**, 290–301 (2008)
116. Wang J., Quake S.R.: RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 13157–13162 (2014)
117. Wright A.V., Nuñez J.K., Doudna J.A.: Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell*, **164**, 29–44 (2016)
118. Wu A. & Peng Y. et al.: Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell host microbe*, **27**: 325–328 (2020)
119. Wu F. & Zhao S. et al.: A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, **579**, 265–269 (2020)

120. Xiang X., Qian K., Zhang Z., Lin F., Xie Y., Liu Y., Yang Z.: CRISPR-cas systems based molecular diagnostic tool for infectious diseases and emerging 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia. *J. Drug Target.* **28**, 727–731 (2020)
121. Xiong X., Chen M., Lim W.A., Zhao D., Qi L.S.: CRISPR/Cas9 for human genome engineering and disease research. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **17**, 131–154 (2016)
122. Xu X., Fan S., Zhou J., Zhang, Y., Che Y., Cai, H., Wang L., Guo L., Liu L., Li Q.: The mutated tegument protein UL7 attenuates the virulence of herpes simplex virus 1 by reducing the modulation of α -4 gene transcription. *Viol. J.* **13**, 1–12 (2016)
123. Yan W.X., Chong S., Zhang H., Makarova K.S., Koonin E.V., Cheng D.R., Scott D.A.: Cas13d is a compact RNA-targeting type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein. *Mol. Cell*, **70**, 327–339 (2018)
124. Yang H., Gao P., Rajashankar K.R., Patel D.J.: PAM-dependent target DNA recognition and cleavage by C2c1 CRISPR-Cas endonuclease. *Cell*, **167**, 1814–1828 (2016)
125. Yang H., Ren S., Yu S., Pan H., Li T., Ge S., Zhang J., Xia N.: Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6461 (2020)
126. Yuan M., Wu N.C., Zhu X., Lee C.C.D., So R.T., Lv H., Mok C.K., Wilson I.A.: A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science*, **368**, 630–633 (2020)
127. Yuen K.S., Wang Z.M., Wong N.H.M., Zhang Z.Q., Cheng T.F., Lui W.Y., Chan C.P., Jin D.Y.: Suppression of Epstein-Barr virus DNA load in latently infected nasopharyngeal carcinoma cells by CRISPR/Cas9. *Virus res.* **244**, 296–303 (2018)
128. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., Van Der Oost J., Regev A.: Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, **163**, 759–771 (2015)
129. Zhang F., Abudayyeh O.O., Gootenberg J.S.: A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics. *Howard Hughes Medical Institute*, **1**, 1–8 (2020)
130. Zhou P. & Yang X.L. et al.: Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *BioRxiv*, doi: 10.1101/2020.01.22.914952 (2020)
131. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R.: A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **38**, 727–733 (2020)
132. Zhu W., Lei R., Le Duff, Y., Li J., Guo F., Wainberg M.A., Liang C.: The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology*, **12**, 1–7 (2015)
133. Zhuang Q., Liu, S., Zhang X., Jiang W., Wang K., Wang S., Peng C., Hou G., Li J., Yu X.: Surveillance and taxonomic analysis of the coronavirus dominant in pigeons in China. *Transbound. Emerg. Dis.* **67**, 1981–1990 (2020)

WYSTĘPOWANIE METYCYLINOOPORNYCH *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) NA ŚWIECIE ORAZ ANTYBIOTYKOTERAPIA WYBRANYCH INFEKcji WYWOŁYWANYCH PRZEZ MRSA

Kamila Wierchowska

Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

Wpłynęło w kwietniu 2022 r., zaakceptowano w kwietniu 2023 r.

Streszczenie: Gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) jest Gram-dodatnią bakterią, mogącą powodować poważne zakażenia bakteryjne u ludzi. Stanowi ona ważny czynnik etiologiczny wielu chorób, do których należą m.in. zakażenia tkanek miękkich i skóry (m.in. czyraki i ropnie skóry), a także zagrażające życiu martwicze zapalenie płuc, czy zespół wstrząsu toksycznego. Szacuje się, że około 25–30% osób jest nosicielami gronkowca złocistego, głównie w obrębie nozdrzy przednich. Mniejszy odsetek populacji stanowią nosiciele gronkowca złocistego opornego na metycylinę (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA). Szczepy MRSA zgodnie z definicją wykazują brak wrażliwości na niemal wszystkie antybiotyki β -laktamowe. Zjawisko to jest spowodowane obecnością w ścianie komórkowej białka wiążącego penicylinę 2a (penicillin binding protein 2a, PBP2a), będącego produktem genu *mecA*, wchodzącego w skład kompleksu noszącego nazwę SCCmec (staphylococcal cassette chromosome *mec*). Oporne na metycylinę szczepy gronkowca złocistego (methicillin-resistant *S. aureus* – MRSA) powodują endemię w szpitalach na świecie i są jedną z głównych przyczyn zachorowań i śmiertelności w społeczeństwie. Infekcje wywołane przez szpitalne szczepy MRSA (health care-associated MRSA, HA-MRSA) dotyczą głównie chorych z obniżoną odpornością i po zabiegach chirurgicznych. Ponadto wyróżnia się populacje pozaszpitalnych szczepów MRSA (acomunity-associated MRSA, CA-MRSA) oraz populacje odzwierzęcych szczepów MRSA (livestock-associated MRSA, LA-MRSA). Leczenie zakażeń o etiologii MRSA, po wyczerpaniu możliwości standardowych antybiotykoterapii z zastosowaniem m.in. wankomycyny, opiera się na leczeniu antybiotykami nowych generacji, takich jak m.in. dalbawacyna.

1. Wprowadzenie. 2. Kolonizacja różnych części ciała człowieka przez *S. aureus*. 3. Występowanie MRSA na kontynencie europejskim. 4. Występowanie MRSA na kontynencie amerykańskim. 5. Występowanie MRSA w krajach Azji i Pacyfiku. 6. Występowanie MRSA na kontynencie afrykańskim. 7. Leczenie zakażeń wywołanych szczepami MRSA. 7.1. Bakteriemia i zapalenie wsierdza. 7.2. Zapalenie płuc. 7.3. Zapalenie szpiku. 7.4. Zakażenia tkanek miękkich. 8. Podsumowanie.

THE OCCURRENCE OF METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) AROUND THE WORLD AND ANTIBIOTIC THERAPY FOR SELECTED INFECTIONS CAUSED BY MRSA

Abstract: *Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacterium, which can cause serious bacterial infections in humans. It constitutes an important etiological factor of many diseases, for instance, soft tissue and skin infections (including skin boils and abscesses), as well as life-threatening necrotizing pneumonia or toxic shock syndrome. It is estimated that about 25–30% of people are carriers of *S. aureus* mainly in the anterior nostrils. A smaller percentage of people are carriers of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). In accordance with its definition, methicillin-resistant *S. aureus* is resistant to almost all β -lactam antibiotics. This phenomenon is mainly caused by the presence of penicillin-binding protein in the cell wall – PBP2a, which is the product of the *mecA* gene, which is part of the complex called SCCmec (staphylococcal cassette chromosome *mec*). Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) results in endemic in hospitals around the world and are one of the leading causes of morbidity and mortality in society. Infections initiated by hospital strains of MRSA (health care-associated MRSA, HA-MRSA) concern mainly immunocompromised patients after surgery. In addition, there are populations of acomunity-associated MRSA (CA-MRSA) strains and populations of livestock-associated MRSA (LA-MRSA) strains. The treatment of infections with MRSA etiology, after exhausting the possibilities of standard antibiotic therapy with the use of i.e. vancomycin, is based on treatment with new-generation antibiotics, such as dalbavacin.

1. Introduction. 2. Colonization of various parts of the human body by *S. aureus* and MRSA. 3. Occurrence of MRSA on the European continent. 4. Occurrence of MRSA on the American continent. 5. Occurrence of MRSA in Asia and the Pacific. 6. Occurrence of MRSA on the African continent. 7. Treatment of infections caused by MRSA strains. 7.1. Bacteremia and Endocarditis. 7.2. Pneumonia. 7.3. Osteomyelitis. 7.4. Soft tissue infections. 8. Summary.

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, oporny na metycylinę *Staphylococcus aureus*, zakażenia gronkowcowe

Key words: antibiotic resistance, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, staphylococcal infections

* Autor korespondencyjny: Kamila Wierchowska, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach, ul. Prusa 14, 08-110 Siedlce; e-mail: kamila.wierchowska@uph.edu.pl

© 2023 Kamila Wierchowska

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

Cite as:

The occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) around the world and antibiotic therapy for selected infections caused by MRSA, Kamila Wierchowska, Advancements Microbiol., 2023, 62, 2, 101–111, DOI: 10.2478/am-2023-0010

1. Wprowadzenie

Staphylococcus aureus jest Gram-dodatnią bakterią, o kształcie kulistym i wielkości od 0,5–1,5 μm [Bitrus i wsp. 2018], nie wykazującą zdolności ruchu [Harris i wsp. 2002]. Jako fakultatywny beztlenowiec, uzyskuje energię z oddychania tlenowego lub na drodze fermentacji. Optymalna temperatura wzrostu dla tej bakterii mieści się w zakresie 18–40°C [Gnanamani i wsp. 2017]. Na podłożu agarowym, bogatym w składniki odżywcze, tworzy żółte lub białe kolonie wielkości od 1 do 4 mm, a podczas wzrostu na płytkach agarowych z krwią, kolonie często otoczone są strefą hemolizy [Bitrus i wsp. 2018; Gnanamani i wsp. 2017]. Żółte zabarwienie kolonii związane jest ze zdolnością niektórych szczepów *S. aureus* do wytwarzania stafyloksantyny – karotenoidowego pigmentu. Barwnik ten działa jako czynnik wirulencji, głównie jako bakteryjny przeciwutleniacz, pomagając komórkom bakteryjnym uniknąć reaktywnych form tlenu, które układ odpornościowy gospodarza wykorzystuje do zabijania patogenów [Thomer i wsp. 2016]. *S. aureus* toleruje wysokie stężenie chlorku sodu przynajmniej do 15% [Ochiai 1999].

Zakażenia wywołane przez ten drobnoustroj występują zarówno poza, jak i w środowisku szpitalnym [Truszczyński i wsp. 2013; Turner i wsp. 2019]. Infekcje mogą obejmować praktycznie wszystkie narządy i tkanki, stanowiąc zagrożenie życia [Turner i wsp. 2019]. Patogen, po wnikięciu do tkanek lub krwioobiegu, może wywoływać m.in. zapalenie płuc, kości i szpiku, wsierdzia, ucha środkowego, stanowi ponadto często przyczynę infekcji skórnych oraz może powodować zatrucia pokarmowe [Algammal i wsp. 2020; Garoy i wsp. 2019]. Niepokojący jest fakt szybkiego nabywania przez szczepy gronkowca złocistego oporności na antybiotyki, co powoduje, że leczenie zakażeń wywołanych tym patogenem stanowi poważne wyzwanie dla współczesnej medycyny i epidemiologii [Kobayashi i wsp. 2019]. *S. aureus* oporny na metycylinę (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) jest jednym z ważniejszych bakteryjnych patogenów [Dadashi i wsp. 2018; Turner i wsp. 2019]. Określany jest często mianem „superbakterii” [Loewen i wsp. 2017]. Szacuje się, że około 50–70% szczepów *S. aureus* izolowanych ze środowiska szpitalnego to szczepy MRSA. Rocznie powodują one blisko 100 000 przypadków zakażeń, z czego w samych Stanach Zjednoczonych około 20% kończy się zgonem [Abdolmaleki i wsp. 2019]. Szczepy MRSA i zakażenia wywołane tym patogenem stanowią poważny problem zdrowia publicznego [Zasowski i wsp. 2017]. W raporcie z 2014 roku Światowa Organizacja Zdrowia umieściła MRSA jako jeden z siedmiu patogenów o globalnym zasięgu powodującym schorzenia o wysokim wskaźniku śmiertelności [Hamzah i wsp. 2019]. Ponadto szczepy gron-

kowca złocistego opornego na metycylinę zaczęły przenikać do różnych środowisk, co dało początek populacjom: szpitalnych szczepów MRSA (healthcare-associated methicillin-resistant *S. aureus*, HA-MRSA), pozaszpitalnych szczepów MRSA (community-associated methicillin-resistant *S. aureus*, CA-MRSA) oraz odzwierzęcych szczepów MRSA (livestock-associated methicillin-resistant *S. aureus*, LA-MRSA) [Garoy i wsp. 2019; Lee i wsp. 2018; Bal i wsp. 2016; Kizerwetter-Świda i wsp. 2017].

Zakażenia o etiologii HA-MRSA odnotowuje się głównie u pacjentów po zabiegach chirurgicznych oraz z obniżoną odpornością [Garoy i wsp. 2019; Lee i wsp. 2018; Bal i wsp. 2016; Kizerwetter-Świda i wsp. 2017].

Szczepy CA-MRSA odpowiadają za zakażenia charakteryzujące się niejednokrotnie ciężkim przebiegiem, wynikającym z ich dużej zjadliwości. Mogą powodować infekcje tkanek miękkich, zaostrzenie objawów atopowego zapalenia skóry, martwicze zapalenie powięzi, martwicze zapalenie płuc, sepsę oraz syndrom szoku toksycznego. Czynnikiem predysponującym do zakażenia CA-MRSA są m.in. cukrzyca oraz długotrwała terapia antybiotykowa (powyżej 6 miesięcy) [Price i wsp. 2000]. W obrębie populacji CA-MRSA wyróżnia się m.in. klon: USA200, USA300 oraz USA400, a także ST80. Izolaty CA-MRSA USA300 i USA400 posiadają zdolność wytwarzania wysoce zapalnych cytolizyn: α -toksyny, γ -toksyny, δ -toksyny, w przeciwieństwie do szczepów USA200. Posiadają także zdolność wytwarzania leukocydyny Panton-Valentine (Panton Valentine Leukocidin, PVL). Ponadto USA300 zawiera gronkowcową kasetę chromosomalną *mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*, SCC*mec*) typ IV, co tłumaczy patogenny charakter tego szczepu [Schlievert i wsp. 2010].

Kolejną grupę stanowią szczepy LA-MRSA, które początkowo sporadycznie stwierdzano u zwierząt gospodarskich, jednak od 2005 r. drobnoustroje te coraz częściej opisywano u trzody chlewnej, a z czasem ich występowanie zaczęto odnotowywać u ludzi [Alen i wsp. 2016]. Odzwierzęce szczepy MRSA powodują najczęściej zakażenia układu oddechowego, tkanek miękkich oraz skóry [Van Cleef i wsp. 2011].

Jak wspomniano wcześniej, gronkowce posiadają zdolność do wytwarzania wielu czynników patogenności (w tym toksyn oraz enzymów). Wymieniona już leukocydyna PVL jest dwuskładnikową cytotoxyną, należąca do rodziny białek tworzących pory w błonach komórek docelowych. Zdolność do wytwarzania toksyny Panton-Valentine jest warunkowana występowaniem genów *lukS-PV* oraz *lukF-PV*, znajdujących się w obrębie profaga $\phi\text{Sa}2$. Szczepy *S. aureus* wytwarzające PVL mogą powodować m.in. ostre martwicze zapalenia płuc, a także zmiany ropne i martwicze skóry oraz innych tkanek [Ma i wsp. 2012].

Kolejne ważne czynniki patogenności to: koagulaza wolna i związana (clumping factor, CF) powodujące wykrzepianie osocza; receptory wiążące macierz zewnątrzkomórkową (extracellular matrix, ECM), pełniące rolę w adhezji gronkowców do tkanek gospodarza; toksyny, do których należą m.in. cytolizyny gronkowcowe zaliczane do toksyn porotwórczych (pore-forming toxins, PFT) wytwarzane w postaci rozpuszczalnych w wodzie monomerów białkowych, konwertujących do form wbudowujących się w strukturę błon komórek docelowych; toksyny epidermolityczne (eksfoliatyna 1 i 2) powodujące uszkodzenie naskórka; enterotoksyny; toksyna pirogenna TSST-1 (toxic shock syndrome toxin-1), będąca najczęstszą przyczyną zespołu wstrząsu toksycznego. Dodatkowo ważną rolę w patogenności gronkowców odgrywają: fibrylizyna (stafylokinaza), powodująca rozpuszczanie skrzepów krwi; powierzchniowe białko A, chroniące komórki gronkowca przed fagocytozą poprzez wiązanie się z fragmentem Fc immunoglobulin; hialuronidaza, ułatwiająca rozprzestrzenianie bakterii poprzez rozkładanie kwasu hialuronowego w tkance łącznej; DNazy; lipazy; proteazy; ureazy; stafyloferyny (siderofory) [Lopaciuk i wsp. 2012].

Wspomniane powyżej czynniki determinują zjadliwość szczepów *S. aureus*, powodując ciężkie do wyleczenia infekcje. Ponadto efektywny horyzontalny transfer genów *S. aureus* umożliwia ich doskonałe przystosowanie do warunków panujących w środowisku oraz nabywanie genów oporności na antybiotyki [Lindsay i wsp. 2010].

Pierwszym antybiotykiem, wykrytym w 1929 roku przez Aleksandra Fleminga, była penicylina. Antybiotyk ten istotnie zmienił rokowania u chorych z zakażeniami, przyczyniając się do zmniejszenia umieralności z powodu infekcji, jednak powszechne stosowanie penicylin było przyczyną pojawienia się szczepów *S. aureus* opornych na te leki. W 1959 roku do praktyki klinicznej wprowadzono nowy, półsyntetyczny antybiotyk β -laktamowy – metycylinę, ale po roku od jej zastosowania wyisobniono pierwsze szczepy metycylinooporne [Harkins i wsp. 2017]. Gen warunkujący oporność na metycylinę prawdopodobnie został nabyty znacznie wcześniej niż wprowadzono ten antybiotyk do leczenia, tj. w połowie lat czterdziestych ubiegłego wieku w okresie nadmiernego stosowania penicylin. Wskazuje to, iż w rzeczywistości szerokie stosowanie penicylin (a nie metycyliny), doprowadziło do selekcji szczepów MRSA [Harkins i wsp. 2017; Lee i wsp. 2018]. Oporność tych szczepów na większość antybiotyków β -laktamowych wynika z obecności w ścianie komórkowej białka wiążącego penicylinę 2a (penicillin-binding protein 2a, PBP2a), wykazującego niskie powinowactwo do β -laktamów [Andrade-Figueiredo i wsp. 2016; Foster i wsp. 2019; Gostev i wsp. 2017; Panchal i wsp. 2020; Turner i wsp. 2019]. Białko to jest

kodowane przez gen *mecA*, zlokalizowany na chromosomie bakteryjnym i stanowi część regionu gronkowcowej kasety chromosomalnej *SCC_{mec}* [Alkharsah i wsp. 2018; Andrade-Figueiredo i wsp. 2016; Foster i wsp. 2017; Gostev i wsp. 2017; Panchal i wsp. 2020; Turner i wsp. 2019]. Oporność na metycylinę może być również warunkowana obecnością genu *mecC*, będącego homologiem genu *mecA* [Ciesielczuk i wsp. 2019]. U *S. aureus* opisano także występowanie plazmidowego genu *mecB*, którego obecność pierwotnie odnotowano u *Macrocooccus caseolyticus* [Becker i wsp. 2018]. Wskazuje to na możliwość transferu kodowanej przez *mecB* oporności na β -laktamy pomiędzy różnymi rodzajami bakterii [Schwendener i wsp. 2017]. Gronkowiec złocisty oporny na metycylinę jest dodatkowo niewrażliwy m.in. na tetracykliny, często także na aminoglikozydy, fluorochinolony i chloramfenikole, makrolidy, linkozamidy, ciprofloksacynę [Kot i wsp. 2020]. Na przełomie ostatnich lat opracowano zaledwie kilka antybiotyków aktywnych wobec szczepów MRSA, m.in.: ceftobiprol, ceftarolinę, orytawancynę, dalbawancynę oraz delafloksacynę, daptomycynę, linezolid, tygecyklinę, co powoduje, że infekcje o tej etiologii cechują się wysokim wskaźnikiem śmiertelności [Turner i wsp. 2019; Lee i wsp. 2018; Giulieri i wsp. 2020].

2. Kolonizacja różnych części ciała człowieka przez *S. aureus*

Gronkowiec złocisty zaliczany jest do organizmów oportunistycznych, które w sprzyjających warunkach wywołują zakażenie. Wrotami umożliwiającymi zainfekowanie organizmu mogą być pęknięte naczynia krwionośne lub uszkodzona skóra [Polgreen i wsp. 2004]. Kolonizacja ciała szczepami *S. aureus* występuje u ludzi w każdym wieku. Badania przeprowadzone na oddziałach noworodkowych wskazują najczęstsze nosicielstwo *S. aureus* (80–100%) u noworodków około 10 doby życia. Około 1–2 roku życia odsetek ten zmniejsza się do 20%.

Nosicielstwo *S. aureus* może mieć charakter stały (10–20% populacji) albo okresowy (20–70% populacji) [Weems i wsp. 2002]. Znaczna większość dzieci jest nosicielami stałymi, natomiast dorośli wykazują tendencję przemijającą. Modyfikacja nosicielstwa stałego w okresowe zachodzi między 10 a 20 rokiem życia [El-Jakee i wsp. 2008]. Okres nosicielstwa *S. aureus* zależy od wieku chorego, występowania towarzyszącej choroby przewlekłej, tj. niewydolności nerek, defektów układu immunologicznego, uwarunkowań genetycznych oraz długości czasu hospitalizacji pacjenta [Karyński i wsp. 2012].

Stwierdza się, że pacjenci z łagodnymi infekcjami skóry cechują się wyższą częstością kolonizacji *S. aureus* w porównaniu do osób z nieprzerwaną ciągłością

skóry [Polgreen i wsp. 2004]. Osoby będące nosicielami *S. aureus* mogą być źródłem zakażenia u osób nieskolonizowanych, zwłaszcza dzieci i osób starszych [Hatcher i wsp. 2016]. Najczęstszym miejscem kolonizacji szczepami gronkowca złocistego jest przedśrodek nosa [Hassoun i wsp. 2017]. Nosicielstwo w nozdrzach przednich występuje u około 25–30% zdrowej populacji [Mertz i wsp. 2007; Lu i wsp. 2018]. Kolonizacja pozostałych miejsc ciała szczepami *S. aureus* może dotyczyć odbytnicy, krocza, pachwin oraz gardła. Tym samym pobieranie wymazów wyłącznie z nosa może być niewystarczające do oceny nosicielstwa [Hassoun i wsp. 2017] (czułość takiego badania oscyluje w granicach 66%) [Turner i wsp. 2019]. Pobieranie próbek z więcej, niż jednego miejsca ciała skutkuje wyższymi wskaźnikami wykrywalności kolonizacji szczepem MRSA w testach przesiewowych opartych na technice PCR [Hombach i wsp. 2010].

Badania wskazują, że pacjenci z egzemą są bardziej narażeni na kolonizację *S. aureus* niż osoby zdrowe [Totté i wsp. 2016]. Około 90% powierzchni skóry u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry jest skolonizowanych przez *S. aureus* [Hepburn i wsp. 2016]. Kolonizacja skóry szczepami MRSA u osób z atopowym zapaleniem skóry zmienia skład mikrobioty, zarówno u dzieci, jak i dorosłych, prowadząc do zmniejszenia liczby bakterii komensalnych, występujących na skórze [Shi i wsp. 2018]. Ponadto kolonizacja organizmu szczepami MRSA może przyczynić się do czterokrotnego zwiększenia ryzyka infekcji w porównaniu do ryzyka zakażeń szczepami metycylinowrażliwymi (methicillin-sensitive *S. aureus*, MSSA) [Safdar i wsp. 2008]. Nosicielstwo MRSA wynosi 0,2% u osób, które nie miały wcześniejszego kontaktu ze środowiskiem szpitalnym, natomiast wśród pozostałych osób, w tym personelu medycznego, jest ono wyższe i wynosi od 3% do 40% w zależności od regionu świata [Neradova i wsp. 2020; Deepashree i wsp. 2021]. Do transmisji MRSA w szpitalach dochodzi głównie przez ręce personelu medycznego [Solberg i wsp. 2000].

U kobiet czynnikami zwiększającymi ryzyko kolonizacji MRSA są wiek powyżej 60 lat, życie w ubóstwie oraz cukrzyca. U mężczyzn zasadniczym czynnikiem jest kontakt ze środowiskiem szpitalnym [Hassoun i wsp. 2017]. Do osób narażonych na zwiększone ryzyko kolonizacji należą ponadto sportowcy, osoby przebywające w zakładach karnych, dzieci, właściciele zwierząt oraz osoby mające częsty kontakt z placówkami służby zdrowia [Turner i wsp. 2019]. Na oddziałach neonatologii i intensywnej terapii noworodka głównymi czynnikami związanymi z kolonizacją MRSA u noworodków są m.in. niższa masa urodzeniowa oraz wcześniactwo [Nelson i wsp. 2012]. Częstość występowania kolonizacji nosa MRSA w tej grupie wynosi od 2% do 4% [Zervou i wsp. 2014].

Rezerwuarem gronkowca złocistego, w tym izolatów metycylioopornych, może być, oprócz wymienionych wcześniej obszarów ciała, także jama ustna osób dorosłych z objawami infekcji w jej obrębie. W jamie ustnej częstość występowania MRSA wynosi do kilkunastu procent, co uzasadnia potrzebę diagnostyki mikrobiologicznej i monitorowania kolonizacji *S. aureus* w stomatologii [Kwapisz i wsp. 2017].

3. Występowanie MRSA na kontynencie europejskim

Zakażenia szczepami MRSA dotyczą ponad 150 000 pacjentów rocznie w całej Unii Europejskiej [Garoy i wsp. 2019; Kot i wsp. 2020; Piechota i wsp. 2018]. W 2018 roku średni odsetek szczepów MRSA wyniósł 16,4% [Ziółkowski i wsp. 2020]. Występowanie infekcji powodowanych przez MRSA wykazuje pewną zależność geograficzną i jest niższe w Europie Północnej, natomiast wyższe w Europie Południowo-Wschodniej i Południowej [Pomorska-Wesołowska i wsp. 2017]. W 2020 r. dziewięć (23%) z 40 krajów europejskich zgłaszało odsetek występowania szczepów MRSA poniżej 5%, były to: Austria, Dania, Finlandia, Estonia, Holandia, Luksemburg, Norwegia, Szwajcaria i Szwecja. Natomiast odsetek równy lub większy niż 25% odnotowano w 10 (25%) krajach europejskich, takich jak: Białoruś, Cypr, Chorwacja, Grecja, Włochy, Macedonia Północna, Portugalia, Rumunia, Turcja i Serbia [World Health Organization: Antimicrobial 26.01.2022].

Na kontynencie europejskim większość szpitalnych zakażeń MRSA powodowana jest przez szczepy HA-MRSA, natomiast duży rezerwuuar szczepów LA-MRSA (głównie klonu ST398), stanowią zwierzęta hodowlane (świnie, drób, bydło, konie) [Hetem i wsp. 2016]. Szczepy LA-MRSA mogą być przenoszone na ludzi poprzez bezpośredni kontakt ze zwierzętami hodowlanymi, co dowodzi, że posiadają zdolność przełamywania bariery gatunkowej, ale udokumentowano również przypadki występowania szczepów LA-MRSA u osób, które nie miały wcześniejszego kontaktu z żywym inwentarzem [Lee i wsp. 2018; Van Alen i wsp. 2016]. Kolonizacja szczepami LA-MRSA wśród ludzi bywa na ogół bezobjawowa i przemijająca [Sharma i wsp. 2016]. Natomiast dominującą linię szczepów CA-MRSA w Europie stanowi klon ST80, który prawdopodobnie wywodzi się od szczepów gronkowca złocistego wrażliwego na metycylinę wytwarzającego toksynę PVL, a pochodzącego z regionów Afryki Subsaharyjskiej [Figueiredo i wsp. 2017; Kizerwetter-Świda i wsp. 2017].

W 2018 roku średni odsetek występowania szczepów MRSA w Polsce wyniósł 15,8% [Ziółkowski i wsp. 2020]. W badaniach przeprowadzonych w Szpitalu

Uniwersyteckim nr 2 w Bydgoszczy w latach 2015–2017 + rozpoznano 8/212 (3,77%) przypadków zakażeń szpitalnych o etiologii MRSA w 2015 roku, 14/272 (5,14%) zakażeń w 2016 roku i 5/268 (1,86%) przypadków zakażeń w 2017 roku [Kuziemski i wsp. 2018]. Zakażenia szpitalne o etiologii MRSA w szpitalach w południowej Polsce występowały częściej na oddziałach intensywnej opieki medycznej (36,8%) niż na oddziałach innych niż OIOM. Ponadto częstość występowania MRSA różniła się w zależności od wieku pacjentów i wynosiła 14,1% u pacjentów w wieku 60–74 lat oraz 19,5% u pacjentów powyżej 75 roku życia [Pomorska-Wesołowska i wsp. 2017].

4. Występowanie MRSA na kontynencie amerykańskim

W Stanach Zjednoczonych zakażenia wywołane szczepami MRSA powodują rocznie większą liczbę zgonów niż jakikolwiek inny czynnik etiologiczny [Alkharsah i wsp. 2018]. Według danych amerykańskiego Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorobom (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) w 2019 roku MRSA był odpowiedzialny za 119 000 infekcji i 20 000 zgonów w USA [Kourtis i wsp. 2019]. W szpitalnych oddziałach ratunkowych drobnoustroj ten stanowi najczęstszą przyczynę zakażeń skóry i tkanek miękkich (Skin and Soft Tissue Infections, SSTIs). Sytuacja ta związana jest w dużej mierze z pojawieniem się w 2000 roku szczepu CA-MRSA, w szczególności klonu USA300 [Lee i wsp. 2018]. Klon ten jest dominującym w Stanach Zjednoczonych w zakażeniach o etiologii CA-MRSA [Figueiredo i wsp. 2017].-

5. Występowanie MRSA w krajach Azji i Pacyfiku

Azja stanowi jeden z obszarów o największej częstości występowania MRSA na świecie. Od 1980 roku obserwuje się tu ciągły wzrost częstości izolacji tych szczepów w placówkach opieki zdrowotnej [Junie i wsp. 2018]. W Arabii Saudyjskiej nosicielstwo MRSA wśród pracowników służby zdrowia jest szeroko rozpowszechnione i wynosi 76% [Iyer i wsp. 2014]. Na Bliskim Wschodzie oporność na metycylinę wykazuje około 70% szpitalnych izolatów *S. aureus*, a ponad 85% przypadków zapalenia płuc na Półwyspie Arabskim wywołanych jest szczepami MRSA [Zigmond i wsp. 2014].

W prowincji Yunnan, w Chinach, 60% zakażeń o etiologii *S. aureus* jest spowodowane przez szczepy metycylooporne, a główną przyczyną zakażeń szpitalnych są klony ST239 i ST59 [Liao i wsp. 2020]. Podobny odestek odnotowuje się w Korei Południowej [Song i wsp. 2013]. W 2017 roku w Szanghaju wskaźnik izolacji MRSA wynosił około 49% [Hu i wsp. 2018],

natomiast w Nepalu, według najnowszych badań, drobnoustroje te odpowiadają za ponad jedną trzecią wszystkich zakażeń o etiologii *S. aureus* [Khanal i wsp. 2021]. Również w Indiach, według badań przeprowadzonych w 2017 roku przez Indyjską Radę Badań Medycznych (Indian Council of Medical Research, ICMR), częstość występowania MRSA wynosiła ponad 37%. W krajach Rady Współpracy Zatoki Perskiej w latach 2005–2019 wskaźnik zakażeń spowodowanych szczepami metycyloopornymi wahał się od 9% do 38% [Tabaja i wsp. 2021]. Natomiast spadek zakażeń o tej etiologii obserwuje się w Japonii i na Tajwanie, dzięki wdrożeniu m.in. odpowiednich praktyk kontroli zakażeń MRSA [Sit i wsp. 2017].

6. Występowanie MRSA na kontynencie afrykańskim

W krajach afrykańskich, takich jak Nigeria, Senegal, Etiopia, Republika Południowej Afryki, Kenia oraz Sudan Południowy, pojawienie się szczepów MRSA zaobserwowano w połowie lat 80-tych ubiegłego wieku [Iliya i wsp. 2020]. Badania przeprowadzone w latach 2014–2020 pokazują, że głównymi klonami występującymi w Afryce są: CC5, CC8 i CC88 [Lawal i wsp. 2022]. W szpitalach Afryki Subsaharyjskiej MRSA stanowi główny czynnik zakażeń noworodków [Okomo i wsp. 2019]. W Kenii częstość izolacji MRSA jest zróżnicowana i wynosi od 1% do 84,1%, w zależności od lokalizacji miejsca infekcji [Nyasinga i wsp. 2022].

7. Leczenie zakażeń wywołanych szczepami MRSA

7.1. Bakteriemia i zapalenie wsierdza

Częstość występowania bakteriemii spowodowanej szczepami MRSA uległa zmniejszeniu w ciągu ostatniej dekady. Mimo tego, nadal wiąże się ona z gorszymi rokowaniami w porównaniu z infekcjami wywołowanymi szczepami MSSA.

Lekiem pierwszego rzutu w leczeniu bakteriemii MRSA jest wankomycyna [Hassoun i wsp. 2017], jednak od 1997 roku izoluje się szczepy o zmniejszonej wrażliwości na wankomycynę (vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*, VISA), a od roku 2002 także szczepy odporne na wankomycynę (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA) [Giulieri i wsp. 2020]. Badania prowadzone na szczepach VISA wykazały obecność zmian w strukturze ich ściany komórkowej. Składająca się z peptydoglikanu ściana u tych szczepów jest grubsza, niż u szczepów wrażliwych na wankomycynę, co utrudnia wnikanie antybiotyku do komórki [Sadowy i wsp. 2021]. Zasadniczą rolę

w powstawaniu zmodyfikowanej ściany komórkowej pełnią mutacje w regionie *walkR* (znanym również jako *vicKR*, *micAB*, *ycyG*), biorącym udział w kontrolowaniu procesu syntezy ściany komórkowej [Howden i wsp. 2011]. Natomiast szczepy VRSA niosą kopie transpozonu Tn1546, nabytego od opornych na wankomycynę szczepów *Enterococcus faecalis*. Transpozon posiadający geny kodujące oporność typu VanA, koduje dehydrogenazę (VanH), redukującą pirogronian do D-Lac i ligazę VanA, katalizującą powstawanie wiązania estrowego pomiędzy D-Ala i D-Lac. W wyniku tego dipetyd D-Ala-D-Ala jest zastępowany przez depsytyd D-Ala-D-Lac, co zmniejsza powinowactwo dla wankomycyny [Depardieu i wsp. 2007].

Leczenie wankomycyną może przysparzać wiele trudności i wiąże się z ryzykiem rozwoju neurotoksyczności [Hassoun i wsp. 2017, Neely i wsp. 2014]. Dodatkowo, czynnikami ograniczającymi efektywność leczenia wankomycyną są: słaba penetracja do tkanek i powolna aktywność bakteriobójcza [Hassoun i wsp. 2017].

Oprócz wankomycyny, w leczeniu bakteriemii o etiologii MRSA oraz prawostronnego zapalenia wsierdza, stosuje się daptomycynę. Daptomycyna zakłóca funkcjonowanie błony komórkowej, poprzez m.in. wiązanie się z nią, co powoduje jej szybką depolaryzację. Dodatkowo hamuje syntezę DNA, RNA i białek, co ostatecznie prowadzi do śmierci komórki [Heidary i wsp. 2018]. Daptomycyna nie powinna być jednak używana w leczeniu bakteriemii wtórnej, której towarzyszy zapalenie płuc, gdyż jest ona inaktywowana przez surfaktant płucny. Ponadto wcześniejsze leczenie wankomycyną może sprzyjać powstawaniu oporności na daptomycynę u *S. aureus* [Hassoun i wsp. 2017]. Stwierdzono, że oporność na daptomycynę regulują mutacje w genie *mprF* [Ernst i wsp. 2019]. Leczenie bakteriemii wankomycyną lub daptomycyną u około 30–50% pacjentów kończy się niepowodzeniem [Mikkaichi i wsp. 2019].

Kolejnym antybiotykiem stosowanym w leczeniu bakteriemii o etiologii MRSA jest teikoplanina [Holland i wsp. 2014; Yoon i wsp. 2014]. Związek ten jest dużą molekułą, hamującą syntezę ściany komórkowej bakterii, poprzez tworzenie wiązań wodorowych z D-alanylo-D-alaniną [Schmitz i wsp. 1997].

Najnowsze badania *in vitro*, przeprowadzone na modelu zwierzęcym, dały pozytywne efekty w leczeniu zapalenia wsierdza o etiologii MRSA poprzez zastosowanie skojarzonej terapii z użyciem daptomycyny i fosfomycyny [García-de-la-Mària i wsp. 2018]. Fosfomycyna jest pochodną kwasu fosfonowego, o szerokim spektrum działania, nie wykazującą oporności krzyżowej z innymi antybiotykami, co więcej wykazuje aktywność wobec większości szczepów MRSA [Dadej i wsp. 2009; Shaw i wsp. 2015].

Kolejnym antybiotykiem, dającym nadzieję na efektywne leczenie bakteriemii, jest ceftarolina stosowana w monoterapii lub w połączeniu z innym antybiotykiem przeciwwgronkowcowym [Hassoun i wsp. 2017]. Cefalosporyny, do której należy ceftarolina, hamują syntezę ściany komórkowej bakterii, w szczególności peptydoglikanu. Ceftarolina jest nową cefalosporyną o szerokim spektrum działania obejmującym szczepy MRSA, ze względu na silne powinowactwo do białek PBP, w tym PBP2a. Antybiotyk ten hamuje syntezę ściany komórkowej bakterii, w szczególności peptydoglikanu. Leczenie ceftaroliną daje pozytywne efekty u blisko 70% pacjentów [Auer i wsp. 2017; Villegas-Estrada i wsp. 2008].

Dobre efekty w leczeniu bakteriemii uzyskuje się także w przypadku stosowania linezolidu, który jest antybiotykiem oksazolidynonowym [Hassoun i wsp. 2017]. Linezolid uniemożliwia biosyntezę białek poprzez hamowanie powstawania kompleksu inicjatorowego translacji w rybosomach bakteryjnych [Foster i wsp. 2017]. Ponadto, hamuje ekspresję niektórych czynników wirulencji (koagulazy i α -hemolizyny) wytwarzanych przez *S. aureus* [Mądry i wsp. 2004]. Najnowsze dane wskazują, że grupą antybiotyków bakteriostatycznych w leczeniu bakteriemii o etiologii MRSA mogą być linkozamidy, szczególnie u młodych pacjentów, w stanie stabilnym [Guthridge i wsp. 2021].

7.2. Zapalenie płuc

Opcje terapeutyczne dostępne w leczeniu zapalenia płuc o etiologii MRSA są dość ograniczone. Zgodnie z wytycznymi Amerykańskiego Towarzystwa Chorób Zakaźnych (Infectious Diseases Society of America, IDSA) z 2011 roku [Liu i wsp. 2011a, 2011b] w przypadku zapalenia płuc wywołanego przez HA-MRSA, antybiotykami pierwszego rzutu są: dożylnie podawana wankomycyna, doustnie lub dożylnie podawany linezolid oraz klindamycyna [Eliakim-Raz i wsp. 2017]. Linezolid wykazuje dobrą penetrację do tkanek. Ponadto terapia linezolidem może zmniejszać ryzyko zgonu pacjenta, w porównaniu do terapii wankomycyną [Wilke i wsp. 2017]. Stosowanie linezolidu jest jednak ograniczone możliwymi interakcjami lekowymi oraz działaniami niepożądanymi wynikającymi z długotrwałej terapii, takimi jak m.in. mielosupresja, neuropatia, podwyższenie stężenia enzymów wątrobowych, leukopenia, pancytopenia, trombocytopenia. Ponadto, po wprowadzeniu antybiotyku do lecznictwa, zaobserwowano obniżenie wrażliwości szczepów *S. aureus* na linezolid, a także pojawiły się doniesienia o wyizolowaniu szczepów MRSA opornych na ten lek [Michalska i wsp. 2006; Shaw i wsp. 2011].

W leczeniu zapalenia płuc o etiologii MRSA stosuje się także trimetoprim w połączeniu z sulfametoksazo-

lem. Sulfametaksazol należący do grupy sulfonamidów, stanowi antybiotyk o szerokim spektrum działania, wykazujący działanie bakteriostatyczne. Trimetoprim również wykazuje silne działanie bakteriostatyczne i wzmacnia aktywność sulfametaksazolu poprzez zahamowanie przekształcania kwasu dihydrofoliowego w tetrahydrofoliowy [Eliakim-Raz i wsp. 2017].

Nową opcję terapeutyczną w leczeniu szpitalnego zapalenia płuc oraz respiratorowego zapalenia płuc stanowi telawancyna, należąca do grupy bakteriobójczych lipopeptydów, hamująca syntezę ściany komórkowej bakterii. Jednak jej stosowanie powinno być ograniczone i zalecane wyłącznie w przypadku wyczerpania dostępnych skutecznych metod leczenia [Rodvold i wsp. 2014].

7.3. Zapalenie szpiku

MRSA jest przyczyną zapalenia szpiku w 10–59% przypadków tego typu zakażeń o etiologii *S. aureus* [Jerzy i wsp. 2018]. Wytwarzanie biofilmu przez gronkowiec złocisty komplikuje leczenie infekcji kości [Turner i wsp. 2019]. Komórki bakteryjne będące w strukturze biofilmu wykazują od 10 do 1000 razy większą oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe, niż komórki planktonowe [Zhang i wsp. 2021].

Leczenie przewlekłego zapalenia szpiku kostnego polega na chirurgicznym oczyszczeniu kości martwiczej w połączeniu z długotrwałą antybiotykoterapią [Zhang i wsp. 2021]. Antybiotykiem pierwszego rzutu jest wankomycyna, mimo dość słabej efektywności leczenia, wynikającej z niskiej penetracji do kości [Turner i wsp. 2019]. Bardzo dobrą penetrację do kości wykazuje natomiast linezolid, ze skutkami ubocznymi wspomnianymi powyżej [Turner i wsp. 2019]. Oprócz wymienionych antybiotyków w leczeniu zapalenia kości i szpiku o etiologii MRSA wykorzystuje się daptomycynę. Ponadto, najnowsze badania, opierające się na modelu zwierzęcym wykazały, że dalbawancyna jest skutecznym antybiotykiem w leczeniu zakażenia kości piszczelowej o etiologii MRSA u szczura [Silva i wsp. 2020]. Wykazuje ona również aktywność wobec szczepów VISA [Juul i wsp. 2016]. Kolejnym antybiotykiem, dającym nadzieje na pomyślne leczenie zapalenia szpiku jest, działająca bakteriobójczo, ceftarolina. Należy jednak pamiętać, że jej stosowanie może wywoływać wiele reakcji nieporządných [Lalikian i wsp. 2017].

7.4. Zakażenia skóry i tkanek miękkich

Powikłane zakażenia skóry i tkanek miękkich (complicated Skin and Soft Tissue Infections, cSSTI) stanowią ciężką postać infekcji, obejmującej głębsze tkanki miękkie. Skutecznym antybiotykiem w jej leczeniu jest wankomycyna, której efektywność porównywalna jest

do antybiotyków nowszej generacji (linezolid, tygecyklina, daptomycyna, dalbawancyna, oritawancyna), jednakże słaba penetracja do głębszych tkanek powoduje obniżenie skuteczności leczenia ciężkich przypadków cSSTI. Linezolid stanowi nowszą alternatywę dla glikopeptydowych środków przeciwdrobnoustrojowych, zatwierdzoną do stosowania w przypadku ciężkich cSSTI o etiologii MRSA [Leong i wsp. 2018]. Innymi skutecznymi antybiotykami są ceftarolina, dalbawancyna i oritawancyna [Tirupathi i wsp. 2019]. Leczenie może obejmować jedną lub dwie dawki wymienionych antybiotyków [Agarwal i wsp. 2018]. Omadacyklina, należąca do nowej generacji tetracyklin, również wykazuje aktywność przeciwko szczepom MRSA i może być stosowana w leczeniu SSTI [Tirupathi i wsp. 2019].

Nowymi antybiotykami, przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, w tym szczepom gronkowiec złocisty opornego na metycylinę, są malacydyny. Obecnie prowadzi się wiele badań w kierunku zastosowania tych związków w terapii. Antybiotyki te, wykryte w próbkach gleby i przetestowane *in vivo* na zwierzętach z zakażeniami skóry, skutecznie hamowały dalszy rozwój infekcji o etiologii MRSA [Hover i wsp. 2018].

8. Podsumowanie

Penicylina, pierwszy odkryty antybiotyk, zasadniczo zmieniła rokowania u chorych z zakażeniami i przyczyniła się do zmniejszenia umieralności z powodu infekcji bakteryjnych, jednak pojawienie się szczepów opornych na różne grupy antybiotyków, w tym szczepów MRSA, i dynamiczne ich rozprzestrzenianie na świecie, ograniczyło możliwości terapeutyczne.

Problem bakterii antybiotykoopornych dotyczy zarówno państw wysoko rozwiniętych, jak i krajów o niskich dochodach. Przewiduje się, że do 2050 roku, przy braku rozwoju nowych terapii, śmiertelność powodowana nieuleczalnymi infekcjami, wywołanymi przez antybiotykooporne bakterie, w tym MRSA, może wzrosnąć ponad dziesięciokrotnie [van Hal i wsp.]. W 2017 roku eksperci Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization, WHO) uznali MRSA za jeden z ważniejszych organizmów wieloantybiotykoopornych i tym samym podkreślili potrzebę zwiększenia wysiłków w zakresie poszukiwań i badań nowych antybiotyków, a także innowacyjnych metod profilaktycznych, skierowanych przeciwko tym drobnoustrojom. Populacje szczepów MRSA nieustannie ulegają dynamicznym zmianom, co prawdopodobnie wynika z presji selekcyjnej antybiotyków, jak również z przeniesienia klonów epidemicznych między różnymi środowiskami. Dlatego zapobieganie rozprzestrzenianiu się szczepów MRSA oraz zwalczanie zakażeń o tej etiologii wymaga wielokierunkowych działań.

Piśmiennictwo

1. Abdolmaleki Z., Mashak Z., Dehkordi F.S.: Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance in the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospital cockroaches. *Antimicrob. Resist. In.* DOI: 10.1186/s13756-019-0505-7 (2019)
2. Agarwal R., Bartsch S.M., Kelly B.J., Prewitt M., Liu Y., Chen Y., Umscheid C.A.: Newer glycopeptide antibiotics for treatment of complicated skin and soft tissue infections: systematic review, network meta-analysis and cost analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 361–368 (2018)
3. Alen S. van, Ballhausen B., Peters G., Friedrich A.W., Mellmann A., Köck R., Becker K.: In the centre of an epidemic: Fifteen years of LA-MRSA CC398 at the University Hospital Münster. *Vet. Microbiol.* DOI: 10.1016/j.vetmic.2016.01.021 (2016)
4. Algammal A., Hetta H.F., Elkelish A., Alkhalifah D., Hozzein W., Batiha G., El Nahhas N., Mabrok M.: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. *Infection and Drug Resistance*, **13**, 3255–3265 (2020)
5. Alkharsah K.R., Rehman S., Alkhamis F., Alnimr A., Diab A., Al Ali A.K.: Comparative and molecular analysis of MRSA isolates from infection sites and carrier colonization sites. *Ann. Clin. Microb. Anti.* DOI:10.1186/s12941-018-0260-2 (2018)
6. Alkharsah K.R., Rehman S., Alnimr A., Diab A., Hawwari A., Tokajian S.: Molecular typing of MRSA isolates by spa and PFGE. *Journal of King Saud University – Science*, **31**, 999–1004 (2019)
7. Andrade-Figueiredo M., Leal-Balbino T.C.: Clonal diversity and epidemiological characteristics of *Staphylococcus aureus*: high prevalence of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with clinical isolates in Brazil. *BMC Microbiol.* DOI 10.1186/s12866-016-0733-4 (2016)
8. Auer G.K., Weibel D.B.: Bacterial cell mechanics. *Biochemistry*, **56**, 3710–3724 (2017)
9. Bal A.M., Coombs G., Holden M.T.G., Lindsay J.A., Nimmo G.R., Tattavin P., Skov R.L.: Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions. *J. Glob. Antimicrob. Re.* **6**, 95–101 (2016)
10. Becker K., van Alen S., Idelevich E.A., Schleimer N., Seggewiß J., Mellmann A., Kaspar U., Peters G.: Plasmid-Encoded Transferable mecB-Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 242–248 (2018)
11. Bitrus A.A., Peter O.M., Abbas M.A., Goni M.D.: *Staphylococcus aureus*: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, **4**, 43–54 (2018)
12. Ciesielczuk H., Xenophontos M., Lambournea J.: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring mecC Still Eludes Us in East London, United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* **57**, e00020-19 (2019)
13. Dadashi M., Nasiri M.J., Fallah F., Owlia P., Hajikhani B., Emaneini M.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Iran: A systematic review and meta-analysis. *J. Glob. Antimicrob. Re.* **12**, 96–103 (2018)
14. Dadej R., Jędrzejczak-Dadej A.: Zakażenia układu moczowego u mężczyzn w podeszłym wieku. *Geriatrics*, **3**, 151–161 (2009)
15. Deepashree R., Khanum S., Sujatha S., Tejashree A., Prasad N., Rayma B.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage among health care personnel in non outbreak settings in tertiary care hospital in Mysore. *Am. J. Infect. Control.* **49**, 1499–1502 (2021)
16. Depardieu F., Podglajen I., Leclercq R., Collaz E., Courvalin P.: Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 79–114 (2007)
17. Eliakim-Raz N., Hellerman M., Yahav D., Cohen J., Margalit I., Fisher S., Zusman O., Shaked H., Bishara J.: Trimethoprim/sulfamethoxazole versus vancomycin in the treatment of healthcare/ventilator-associated MRSA pneumonia: a case-control study. *J. Antimicrob. Chemoth.* **72**, 882–887 (2017)
18. El-Jakee J., Nagwa A.S., Bakry M., Zouelfakar S., Elgabry E., Gad El-Said W.A.: Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and animal sources. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* **4**, 221–229 (2008)
19. Ernst C.M., Peschel A.: MprF-mediated daptomycin resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* **309**, 359–363 (2019)
20. Figueiredo A.M.S.: What is behind the epidemiological difference between community-acquired and health-care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *Virulence*, **8**, 640–642 (2017)
21. Foster T.J.: Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Status and prospects. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 430–449 (2017)
22. Foster T.J.: Can β -Lactam Antibiotics Be Resurrected to Combat MRSA? *Trends Microbiol.* **27**, 26–38 (2019)
23. Fowler Jr V.G., Cosgrove S.E. i wsp.: Daptomycin versus Standard Therapy for Bacteremia and Endocarditis Caused by *Staphylococcus aureus*. *New Engl. J. Med.* **355**, 653–665 (2006)
24. García-de-la-María C., Miró J.M. i wsp.: The combination of daptomycin and fosfomicin has synergistic, potent, and rapid bactericidal activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rabbit model of experimental endocarditis. *Antimicro. Agents. Chemother.* DOI: 10.1128/AAC.02633-17 (2018)
25. Garoy E.Y., Gebreab Y.B., Achila O.O., Tekeste D.G., Kesete R., Ghirmay R., Kiflay R., Tesfu T.: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Prevalence and Antimicrobial Sensitivity Pattern among Patients – A Multicenter Study in Asmara, Eritrea. *Can. J. Infect. Dis. Med.* DOI:10.1155/2019/8321834 (2019)
26. Giulieri S.G., Tong S.Y.C., Williamson D.A.: Using genomics to understand methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Microbial Genomics*, DOI: 10.1099/mgen.0.000324 (2020)
27. Gnanamani A., Hariharan P., Paul-Satyaseela M.: *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. *Frontiers in Staphylococcus aureus*, DOI: 10.5772/67338 (2017)
28. Gostev V., Kalinogorskaya O., Dmitrenko O., Khokhlova O., Yamamoto T., Lobzin Y., Ryabchenko I., Sidorenko S.: Molecular epidemiology and antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* circulating in the Russian Federation. *Infect. Genet. Evol.* **53**, 189–194 (2017)
29. Guthridge I., Smith S., Law M., Binotto E., Hanson J.: Efficacy and Safety of Intravenous Lincosamide Therapy in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Antimicrob. Agents Ch.* DOI: 10.1128/AAC.00343-21 (2021)
30. Hamzah A.M.C., Yeo C.C., Puah S.M., Chua K.H., Chew C.H.: *Staphylococcus aureus* Infections in Malaysia: A Review of Antimicrobial Resistance and Characteristics of the Clinical Isolates, 1990–2017. *Antibiotics*, DOI:10.3390/antibiotics8030128 (2019)
31. Harkins C.P., Pichon B., Doumith M., Parkhill J., Westh H., Tomasz A., de Lencastre H., Bentley S.D., Kearns A.M., Holden M.T.G.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biol.* DOI: 10.1186/s13059-017-1252-9 (2017)
32. Harris L.G., Foster S.J., Richards R.G.: An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European cells and Materials*, **4**, 39–60 (2002)

33. Hassoun A., Linden P.K., Friedman B.: Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations – a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit. Care*. DOI 10.1186/s13054-017-1801-3 (2017)
34. Hatcher S.M., Heaney C. i wsp.: The Prevalence of Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage among Industrial Hog Operation Workers, Community Residents, and Children Living in Their Households: North Carolina, USA. *Environ. Health Persp.* **125**, 560–569 (2016)
35. Heidary M., Khosravi A.D., Khoshnood S., Nasiri M.J., Soleimani S., Goudarzi M.: Daptomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 1–11 (2018)
36. Hepburn L., Hijnen D.J., Sellman B.R., Mustelin T., Sleeman M.A., May R.D., Strickland I.: The complex biology and contribution of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis, current and future therapies. *Brit. J. Dermatol.* **177**, 63–71 (2016)
37. Hetem D.J., Derde L.P.G., Empel J., Mroczkowska A., Orczykowska-Kotyła M., Kozińska A., Hryniewicz W., Goossens H., Bonten M.J.M. on behalf of the MOSAR WP3 Study Group.: Molecular epidemiology of MRSA in 13 ICUs from eight European countries. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 45–52 (2016)
38. Holland T.L., Arnold C., Fowler Jr V.G.: Clinical management of *Staphylococcus aureus* bacteremia: a review. *JAMA*, **312**, 330–341 (2014)
39. Hombach M., Pfyffer G.E., Roos M., Lucke K.: Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Specimens from Various Body Sites: Performance Characteristics of the BD Gene Ohm MRSA Assay, the Xpert MRSA Assay, and Broth-Enriched Culture in an Area with a Low Prevalence of MRSA Infections. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 3882–3887 (2010)
40. Hover B.M., Brady S.F. i wsp.: Culture-independent discovery of the malacidins as calcium-dependent antibiotics with activity against multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Nat. Microbiol.* **3**, 415–422 (2018)
41. Howden B.P., Stinear T.P. i wsp.: Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR. *PLoS Pathog.* DOI: 10.1371/journal.ppat.1002359. (2011)
42. Hu F., Zhu D., Wang F., Wang M.: Current Status and Trends of Antibacterial Resistance in China. *Clinical Infectious Diseases*, **67**, 128–134 (2018)
43. Iliya S., Mwangi J., Maathai R., Muriuki M.: Phenotypic analysis and antibiotic susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Kiambu County, Kenya. *J. Infect. Dev. Countr.* **14**, 597–605 (2020)
44. Iyer A., Kumosani T., Azhar E., Barbour E., Harakeh S.: High incidence rate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among healthcare workers in Saudi Arabia. *J. Infect. Dev. Countr.* **8**, 372–378 (2014)
45. Jerzy K., Francis H.: Chronic Osteomyelitis – Bacterial Flora, Antibiotic Sensitivity and Treatment Challenges. *The Open Orthopaedics Journal*, **12**, 153–163 (2018)
46. Junie L.M., Jeican I.I., Matroş L., Pandrea S.L.: Molecular epidemiology of the community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones: a synthetic review. *Clujul Medical*, **91**, 7–11 (2018)
47. Juul J.J., Mullins C.F., Peppard W.J., Huang A.M.: New developments in the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections: considerations for the effective use of dalbavancin. *Ther. Clin. Risk. Manag.* **12**, 225–232 (2016)
48. Karyński M., Krzysztoń-Russjan J., Grzesiowski P.: Zmiany w epidemiologii inwazyjnych klonów MRSA w wybranych szpitalach w Polsce. *Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie*, **3**, 311–317 (2012)
49. Khanal A., Sulochan G.C., Gaire A., Khanal A., Estrada R., Ghimir R., Panthee P.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Nepal: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* **103**, 48–55 (2021)
50. Kizerwetter-Świda M., Pławińska-Czarnak J.: Odzwierzcze szczepy *Staphylococcus aureus* odporne na metycylinę (LA-MRSA) – obecny stan wiedzy. *Med. Weter.* **73**, 92–98 (2017)
51. Kobayashi S.D., DeLeo F.R.: Towards a Monoclonal Antibody-Based Therapy for Prevention and Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. *J. Infect. Dis.* **219**, 848–850 (2019)
52. Kot B., Wierzchowska K., Piechota M., Gruzewska A.: Antimicrobial Resistance Patterns in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* from Patients Hospitalized during 2015–2017 in Hospitals in Poland. *Med. Prin. Pract.* **29**, 61–68 (2020)
53. Kourtis A.P., Cardo D. i wsp.: *Vital Signs*: Epidemiology and Recent Trends in Methicillin-Resistant and in Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections – United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **68**, 214–219 (2019)
54. Kuziemski A., Frankowska K., Gonia E.: Etiologia zakażeń szpitalnych rejestrowanych w Szpitalu Uniwersyteckim nr 2 w Bydgoszczy w latach 2015–2017. *Zakażenia XXI wieku*, **5**, 241–245 (2018)
55. Kwapisz E., Garbacz K., Wierzbowska M., Krause K.: Występowanie metycylinoopornych *Staphylococcus aureus* u dorosłych pacjentów z objawami infekcji jamy ustnej. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, **69**, 209–214 (2017)
56. Lalikian K., Parsiani R., Won R., Chang E., Turner R.B.: Ceftazolin for the treatment of osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a case series. *J. Chemotherapy*, **30**, 124–128 (2017)
57. Lawal O.U., Ayobami O., Abouelfetouh A., Mourabit N., Kaba M., Egyir B., Abdulgader S.M., Shittu A.O.: A 6-Year Update on the Diversity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in Africa: A Systematic Review. *Front. Microbiol.* DOI: 10.3389/fmicb.2022.860436 (2022)
58. Lee A.S., de Lencastre H., Garau J., Kluytmans J., Malhotra-Kumar S., Peschel A., Harbarth S.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Rev. Dis. Primers*, **4**, 18033 (2018)
59. Leong H.N., Kurup A., Tan M.Y., Kwa A.L.H., Liao K.H., Wilcox M.H.: Management of complicated skin and soft tissue infections with a special focus on the role of newer antibiotics. *Infection and Drug Resistance*, **11**, 1959–1974 (2018)
60. Liao F., Mo Z., Gu W., Xu W., Fu X., Zhang Y.: A comparative genomic analysis between methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of hospital acquired and community infections in Yunnan province of China. *BMC Infect. Dis.* DOI:10.1186/s12879-020-4866-6 (2020)
61. Lindsay J.A.: Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 98–103 (2010)
62. Liu C., Chambers H.F. i wsp.: Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin. Infect. Dis.* **52**, e18–e55 (2011a)
63. Liu C., Chambers H.F. i wsp.: Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clin. Infect. Dis.* **52**, 285–292 (2011b)
64. Loewen K., Schreiber Y., Kirlew M., Bocking N., Kelly L.: Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Can. Fam. Physician*, **63**, 512–520 (2017)
65. Lopaciuk U., Dzierżanowska D.: Gronkowce metycylinooporne: mechanizmy oporności, czynniki zjadliwości oraz metody genotypowania. *Postępy Mikrobiologii*, **41**, 401–418 (2012)

66. Lu Y.J., Sasaki T., Kuwahara-Arai K., Uehara Y., Hiramatsu K.: Development of a new application for comprehensive viability analysis based on microbiome analysis by next generation sequencing: insights into *Staphylococcal* carriage in human nasal cavities. *Appl. Environ. Microb.* DOI: 10.1128/AEM.00517-18 (2018)
67. Ma X., Chang W., Zhang C., Zhou X., Yu F.: *Staphylococcal* panton-valentine leukocidin induces pro-inflammatory cytokine production and nuclear factor-kappa B activation in neutrophils. *PLoS ONE*, DOI: 10.1371/journal.pone.0034970 (2012)
68. Mądry K.: Nowe antybiotyki. *Współczesna Onkologia*, **2**, 52–57 (2004)
69. Mertz D., Frei R., Jaussi B., Tietz A., Stebler C., Flückiger U., Widmer A.F.: Throat Swabs Are Necessary to Reliably Detect Carriers of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 475–477 (2007)
70. Michalska K., Tyski S.: Oksazolidynony – nowa grupa chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych. *Zakażenia*, **1**, 24–28 (2006)
71. Neely M.N., Youn G., Jones B., Jelliffe R.W., Drusano G.L., Rodvold K.A., Lodise T.P.: Are Vancomycin Trough Concentrations Adequate for Optimal Dosing? *Antimicrob. Agents Ch.* **58**, 309–316 (2014)
72. Nelson M.U., Gallagher P.G.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the neonatal intensive care unit. *Semin. Perinatol.* **36**, 424–430 (2012)
73. Neradova K., Jakubu V., Pomorska K., Zemlickova H.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in veterinary professionals in 2017 in the Czech Republic. *BMC Vet. Res.* DOI: 10.1186/s12917-019-2223-z (2020)
74. Nyasinga J., Omuse G., Njenga J., Nyerere A., Abdulgader S.: Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections in Kenya: current state, gaps and opportunities. *Open Journal of Medical Microbiology*, **10**, 204–221 (2022)
75. Ochiai T.: *Staphylococcus aureus* Produces Autolysin-Susceptible Cell Walls during Growth in a High-NaCl and Low-Ca²⁺ Concentration Medium. *Microbiol. Immunol.* **44**, 705–709 (1999)
76. Okomo U., Akpalu E.N.K., Doare K.D., Roca A., Cousens S., Jarde A., Sharland M., Kampmann B., Lawn J.E.: Aetiology of invasive bacterial infection and antimicrobial resistance in neonates in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis in line with the STROBE-NI reporting guidelines. *The Lancet Infectious Diseases*, **19**, 1219–1234 (2019)
77. Panchal V.V., Griffiths C., Mosaei H., Bilyk B., Sutton J.A.F., Carnell O.T., Hornby D.P., Green J., Hobbs J.K., Kelley W.L., Zenkin N., Foster S.J.: Evolving MRSA: High-level β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* is associated with RNA Polymerase alterations and fine tuning of gene expression. *PLOS Pathog.* DOI:10.1371/journal.ppat.1008672 (2020)
78. Piechota M., Kot B., Frankowska-Maciejewska A., Gruzewska A., Woźniak-Kosek A.: Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains from Hospitalized Patients in Poland. *Biomed. Res. Int.* DOI:10.1155/2018/4657396 (2018)
79. Polgreen P.M., Herwaldt L.A.: *Staphylococcus aureus* colonization and nosocomial infections: implications for prevention. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **6**, 435–441 (2004)
80. Pomorska-Wesołowska M., Różańska A., Natkaniec J., Gryglewska B., Szczypta A., Dzikowska M., Chmielarczyk A., Wójkowska-Mach J.: Longevity and gender as the risk factors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in southern Poland. *BMC Geriatr.* DOI: 10.1186/s12877-017-0442-3 (2017)
81. Price M.F., Carlini M., Houston S., Gentry L.O.: Prevalence of nasal colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in selected patient populations. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **21**, 603–605 (2000)
82. Rodvold K.A., McConeghy K.W.: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Therapy: Past, Present, and Future. *Clin. Infect. Dis.* **58**, S20–S27 (2014)
83. Sadowy E.: Mobile genetic elements beyond the VanB-resistance dissemination among hospital-associated enterococci and other Gram-positive bacteria. *Plasmid*, DOI: 10.1016/j.plasmid.2021.102558 (2021)
84. Safdar N., Bradley E.A.: The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Med.* **121**, 310–315 (2008)
85. Schlievert P.M., Strandberg K.L., Lin Y.C., Peterson M.L., Leung D.Y.: Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **125**, 39–49 (2010)
86. Schmitz F.J., Jones M.E.: Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices? *Int. J. Antimicrob. Agents*, **9**, 1–19 (1997)
87. Schwendener S., Cotting K., Perreten V.: Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Macrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/srep43797 (2017)
88. Sharma M., Anjum M.F. i wsp.: Livestock-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) Clonal Complex (CC) 398 Isolated from UK Animals belong to European Lineages. *Front. Microbiol.* DOI:10.3389/fmicb.2016.01741 (2016)
89. Shaw E., Pujol M. i wsp.: Daptomycin plus fosfomicin versus daptomycin monotherapy in treating MRSA: protocol of a multicentre, randomised, phase III trial. *BMJ Open*, DOI:10.1136/bmjopen-2014-006723 (2015)
90. Shaw K.J., Barbachyn M.R.: The oxazolidinones: past, present, and future. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1241**, 48–70 (2011)
91. Shi B., Leung D.Y.M., Taylor P.A., Li H.: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Colonization Is Associated with Decreased Skin Commensal Bacteria in Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 1668–1671 (2018)
92. Silva V., Poeta P. i wsp.: Therapeutic potential of dalbavancin in a rat model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-osteomyelitis. *Int. J. Antimicrob. Ag.* DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106021 (2020)
93. Sit P.S., Teh C.S.J., Idri N., Sam I.C., Omar S.F.S., Sulaiman H., Thong K.L., Kamarulzaman A., Ponnampalavanar S.: Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and the molecular characteristics of MRSA bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia. *BMC Infect. Dis.* DOI: 10.1186/s12879-017-2384-y (2017)
94. Solberg C.O.: Spread of *Staphylococcus aureus* in hospitals: causes and prevention. *Scand. J. Infect. Dis.* **32**, 587–595 (2000)
95. Song K.H., Kim H.B. i wsp.: Characteristics of invasive *Staphylococcus aureus* infections in three regions of Korea, 2009–2011: a multi-center cohort study. *BMC Infect. Dis.* **13**, 581–589 (2013)
96. Tabaja H., Hindy J.R., Kanj S.S.: Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Arab Countries of the Middle East and North African (MENA) Region. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases.* **13**, e2021050 (2021)
97. Thomer L., Schneewind O., Missiakas D.: Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections, *Annu. Rev. Pathol.-Mech.* **11**, 343–364 (2016)
98. Tirupathi R., Areti S., Salim S.A., Palabindala V., Jonnalagadda N.: Acute bacterial skin and soft tissue infections: new drugs in ID armamentarium. *Journal of community hospital internal medicine perspectives*, **9**, 310–313 (2019)
99. Tótté J.E.E., van der Feltz W.T., Hennekam M., van Belkum A., van Zuuren E.J., Pasmans S.G.M.A.: Prevalence and odds of

- Staphylococcus aureus* carriage in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis. *Brit. J. Dermatol.* **175**, 687–695 (2016)
100. Truszczyński M., Pejsak Z.: Źródła i drogi szerzenia się antybiotykooporności bakterii. *Med. Weter.* **96**, 203–207 (2013)
101. Turner N.A., Sharma-Kuinkel B.K., Maskarinec S.A., Eichenberger E.M., Shah P.P., Carugati M., Holland T.L., Fowler Jr V.G.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 203–218 (2019)
102. Van Alen S., Kaspar U., Idelevich E.A., Köck R., Becker K.: Increase of zinc resistance in German human derived livestock-associated MRSA between 2000 and 2014. *Vet. Microbiol.* **214**, 7–12 (2018)
103. Van Cleef A.G.L., Kluytmans A.J.W.: Livestock-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Humans, Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**, 502–505 (2011)
104. Van Hal S.J., Jensen S.O., Vaska V.L., Espedido B.A., Paterson D.L., Gosbell I.B.: Predictors of Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clinical Microbiology Reviews*, **25**, 362–386 (2012)
105. Villegas-Estrada A., Lee M., Heseck D., Vakulenko S.B., Moba-sheryet S.: Co-opting the cell wall in fighting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: potent inhibition of PBP2a by two anti-MRSA β -lactam antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9212–9213 (2008)
106. Weems J.J., Beck L.B.: Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as a risk factor for skin and soft tissue infections. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **4**, 420–425 (2002)
107. Wilke M.H., Becker K., Kloss S., Heimann S.M., Goldmann A., Weber B., Pletz M.W., Simon P., Petrik C.: Treatment of MRSA pneumonia: Clinical and economic comparison of linezolid vs. vancomycin – a retrospective analysis of medical charts and re-imburement data of real-life patient populations. *GMS Infectious Diseases*, DOI: 10.3205/id000028 (2017)
108. World Health Organization: Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2020, 26.01.2022, <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/who-and-ecdc-report-antimicrobial-resistance-remains-health-threat-europe> (05.07.2022)
109. Yoon Y.K., Kim M.J. i wsp.: Multicenter prospective observational study of the comparative efficacy and safety of vancomycin versus teicoplanin in patients with health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 317–324 (2014)
110. Zasowski E.J., Trinh T.D., Claeys K.C., Casapao A.M., Sabagha N., Lagnf A.M., Klinker K.P., Davis S.L., Rybak M.J.: Multi-center Observational Study of Ceftaroline/Fosamil for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Antimicrob. Agents Ch.* DOI: 10.1128/AAC.02015-16 (2017)
111. Zervou F.N., Zacharioudakis I.M., Ziakas P.D., Mylonakis E.: MRSA colonization and risk of infection in the neonatal and pediatric ICU: a meta-analysis. *Pediatrics*. **133**, e1015–1023 (2014)
112. Zhang F, Wang B, Liu S, Chen Y, Lin Y, Liu Z, Zhang X, Bin Yu B.: *Bacillus subtilis* revives conventional antibiotics against *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Microb. Cell Fact.* DOI: 10.1186/s12934-021-01592-5 (2021)
113. Zigmund J, Pecan L, Hájek P, Raghbir N, Omrani A.: MRSA infection and colonization rates in Africa and Middle East: a systematic review & meta-analysis. *International Congress on Infectious Diseases*, **21**, 391 (2014)
114. Ziółkowski G., Pawłowska I., Jachowicz E., Stasiowski M.: Antibiotic Stewardship in *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infection Treatment—Analysis Based on 29,747 Patients from One Hospital. *Antibiotics*, DOI:10.3390/antibiotics9060338 (2020)
115. Mikkaichi T, Yeaman MR, Hoffmann A.: MRSA Systems Immunobiology Group. Identifying determinants of persistent MRSA bacteremia using mathematical modeling. *PLoS Comput Biol.* **15**(7): e1007087. doi:10.1371/journal.pcbi.1007087 (2019)

CONTENTS

A. B h a r a d w a j, M. G u p t a, A. S h a k y a – Utility of machine learning technology in microbial identification: a critical review	65
W. H r y n i e w i c z, I. S t r u ż y c k a – Antybiotykooporność – dokąd zmierzamy? Antibiotic resistance – where are we going?	75
L. E. A z h a r – Alkhumra hemorrhagic fever virus (AHFV): Current status and future prospects	83
S. A s l a m, A. U m a i r, Z. A s l a m, M. Z. S a l e e m, H. B a s h i r – CRISPR/Cas system: an effective tool against pathogenic diseases	87
K. W i e r z c h o w s k a – Występowanie metycyloopornych <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) na świecie oraz antybiotykoterapia wybranych infekcji wywołanych przez MRSA The occurrence of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) around the world and antibiotic therapy for selected infections caused by MRSA	101

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%