

Kwartalnik

**Tom 57**

**Zeszyt 3•2018**

LIPIEC – WRZESIEŃ

CODEN:

PMKMAV 57 (3)

2018

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 111,53 (2015)

Impact Factor ISI = 0,354 (2017)

Punktacja MNiSW = 15,00 (2016)

Scopus Cite Score = 0,29 (2017)

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

#### RADA REDAKCYJNA

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

#### REDAKCJA

JACEK BIELECKI (redaktor naczelny), RADOSŁAW STACHOWIAK (zastępca), BOHDAN STAROŚCIAK (redaktor),  
PIOTR ZALESKI (sekretarz), MARTA THOMSEN (korekta tekstów angielskich)

#### ADRES REDAKCJI

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: 22 3786229, 22 5541312; fax 22 5541404  
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

#### Redaktorzy:

Redaktor naczelny: Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 5541304; fax 22 5541404  
e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl

Zastępca: Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 5541312; fax 22 5541404  
e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

Redaktor: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny  
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa; tel.: 22 6280822, 22 6211351

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

#### PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

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

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

#### STALI RECENZENCI:

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

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

#### **Informacja o zdjęciu na okładce:**

Adhezja komórek *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 do ludzkich komórek nabłonkowych linii HEC-1-B.  
Preparatyka: mgr Jagoda Płaczkiwicz i dr Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.  
Zdjęcie: dr Paweł Bącał, Pracownia Inżynierii Nanohybrydowych Biosystemów Regulacji, Instytut Biocybernetyki  
i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęczka Polskiej Akademii Nauk.  
Obraz SEM uzyskano przy użyciu aparatury zakupionej w ramach projektu CePT POIG.02.02.00-14-024/08-00.

---

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

---

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



Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego

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

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

Wersja anglojęzyczna wydrukowanych w bieżącym zeszycie artykułów  
jest dostępna w archiwum internetowym czasopisma pod adresem:  
<http://pm.microbiology.pl/category/numery/2018-3>



Paulina Czechowicz\*, Joanna Nowicka

Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wpłynęło w lutym, zaakceptowano w lipcu 2018 r.

**Streszczenie:** Ciągłe rosnąca liczba szczepów wieloopornych skłania do poszukiwania alternatywnych metod leczenia. Obiecującą grupą „leków” do walki z wieloopornymi mikroorganizmami, bazującą na naturalnych peptydach przeciwdrobnoustrojowych, mogą stać się syntetyczne peptydy określane mianem lipopeptydów przeciwdrobnoustrojowych. W pracy omówiono pochodzenie syntetycznych lipopeptydów, ich podział oraz właściwości przeciwdrobnoustrojowe

1. Wstęp. 2. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe. 3. Klasyfikacja peptydów przeciwdrobnoustrojowych. 4. Antybiotyki lipopeptydowe. 5. Syntetyczne lipopeptydy. 5.1. Krótkie syntetyczne lipopeptydy. 5.2. Peptidomimetyki. 5.3. Multiwalentne lipopeptydy. 5.4. Lipopeptydy usztywnione kłamarą węglowodorową. 5.5. Lipopeptydy przeciwdrobnoustrojowe w badaniach laboratoryjnych. 6. Podsumowanie

#### Antimicrobial activity of lipopeptides

**Abstract:** The constantly growing number of multidrug-resistant bacterial strains prompts the search for alternative treatments. Synthetic peptides based on natural antimicrobial peptides, also known as antimicrobial lipopeptides, can become a promising group of “drugs” to fight multi-resistant bacteria. The present paper discusses the origins of synthetic lipopeptides, their classification and antimicrobial properties.

1. Introduction. 2. Antimicrobial peptides. 3. Classification of antimicrobial peptides. 4. Lipopeptide antibiotics. 5. Synthetic lipopeptides. 5.1. Ultrashort lipopeptides. 5.2. Peptidomimetics. 5.3. Multivalent lipopeptides. 5.4. Hydrocarbon-stapled lipopeptides. 5.5. Antimicrobial lipopeptides in laboratory research. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** aktywność przeciwdrobnoustrojowa, lipopeptydy, peptydy

**Key words:** antimicrobial activity, lipopeptides, peptides

## 1. Wstęp

Efektywność pierwszych antybiotyków przez wiele lat była niepodważalna. Znajdowały one szerokie zastosowanie terapeutyczne. Niestety, odporne szczepy bakterii zaczęły pojawiać się już w latach 50. dwudziestego wieku. W kolejnych latach oporność mikroorganizmów na wprowadzane do terapii antybiotyki pojawiała się bardzo szybko. Przyczyną takiego stanu rzeczy było, i niestety nadal jest, nadużywanie antybiotyków, stosowanie ich bez udokumentowanych wskazań, w nieodpowiednich dawkach czy podczas hodowli zwierząt gospodarskich [44]. Obecnie stale rośnie liczba patogenów alarmowych, a oporność nie dotyczy tylko mikroorganizmów pochodzących ze środowiska szpitalnego [33]. Istotne jest to, że jeżeli nie pojawią się nowe opcje terapeutyczne to, jak pisze Kozłowska, do 2050 roku przyczyną zgonów u ludzi częściej będą infekcje niż nowotwory. Warto dodać, że już teraz na całym świecie zakażenia powodowane przez odporne mikroorga-

nizmy są przyczyną 700 tysięcy zgonów każdego roku [44]. Szacuje się, że do 2050 zakażenia powodowane przez odporne mikroorganizmy będą przyczyną ponad 300 milionów zgonów [15].

Oczywiście nadal prowadzone są prace nad pozyskaniem skutecznych antybiotyków. Odbywa się to poprzez modyfikację tych już istniejących lub poszukuje się całkowicie nowych klas antybiotyków z zupełnie odmiennymi celami molekularnymi w komórkach drobnoustroju [44]. Niestety, proces opracowania nowych antybiotyków i wprowadzania ich do terapii jest długotrwały i musi być poprzedzony wielokrotnymi badaniami przedklinicznymi i klinicznymi. Większość obecnie stosowanych antybiotyków to substancje opracowane w latach 1940–1960 [67]. Według Cochrane i wsp. szczególnie alarmujący jest brak nowych antybiotyków skutecznych wobec bakterii Gram-ujemnych [15]. Szczególnie podkreślony przez autora jest fakt, że w ubiegłych 50 latach, zatwierdzono do leczenia infekcji układowych jedynie parę antybiotyków (np. linezolid

\* Autor korespondencyjny: Paulina Czechowicz, Student Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów działające przy Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław; tel. 71 784 00 65; e-mail: paulina.czechowicz.umedwroc@gmail.com

Autorka korespondencyjna pracy jest laureatką konkursu prac młodych naukowców. Nagroda została przyznana przez Komisję Konkursową na Konferencji pod patronatem PTM: „Wektory i patogeny w przeszłości i przyszłości”, która odbyła się we Wrocławiu 24 listopada 2017 r.

czy daptomycyna), niestety skutecznych wyłącznie wobec bakterii Gram-dodatnich [15].

Pomimo zauważalnego postępu w medycynie i farmacji, terapia zakażeń jest nadal trudna. Nabywanie nowych mechanizmów oporności przez wrażliwe komórki bakterii i ciągle rosnąca liczba szczepów wielolekoopornych skłania do poszukiwania alternatywnych metod leczenia, takich metod, które byłyby skuteczne w terapii zakażeń wywołanych przez wielolekooporne szczepy. Nadzieje pokładane są w peptydach przeciwdrobnoustrojowych (AMP – Antimicrobial Peptides), które mogą stać się skuteczną bronią w walce z opornymi mikroorganizmami oraz wytwarzanym przez nie biofilmem [17, 33]. Jako związki o naturalnym pochodzeniu mogą stanowić wartościową bazę do pozyskiwania nowych syntetycznych leków o szerokim spektrum przeciwdrobnoustrojowym [33] i zupełnie odmiennym, w porównaniu do dostępnych antybiotyków, mechanizmie działania [67]. Odmienny mechanizm działania jak i nowe cele molekularne w komórkach drobnoustroju mogą stać się szczególnie istotne w kontekście wolniejszego pojawiania się i rozwijania oporności mikroorganizmów podczas ich klinicznego stosowania.

Obiecującą grupą związków do walki z wielolekoopornymi mikroorganizmami, bazującą na naturalnych peptydach przeciwdrobnoustrojowych, mogą stać się syntetyczne peptydy określane mianem lipopeptydów przeciwdrobnoustrojowych. Podobnie jak peptydy naturalne charakteryzują się one szerokim spektrum działania, zarówno przeciwbakteryjnym, wykazując aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, jak i przeciwgrzybiczym [15].

## 2. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe

Lizozym, białko kationowe odkryte w 1922 roku przez Aleksandra Fleminga, uznawany jest dzisiaj za pierwszy AMP [78]. Kolejne badania nad AMP datuje się na rok 1939, kiedy to odkryto gramicydynę. Peptyd ten został wyizolowany z *Bacillus brevis* i charakteryzował się dobrą skutecznością w odniesieniu do bakterii Gram-dodatnich [5]. Donoszono o efektywności gramicydyny przy stosowaniu miejscowym (leczenie ran i owrzodzeń) i toksyczności przy jej zastosowaniu dootrzewnowym [5].

W 1941 odkryto tyrocydynę, wykazującą aktywność zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych [5]. W latach 50. XX wieku Skames i Watson uzyskali leukinę, a Hirsch i Cohen fagocytynę. Oba białka wyizolowane zostały z leukocytów królika [33]. W kolejnych latach peptydy przeciwdrobnoustrojowe opisano u ciem (cekropina), roślin (tioniny), krabów (tachyplezyny) jak i u ssaków

(defensyny) [33]. To właśnie defensyny, wyizolowane w 1956 roku zostały uznane za pierwsze peptydy AMP pochodzące od zwierząt [5]. Magaininy, kationowe peptydy, odkryto w latach 80. u żab przez Zasloff'a i wsp. [33, 59, 82]. W organizmach tych płazów peptydy pełnią rolę ochronną – chronią ich skórę przed mikroorganizmami, szczególnie bakteriami znajdującymi się w wodzie [41]. Wydzielane są przez żaby w wyniku zranienia [33]. Aby uzyskać peptydy żabie w warunkach laboratoryjnych, po stymulacji żab (np. norepinefryną) wydzielinę ich skóry, po zebraniu i ekstrakcji, rozdziela się chromatograficznie otrzymując czyste związki [41].

Obecnie wiele peptydów izoluje się z organizmów owadów, głównie pszczoł, będąc składową ich układu odpornościowego. Z hemolimfy larw tych owadów, poddanej rozdzielaniu chromatograficznemu, uzyskuje się czyste peptydy [41].

Nadal trwają intensywne badania nad nowymi peptydami, określeniem ich struktury, właściwości czy sposobów działania [41]. Bazy danych [30], w których gromadzone są informacje na temat peptydów, ich budowy, właściwości, zakresie działania czy funkcji dają możliwość uzyskania nowych syntetycznych peptydów [59].

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe są rozpowszechnioną w przyrodzie grupą związków pochodzenia naturalnego. W bazie peptydów, The Antimicrobial Peptides Database, do połowy lutego 2018 roku opisano 2884 peptydy, z czego 333 stanowią bakteriocyny, 4 izolowano z archeonów, 8 z protistów, 13 pochodzi od grzybów, 342 izolowano z roślin, a 2184 to peptydy zwierzęce [30]. AMP, produkowane są zarówno przez organizmy prokariotyczne, jak i eukariotyczne. Ponadto, stanowią istotny element układu odpornościowego u eukariota [17].

Uważa się, że obok niszczenia mikroorganizmów przez fagocyty, peptydy to najstarszy element odporności [79]. W organizmie człowieka są one częścią wrodzonego układu odpornościowego [47], stanowią pierwszą linię obrony na skórze i błonach śluzowych, występują w ślinie, a produkowane są głównie przez keratynocyty warstwy rogowej naskórka, neutrofile i gruczoły potowe [8]. Bogatym źródłem AMP jest płyn łzowy. Wysoki ich poziom stwierdza się również w jelicie cienkim [47]. Są zaangażowane w eliminację mikroorganizmów chorobotwórczych, ale także w kontrolę mikrobioty naszego organizmu. AMP mogą neutralizować endotoksyny, jak i wpływać immunomodulacyjnie na układ odpornościowy [81]. Zwiększone wydzielanie naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych obserwuje się w obszarze stanu zapalnego będącego następstwem zakażenia [17].

Peptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą mieć różną strukturę drugorzędową, ale na ogół zawierają od 12 do 50 reszt aminokwasowych o masie cząsteczkowej 2–10 kDa i wypadkowym ładunku dodatnim, co jest

związane z występującymi w ich strukturze aminokwasami zasadowymi [47, 61, 80]. Większość peptydów to peptydy kationowe [81]. Spektrum ich działania przeciwdrobnoustrojowego obejmuje bakterie (zarówno Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne), wirusy, grzyby, a także pierwotniaki [17, 36, 61, 67]. W przypadku niektórych AMP stwierdzono także aktywność przeciwnowotworową [61] i immunomodulującą. Ponadto, AMP mogą wstrzymywać proces destrukcji tkanek pod wpływem enzymów mikroorganizmów, a także przyspieszać proces gojenia ran [17].

AMP oddziałują z błoną komórkową patogenu prowadząc do jej destabilizacji i lizy komórki. Inne mechanizmy działania peptydów to wstrzymanie procesu replikacji DNA i ekspresji białek, a także ucieczka adenozynotrójfosforanu [59]. Częsteczki peptydów, o wypadkowym ładunku dodatnim, oddziałują z ujemnie naładowaną błoną komórkową, głównie poprzez oddziaływania elektrostatyczne [59]. U bakterii Gram-dodatnich peptydy przeciwdrobnoustrojowe są przyciągane przez obecne w peptydoglikanie grupy anionowe, wiążąc się z ujemnie naładowanymi lipidami znajdującymi się po zewnętrznej stronie błony komórkowej [11, 59]. U Gram-ujemnych łączą się z lipopolisacharydami [11].

Na podstawie badań nad sposobem wnikania peptydów przeciwdrobnoustrojowych przez błonę wytypowano 4 mechanizmy: klepek beczki, dywanowy, pierścieniowy i nieuporządkowanych pierścieniowych porów. W pierwszym zachodzi gromadzenie AMP w taki sposób, że niepolarne ich części pokrywają lipidy błony, a ich część hydrofilowa tworzy rodzaj szczeliny; całość przypomina kształt klepek czy też beczkę zbudowaną z klepek. Peptydy ułożone są prostopadle do powierzchni błony, a utworzone w błonie „otwory” wywołują wyciek składników komórki. W mechanizmie dywanowym AMP układają się równolegle do błony, równomiernie ją wyścielają pokrywając jak dywan, a wywierając na nią nacisk, doprowadzają do przerwania jej ciągłości. Podobnie działają detergenty. W trzecim mechanizmie oddziaływania peptydów po ich połączeniu z błoną dochodzi do wygięcia lipidów błony na kształt pierścienia. Peptydy zostają połączone z polarnymi głowami lipidów [59, 61, 79, 83]. W najrzadszym, czwartym sposobie wnikania peptydów przeciwdrobnoustrojowych przez błonę, czyli podczas formułowania „nieuporządkowanych pierścieniowych porów”, peptydy umiejscowione są w błonie pod różnym kątem [83].

### 3. Klasyfikacja peptydów przeciwdrobnoustrojowych

Istnieje kilka systemów klasyfikacji AMP. Bierze się w nich pod uwagę m.in. źródło pochodzenia peptydów czy ich właściwości molekularne. Najczęściej stosowany

system oparty jest na sekwencji aminokwasowej oraz strukturze drugorzędowej i dzieli peptydy na następujące klasy [11, 41, 61, 79]:

- liniowe peptydy  $\alpha$ -helikalne,
- peptydy bogate w reszty cysteiny,
- peptydy o strukturze  $\beta$ -kardki,
- peptydy zawierające przeważającą liczbę aminokwasów jednego typu, np. glicyny, histydyny i/lub proliny,
- peptydy zawierające rzadkie, modyfikowane aminokwasy [11].

Dodatkowo warto wspomnieć o kryterium klasyfikacji peptydów przeciwdrobnoustrojowych na podstawie ich funkcji. Tu również możemy wydzielić trzy grupy: peptydy niszczące strukturę ściany komórkowej, peptydy wiążące pierwiastki oraz peptydy działające destrukcyjnie na membrany bakteryjne [33].

### 4. Antybiotyki lipopeptydowe

Przedmiotem zainteresowania niniejszej pracy jest grupa związków stanowiących jedną z klas AMP, określana jako lipopeptydy. W związkach tych upatruje się obecnie największego potencjału skutecznego działania wobec mikroorganizmów wieloopornych [43, 53]. Nie sposób jednak o nich mówić nie wspominając o naturalnych lipopeptydach, z których dziś większość jest już zaliczana do antybiotyków lipopeptydowych, a kilka stosowanych jest w praktyce klinicznej, takich jak chociażby daptomycyna czy polimyksyna.

Antybiotyki lipopeptydowe są syntezowane drogą nierybosomalną w komórkach bakterii oraz grzybów w trakcie przemian różnych związków węglowych [19, 38, 43, 72, 76]. Częsteczka lipopeptydu zbudowana jest z hydrofilowej części peptydowej połączonej kowalencyjnie z częścią hydrofobową, na którą składa się łańcuch kwasu tłuszczowego – co ostatecznie nadaje cząsteczce charakter amfifilowy. Część peptydowa może być liniowa lub cykliczna, przy czym cyklizacja znacznie wzmacnia ochronę przed proteolizą [4, 43]. Peptyd warunkuje określone spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, które jest zależne od sekwencji tej cząsteczki, a także jej ładunku, ujemnego lub dodatniego [38, 46, 56]. Przykładami lipopeptydów o wypadkowym ładunku ujemnym są daptomycyna czy surfaktyna, zaś dodatnim – polimyksyna B i jej pochodne, takie jak kolistyna czy oktapeptyna [38, 43, 76].

Dołączone do peptydów hydrofobowe związki, takie jak aminy tłuszczowe, kwasy tłuszczowe czy estry gliceryny również wpływają na zróżnicowany stopień aktywności przeciwdrobnoustrojowej lipopeptydów. Udowodniono, że AMP, do których przyłączone zostały ugrupowania hydrofobowe mogą wykazywać zwiększoną aktywność przeciwdrobnoustrojową. Istotnym czynnikiem wpływającym na ową aktywność jest długość

łańcucha alkilowego [25, 46, 51, 52, 56]. Próby polegające na usunięciu z polimyksyny B reszty kwasu tłuszczowego wykazały niemal całkowitą utratę aktywności przeciwbakteryjnej. Szczegółowe badania oddziaływań lipopeptydów z błonami mikroorganizmów wykazały, że to właśnie łańcuch alkilowy wzmacnia ich powinowactwo do błon komórkowych, a dokładniej wbudowywanie pomiędzy lipidy błonowe, co z kolei zaburza hydrofobowy rdzeń dwuwarstwy lipidowej [38, 56]. Dzieje się tak dlatego, że przyłączenie łańcucha alkilowego zmienia w sposób oczywisty hydrofobowość całego związku, a poprzez to, oprócz wspomnianego powinowactwa, wpływa także na tendencję do oligomeryzacji oraz sposób organizacji związku w roztworach [56, 76].

Zasadniczym celem działania antybiotyków lipopeptydowych jest dezintegracja błony komórkowej drobnoustrojów, prowadząca do powstania jej defektów i w efekcie do utraty potencjału błonowego, redukcji zdolności syntezy ATP (ATP – adenosynotrójfosforan) i śmierci komórki. Mogą one też zaburzać inne procesy komórkowe, takie jak replikacja DNA, transkrypcja czy translacja. Selektywne działanie tych związków wobec bakterii wynika z różnic w budowie błon komórek prokariotycznych i komórek ludzkich. Błony ssaczych komórek są na zewnątrz elektrostycznie obojętne, zbudowane z cholesterolu, fosfatydylocholinoi czy sfingomieliny. Natomiast błony zewnętrzne komórek bakteryjnych zwykle składają się z ujemnie naładowanych fosfolipidów, takich jak kardiolipina czy fosfatydyloglicerol [20, 38, 48, 56, 72, 76, 77]. Jednocześnie lipopeptydy o wysokim stopniu hydrofobowości nie wykazują selektywności działania; efektywnie oddziałują niemal na wszystkie rodzaje komórek, w tym bakterii czy grzybów, co jest powodem wywoływania przez te związki również hemolizy erytrocytów ludzkich oraz cytotoksycznego działania wobec komórek ssaczych [55, 56]. Brak jednej określonej struktury (na przykład receptora) jako podstawy mechanizmu działania w istotny sposób utrudnia patogenowi nabywanie oporności na lipopeptydy. Badania wskazują, że osiągnięcie oporności na te antybiotyki następuje, gdy drobnoustroje zmodyfikują podstawowe właściwości swojej błony komórkowej, co jest możliwe po upływie kilkuset pokoleń mikroorganizmów [38, 56, 76]. Jednak pomimo wszystkich swoich zalet, żaden antybiotyk lipopeptydowy nie osiąga tak szerokiego spektrum działania jak AMP, a oporność bakterii, choć wolniej, narasta również na ten rodzaj antybiotyków [43].

## 5. Syntetyczne lipopeptydy

Stosunkowo mało skomplikowana budowa lipopeptydów, ich mechanizm działania o dobrej skuteczności przeciwdrobnoustrojowej i utrudnione naby-

wanie oporności na te związki przez mikroorganizmy oraz szerokie spektrum aktywności AMP wraz z ich równie efektywnymi sposobami działania na drobnoustroje sprawiły, że zainteresowano się możliwością syntezy lipopeptydów. Doniesienia naukowe wielokrotnie dostarczały dowodów, że można uprościć kationowe peptydy pochodzenia naturalnego tak, aby obejmowały jedynie dodatnio naładowane cząsteczki z dołączonymi hydrofobowymi resztami [38]. Początkowo syntezyowano i badano półsyntetyczne analogi istniejących już antybiotyków – liniowe pochodne daptomycyny, polimyksyny B czy amfomicyny oraz cykliczne związki, takie jak laktoferycyna, bakteriocyny czy pochodne ludzkiej defensyny [38, 43]. Choć z powodzeniem nadal uzyskuje się coraz nowsze analogi, to jednak wciąż najlepszą skuteczność i spektrum działania wykazują naturalne związki, z których wspomniane pochodne się wywodzą [18, 38]. Dodatkowo, wytwarzane związki cechują się małą stabilnością i możliwością degradacji przez peptydazy oraz dużymi kosztami produkcji, niewspółmiernymi do osiągniętych parametrów farmakokinetycznych [14, 43, 77]. Wzięto więc pod uwagę możliwość poprawy właściwości i w tym celu wyprodukowano całkowicie syntetyczne lipopeptydy [43].

Ogólna zasada mówiąca o najbardziej optymalnej strukturze lipopeptydu w postaci krótkiego łańcucha peptydowego (6–7 aminokwasów o budowie liniowej lub cyklicznej) i N-końcowego podstawnika amidowego (kwasu tłuszczowego) stanowi bazę pod opracowanie skutecznych środków przeciwdrobnoustrojowych, których spektrum aktywności może być modulowane przez modyfikację właśnie N-końcowego podstawnika [46, 56, 76]. Wykazano, że przyłączenie ugrupowania zawierającego łańcuch alkilowy do AMP wpływa na oligomeryzację i organizację związku w roztworach, a także na powinowactwo do błony komórkowej dzięki zmianie hydrofobowości i w efekcie analogi tego typu mogą charakteryzować się lepszą aktywnością przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą [3, 51, 52, 55]. Główne cele syntezy to poprawa stabilności w stosunku do AMP poprzez zwolnienie szybkości degradacji, uzyskanie możliwości stosowania znacznie niższych stężeń lipopeptydów i poprzez to również wyeliminowanie problemu cytotoksyczności AMP i powodowania przez te związki hemolizy. Równie istotne jest także poszerzenie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego względem antybiotyków lipopeptydowych i obniżenie kosztów produkcji związane z uproszczeniem procesu syntezy [4, 26, 38, 72]. Wiadomo, że synteza na przykład krótkich liniowych lipopeptydów generuje istotnie mniejsze koszty ich wytwarzania [56].

Ogólny mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego syntetycznych lipopeptydów jest związany ze zjawiskiem amfifilowości: lipopeptyd wbudowuje się



w dwuwarstwą lipidową atakowanej błony mikroorganizmu, wprowadzając defekty w upakowaniu jej łańcucha i indukuje powstawanie krzywizny błony, a w konsekwencji wyciek składników komórkowych. Wówczas dochodzi do rozproszenia potencjału wewnątrzkomórkowego i ostatecznie śmierci komórki [38]. Niemniej jednak szczegółowe procesy zachodzące w trakcie tego zjawiska nie zostały do końca wyjaśnione.

Obiecujące są również wyniki badań, w których podejmowano próby terapii skojarzonej lipopeptydów z konwencjonalnymi antybiotykami. W szczególności wymierne efekty obserwowane były w przypadku tych antybiotyków, u których zauważa się trudności związane z dotarciem do celu molekularnego znajdującego się wewnątrz komórki bakteryjnej i powstawaniem oporności na tym tle. Zastosowanie lipopeptydów celem ich interakcji z błoną i zwiększenia jej przepuszczalności wiąże się potencjalnie z umożliwieniem antybiotykowi penetracji, osiągnięciem pożądanego efektu klinicznego i zabicia drobnoustrojów. Uzyskanie takiego efektu zachodzi ponadto przy znacznie mniejszym minimalnym stężeniu hamującym (MIC – Minimal Inhibitory Concentration) dla antybiotyku (nawet o kilka rzędów wielkości!) dzięki dodaniu lipopeptydu już w stężeniach poniżej wartości MIC [38].

Do rozwiązania nadal pozostają problemy bezpieczeństwa potencjalnego stosowania lipopeptydów w praktyce klinicznej z uwagi na obserwowane efekty cytotoksyczne wobec komórek eukariotycznych oraz hemolizę erytrocytów w stężeniach MIC niezbędnych na przykład do eradykacji biofilmu [46]. Warto jednak zauważyć, że w przypadku dużej części syntetycznych lipopeptydów toksyczność jest relatywnie niska. Dlatego też dla owych związków daje to niemałą przewagę. Niemniej konieczne są dokładniejsze analizy, zanim będzie możliwe użycie lipopeptydów w badaniach klinicznych [25].

Zgodnie z obecną wiedzą, biorąc pod uwagę strukturę syntetycznych lipopeptydów, można je podzielić na cztery grupy:

1. krótkie syntetyczne lipopeptydy,
2. peptydomimetyki,
3. multiwaleńtne lipopeptydy,
4. lipopeptydy usztywnione klamrą węglowodorową [43].

Należy jednak zaznaczyć, że stale projektowane i syntezowane są nowe lipopeptydy, a większość z nich badana jest przez laboratorium je opracowujące *de novo*, stąd w wielu pracach badawczych obiektem zainteresowania są albo zupełnie nowe związki, albo modyfikacja już poznanych struktur.

### 5.1. Krótkie syntetyczne lipopeptydy

Peptydy z tej grupy są najkrótszymi związkami spośród AMP, tzn. posiadają najmniejszą liczbę reszt aminokwasowych. Składają się z 2 do 4 aminokwasów

połączonych z kwasem tłuszczowym (na ogół o długości od 12 do 16 atomów węgla w łańcuchu) o wypadkowym ładunku dodatnim (od +1 do +4). Co zaskakujące, zastąpienie tylko 1 aminokwasu z dwóch lub czterech skutkuje otrzymaniem zupełnie odmiennych właściwości biologicznych [19, 43, 53, 54, 56]. Krótkie syntetyczne lipopeptydy mają właściwości amfifilowe podobnie jak detergenty (hydrofilowa strona peptydu i hydrofobowa lipidu), co z kolei daje im możliwość samoasocjacji i oligomeryzacji z wytworzeniem hydrofobowego rdzenia. Zasadniczo w krótkich lipopeptydach możliwość ta w dużej mierze jest ograniczona ze względu na bliskie sąsiedztwo dodatniego ładunku peptydu – łańcuch kwasu tłuszczowego musi być więc dostatecznie długi (co najmniej 14 atomów węgla) do wystąpienia tego zjawiska [3, 74]. Ostatecznie oligomeryzacja może być sposobem na ochronę przed działaniem peptydaz, a więc poprawiać stabilność i odporność na degradację, co może znaleźć swoje przełożenie w warunkach *in vivo* [56, 68, 70].

Długość łańcucha kwasu tłuszczowego determinuje aktywność przeciwdrobnoustrojową – istnieją hipotezy dotyczące jego optymalnej długości mówiące, że dla aktywności skierowanej przeciwko bakteriom Gram-dodatnim potrzebne są 2 reszty metylenowe więcej, niż dla aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych. Ta sama hipoteza mówi, że z kolei wydłużenie tegoż łańcucha powyżej 10–12 jednostek węglowych może powodować spadek aktywności przeciwbakteryjnej (ale zależnie od części peptydowej), najprawdopodobniej na skutek niedopasowania hydrofobowego i niedostatecznych defektów w atakowanej dwuwarstwie lipidowej [38]. Ponadto wielokrotnie potwierdzano, że spektrum przeciwdrobnoustrojowe zależy przede wszystkim od składu lipopeptydu, a więc i jego powinowactwa do błony docelowej, którego najważniejszym czynnikiem jest hydrofobowość cząsteczki [1, 19, 25, 52, 55, 74]. Kwas tłuszczowy jest więc najważniejszym elementem struktury tych związków. Nawet krótki syntetyczny peptyd Pal-KK-NH<sub>2</sub> składający się z dwóch reszt aminokwasu lizyny (K – lizyna), posiadający resztę kwasu palmitynowego o łańcuchu zbudowanym z szesnastu atomów węgla na N-końcu (Pal/C<sub>16</sub> – reszta kwasu palmitynowego) jest bakterio- i grzybobójczy [8]. Z sukcesem wytworzono serię krótkich syntetycznych lipopeptydów poprzez połączenie z kwasem tłuszczowym nieaktywnych krótkich peptydów i uzyskanie w ten sposób aktywności przeciwdrobnoustrojowej [1, 2, 26, 43]. Co ważne, żaden z przebadanych lipopeptydów tego typu nie powodował hemolizy erytrocytów ludzkich [1, 43].

Najpowszechniejszy związek wśród krótkich syntetycznych lipopeptydów oznaczany jest jako Pal-KGGK-NH<sub>2</sub>. W tak przedstawionym zapisie „Pal” stanowi resztę kwasu palmitynowego, natomiast „KGGK” odpowiada konkretnej sekwencji aminokwasowej

(Lys-Gly-Gly-Lys, przy czym druga reszta lizyny jest D-enancjomerem pierwszej; G – glicyna). Głównym celem działania tego lipopeptydu, podobnie jak wszystkich lipopeptydów oraz AMP, jest interakcja z wewnętrzną błoną komórkową bakterii i indukcja lizy tej błony. Jednak aby lipopeptyd mógł zadziałać na wewnętrzną błonę, konieczna jest wcześniejsza elektrostatyczna interakcja pomiędzy dodatnio naładowanymi łańcuchami bocznymi aminokwasów (przede wszystkim lizyny) z posiadającymi wypadkowy ładunek ujemny komponentami ściany komórkowej drobnoustroju. W przypadku bakterii Gram-dodatnich oddziaływanie zachodzi głównie z kwasem lipoteichojowym, natomiast u Gram-ujemnych z LPS (LPS – lipopolisacharyd) zlokalizowanym na błonie zewnętrznej. Następuje wbudowywanie się lipopeptydu w dwuwarstwę fosfolipidową i perforacja błony zewnętrznej, umożliwiającą dostęp do błony wewnętrznej patogenu. Aktywność omawianego związku doprowadza do zmiany miejscowej organizacji błony lipidowej i drastycznej reorganizacji struktury całej wewnętrznej błony komórkowej, co ma wpływ na jej dynamikę i wszystkie procesy od niej zależne [37, 43, 53, 56, 76]. Elektrostatyczne oddziaływanie pomiędzy częścią peptydową Pal-KGGK-NH<sub>2</sub> a fosfolipidami i innymi składnikami zewnętrznej błony bakteryjnej jest najprawdopodobniej czynnikiem warunkującym selektywność tego związku wobec komórek drobnoustrojów – błony komórek ssaczy, posiadające wypadkowy ładunek obojętny, nie były celem działania tego lipopeptydu (w badaniach *in vitro*). Sugeruje się jednocześnie, że za powinowactwo omawianego związku do komórek bakteryjnych odpowiedzialna jest reszta kwasu palmitynowego, umożliwiającą oligomeryzację związku i powstawanie micelli, oddziaływujących z błoną komórkową mikroorganizmów [26, 49]. Niemniej ustalono, że aktywność lipopeptydu z docelową błoną bakteryjną może zachodzić w dwojaki sposób: na drodze hydrofobowego oddziaływania reszty kwasu tłuszczowego oraz poprzez elektrostatyczną interakcję reszty aminokwasowej [26, 43, 49].

Inny przykład stanowi Mir-KYR-NH<sub>2</sub> (Mir/C<sub>14</sub> – reszta kwasu mirystynowego o długości 14 atomów węgla). KYR to sekwencja trzech aminokwasów (Y – tyrozyna; R – arginina; sekwencja Lys-Tyr-Arg) uzyskana poprzez hydrolizę cząsteczki hemoglobiny wołowej przez pepsynę. Wcześniejsze doniesienia wielokrotnie udowodniały, że poprzez trawienie hemoglobiny wołowej można uzyskać wiele peptydów o różnych właściwościach, w tym około 30 o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. KYR naturalnie znajduje się w pozycji 139–141 łańcucha α; jednak do badań wykorzystywano identyczną cząsteczkę, lecz zsyntezowaną w laboratorium [12, 65]. Dla poprawy właściwości przeciwdrobnoustrojowej N-koniec został acylowany kwasem tłuszczowym o różnej długości łańcucha

węglowego (z dziesięcioma, dwunastoma, czternastoma lub szesnastoma atomami węgla), przy czym związek zawierający resztę kwasu mirystynowego wydaje się być najefektywniejszym w działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Mechanizm działania lipopeptydów posiadających w składzie reszty tego kwasu tłuszczowego lub kwasu laurynowego prawdopodobnie polega na połączeniu najpierw z zewnętrzną błoną bakterii, jej permeabilizacją i przeniknięciem, późniejszym połączeniem z błoną wewnętrzną, również permeabilizowaną i dodatkowo depolaryzowaną, co skutkuje szybką śmiercią komórki [64]. Te i inne podobne strukturalnie związki, najprawdopodobniej również działające w opisanym sposobie, takie jak Pal-KK-NH<sub>2</sub>, Pal-KGK-NH<sub>2</sub>, Pal-KKKK-NH<sub>2</sub> posiadają bardzo szerokie spektrum działania zarówno w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych [43, 75].

Inne przykładowe syntezowane krótkie lipopeptydy składają się z 1 do 5 cząsteczek aminokwasu ornityny (Orn – ornityna), powstającego z argininy pod wpływem arginazy, które są kowalencyjnie połączone z kwasem tłuszczowym (o długości łańcucha węglowego od 8 do 18 atomów węgla), wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz grzybów. Wśród testowanych syntetyk o sekwencji Mir-Orn-Orn-Orn-NH<sub>2</sub>, (oznaczany przez badaczy jako LP16) wydaje się być najskuteczniejszy w działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Jako związek nietoksyczny (nie wywoływał hemolizy hRBC w testach *in vitro*), łatwy do syntezy oraz stabilny i odporny na działanie trypsyny jest kolejnym przykładem potwierdzającym, że lipopeptydy, w tym krótkie syntetyczne, mają duży potencjał, aby stać się nowymi i efektywnymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi [50].

Zsyntezowano również lipopeptydy składające się z jednej reszty lizyny, w których pojedynczy dłuższy łańcuch reszty kwasu tłuszczowego (na przykład szesnastowęglowy kwas palmitynowego) zastąpiono dwoma resztami o krótszej długości łańcucha tłuszczowego (z ośmioma atomami węgla): C<sub>8</sub>-K-C<sub>8</sub>. Celem była poprawa selektywności bez wpływu na właściwości amfipatyczne, kluczowe dla działania przeciwbakteryjnego. Aktywność powstałego związku była porównywalna z aktywnością lipopeptydu zawierającego pojedynczy, dwukrotnie dłuższy łańcuch kwasu tłuszczowego, jednak nowy analog był znacząco mniej hemolityczny wobec erytrocytów ludzkich. Ponadto inny, niesymetryczny w budowie lipopeptyd zsyntezowany w podobny sposób, C<sub>8</sub>-K-C<sub>10</sub>, okazał się zupełnie nietoksyczny *in vitro* dla ludzkich embrionalnych komórek nerek (HEK – Human Epithelial Kidney cells) w stężeniach dwukrotnie wyższych niż wartość MIC – przy czym minimalne stężenie niezbędne do zahamowania wzrostu bakterii, zarówno

Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, było znacznie niższe niż w przypadku krótkich syntetycznych lipopeptydów, zawierających pojedynczą resztę kwasu tłuszczowego [21]. Brak wpływu cytotoksycznego na ssacze komórki jest zaskakujący przede wszystkim dlatego, że zbadany mechanizm działania nie wydaje się odmienny i opiera się na permeabilizacji i depolaryzacji błony, co z kolei prowadzi do wniosku, że prawdopodobnie udało się znacząco poprawić selektywność działania i powinowactwo do komórek prokariotycznych. Niemniej autorzy podkreślają, że wymagane są dalsze badania tego i podobnych związków pod tym kątem [21, 43].

Metod i pomysłów modyfikacji krótkich syntetycznych lipopeptydów jest znacznie więcej i niemal w każdej pracy można spotkać się z odmiennym do nich podejściem, z których każde wydaje się być korzystne, nastawione na poszukiwanie nowych sposobów otrzymania pożądaných właściwości syntezowanych związków. Poszczególne metody uzyskiwania krótkich lipopeptydów o różnej budowie wpływają więc zarówno na spektrum działania, jak i na występowanie potencjalnego efektu cytotoksycznego i hemolitycznego w stosunku do komórek ludzkich [43].

Testowane są też różne strategie zastosowania tych lipopeptydów, na przykład sprzęganie z innymi cząsteczkami dla poprawy właściwości antybakteryjnych. Prowadzone są próby sprzęgania z kationowymi związkami polianionowymi, spermidyną, putresyną etc., pełniącymi wiele różnych ról w modyfikacji kwasów nukleinowych czy białek.

W osobnych badaniach zajęto się również lipopeptydami o potencjalnym działaniu przeciwbiofilmowym, porównywalnym do działania wankomycyny czy daptomocyny, jak Mir-KK-NH<sub>2</sub> czy Mir-RRR-NH<sub>2</sub> (z których drugi wymieniony wykazuje w tym zakresie także synergizm działania z wankomycyną) [43, 60]. Kolejne związki badane pod kątem aktywności przeciwbiofilmowej to między innymi Pal-KGGK-NH<sub>2</sub>, Pal-KKK-NH<sub>2</sub>, Pal-KAAK-NH<sub>2</sub> i Pal-KLLK-NH<sub>2</sub> (L – leucyna) – zwłaszcza dwa ostatnie o obiecującym działaniu eradykującym próbowano także sprzęgać z biodegradowalnymi polimerami (PLACO – Poly(lactic acid castrol oil) oraz P(SARA) – Ricinoleic acid based poly(ester-anhydride)) celem uzyskania przeciwbakteryjnych środków terapeutycznych o przedłużonym działaniu, stosowanych miejscowo w infekcjach jamy ustnej – z obiecującymi wynikami, niewątpliwie wymagającymi potwierdzenia w dalszych badaniach [19].

## 5.2. Peptydomimetyki

Termin peptydomimetyk jest pojęciem szerokim i obejmuje właściwie każdą, dowolną sekwencję zaprojektowaną w celu naśladowania struktury i/lub

funkcji naturalnych AMP, ale której szkielet nie opiera się wyłącznie na α-aminokwasach; peptydomimetykami mogą więc być zarówno półsyntetyczne analogi, jak i w pełni syntetyczne cząsteczki. Ich synteza jako środków przeciwdrobnoustrojowych zakłada przede wszystkim rozwiązanie problemu degradacji proteolitycznej, która dotyczy niemalże wszystkich lipopeptydów oraz AMP [20, 22, 35, 43, 77]. Możliwości i sposoby syntezy znacząco różnią się zależnie od pomysłu na uzyskanie konkretnych właściwości peptydomimetyku. Choć związki należące do tej grupy, uzyskane odmiennymi metodami, wykazują podobną aktywność przeciwbakteryjną czy przeciwgrzybiczą, to cechują się one zupełnie odrębną strukturą, która warunkuje uzyskanie różnych właściwości; zarówno korzystnych, jak i niepożądanych. Nieustannie opracowywane są nowe związki o unikatowej strukturze, stąd tak duża różnorodność w obrębie peptydomimetyków. W tej grupie lipopeptydów wyróżnić możemy m.in. oligoacylilizyny, lipo-α- i -γ-AA-peptydy, peptoidy, poliamidy czy arylamidy, którym poświęcono już немало doniesień naukowych [22, 27, 28, 43, 66]. Nie sposób omówić wszystkich wymienionych w niniejszej pracy, dlatego zaprezentowane zostaną jedynie dwie pierwsze grupy związków.

Oligoacylilizyny, czy też oligomery acylowanej lizyny (Oligoacyllisines – OAK), są to liniowe cząsteczki złożone z naprzemiennie ułożonych łańcuchów kwasów tłuszczowych oraz kationowych aminokwasów. Ułożenie w taki sposób zapobiega tworzeniu się struktury drugorzędowej. Ze względu na podstawową strukturę, OAK można podzielić na dwie kategorie, zależnie od rodzaju tzw. bloku występującego w strukturze: α lub β. Na blok α składa się sekwencja amino-X-lizyna, natomiast na blok β: lizyna-amino-X-lizyna, gdzie w miejscu X występuje reszta kwasu tłuszczowego o odpowiedniej ilości atomów węgla. Przykładem OAK z grupy α jest C<sub>12</sub>K-7α<sub>8</sub>. Zapis ten oznacza, że do reszty kwasu laurynowego (C<sub>12</sub>) i aminokwasu lizyny (K) dołączony jest właśnie blok α w siedmiu powtórzeniach (7α<sub>8</sub>, gdzie 7 oznacza liczbę bloków α, 8 – liczbę atomów węgla w łańcuchu acylowym dołączonym do lizyny). [23, 71]. Ponieważ analogi uzyskane w ten sposób nie są małymi cząsteczkami, wielu badaczy syntetyzuje także znacznie krótsze pochodne, niepozbawione aktywności przeciwdrobnoustrojowej, jak chociażby przedstawiciel grupy β: C<sub>12</sub>(ω<sub>7</sub>)K-β<sub>12</sub>. W skład tego związku wchodzi jedynie 3 reszty lizyny oraz 2 reszty kwasu tłuszczowego (C<sub>12</sub>(ω<sub>7</sub>) symbolizuje resztę kwasu dodekanowego z podwójnym wiązaniem przy węglu siódmym) [22, 23, 73]. Oczywiście syntetyzowanych związków zaliczanych do tych kategorii jest sporo i każdy z nich podlega wielokrotnej i wnikliwej analizie pod kątem mechanizmów działania, właściwości przeciwbakteryjnych, farmakokinetyki czy potencjalnej toksyczności,

a różnice pomiędzy poszczególnymi analogami są często niewielkie. Przytoczony powyżej związek  $C_{12}(\omega_7)$ -K- $\beta_{12}$  w stężeniach subinhibicyjnych szybko wywołuje efekt depolaryzacji atakowanej błony, pozbawiając bakterie przede wszystkim działania pompy protonowej, niezbędnej do aktywnego wypompowywania substancji z cytoplazmy (*efflux pump*). Jest to jeden z wielu znanych mechanizmów oporności mikroorganizmów, polegający na aktywnym usuwaniu z komórki różnych związków, w tym leków i antybiotyków, i przez to uniemożliwianiu ich działania. Skoro efektem działania tych związków jest depolaryzacyjny wpływ na potencjał błony komórkowej, to mogą one okazać się niezwykle skutecznymi środkami do osiągnięcia selektywnej kontroli proliferacji komórek drobnoustrojów i jednocześnie zaburzać wiele procesów, których siłą napędzającą jest pompa protonowa. Przede wszystkim jest ona kluczowym źródłem energii niezbędnym do działania pompy błonowej, stąd powstawanie oporności wykorzystującej mechanizm aktywnego wypompowywania może zostać niemal całkowicie zlikwidowane. Największą zaletą OAK może okazać się możliwość uwrażliwiania komórek prokariotycznych (przede wszystkim bakterii Gram-ujemnych) np. na erytromycynę czy ryfampicynę [23, 31, 32, 43]. Choć szczegółowy mechanizm depolaryzacji spowodowanej wpływem OAK nie jest jeszcze dokładnie poznany, uważa się, że te peptydomimetyki mogą skutecznie zwiększyć dostęp antybiotyków do cytoplazmy, wspomagając w ten sposób ich prawidłowe działanie i w efekcie doprowadzać do zahamowania wzrostu bakterii [22, 23, 31, 43]. Co istotne, badania nad farmakokinetyką tych związków wykazały, że do osiągnięcia pożądaných efektów depolaryzacji i wymaganych w tym celu stężeń OAK *in vivo* (model myszy) zupełnie wystarczające mogą okazać się podania podskórne [23]. Obecnie wykorzystanie oligoacylolizyn uznawane jest za bardzo dobre i obiecujące podejście poszerzania raptownie kurczących się możliwości walki za pomocą antybiotyków z bakteriami Gram-ujemnymi [23, 31, 43, 71].

Wspomnieć też należy o podobnej strategii działania synergistycznego także innych substancji z peptydomimetykiem – ale w stężeniach znacznie niższych, niż MIC dla samego lipopeptydu. Szereg bardziej szczegółowych badań peptydomimetyków wykazał, że istnieje możliwość, że związki te właśnie w stężeniach poniżej wartości MIC uwrażliwiają komórki bakteryjne nie tylko na działanie antybiotyków, jak opisano powyżej, ale również na działanie wrodzonych mechanizmów obronnych, włączając w to naturalnie występujące w osoczu ludzkim AMP, jak lizozym czy defensyny. Obecnie uważa się, że mechanizmy działania naturalnych AMP obecnych w organizmie (a nie podawanych zewnątrz) są mocno niedocenione i wielu badaczy zwraca uwagę na konieczność przyjrzenia się

im i opracowywania metod i związków, które mogłyby wzmacnić lub umożliwić ich działanie – jak najprawdopodobniej peptydomimetyki [14, 32].

Drugą omawianą i równie unikatową grupą peptydomimetyków są lipidowane AA-peptydy. Projekt, podobnie jak w innych lipopeptydach, zakłada połączenie hydrofobowej reszty kwasu tłuszczowego z hydrofilową częścią peptydową o ładunku dodatnim, celem uzyskania cząsteczki o właściwościach amfipatycznych. Różnica polega na wykorzystaniu AA-peptydów jako ugrupowania peptydowego. Strukturalnie AA-peptydy stanowią oligomery, złożone z tak zwanych bloków budujących. Każdy blok opiera się na szkielecie kwasu peptydonukleinowego (PNA), czyli polinukleotydowego analogu DNA i RNA, wykazującym chiralność i zawierającym reszty N-acetylo-N-aminoetyloaminokwasów. Do szkieletu dołączona jest boczna grupa funkcyjna (lub kilka), identyczna, jak w peptydzie, które dany AA-peptyd naśladuje pod względem budowy i funkcji. Peptydy te można podzielić na kategorie:  $\alpha$  i  $\gamma$  zależnie od pozycji łańcucha bocznego; syntezuje się i bada także cykliczne-AA-peptydy. AA-peptydy są znaną grupą związków, cechującą się przede wszystkim opornością na degradację proteolityczną, stąd zainteresowanie tymi cząsteczkami jako możliwymi terapeutykami, również takimi, które mogłyby działać przeciwdrobnoustrojowo [27, 28, 42, 66]. Dołączenie reszty kwasu tłuszczowego również w przypadku tych cząsteczek skutkuje poprawą aktywności przeciwbakteryjnej [66]. Naśladowanie struktury, funkcji i mechanizmu działania AMP, a także stabilność cząsteczki, odporność na proteolizę i nieograniczona możliwość wprowadzania modyfikacji czynią z AA-peptydów bardzo atrakcyjną matrycę do syntezy nowoczesnych związków przeciwbakteryjnych. Dodatkowo, ich aktywność biologiczna może być łatwo zmieniana i wzmacniania dzięki wprowadzaniu szeregu dodatkowych grup hydrofobowych i kationowych [28, 42, 43, 69, 72].

Przykładowo, lipo- $\alpha$ -AA-peptydy poddano badaniom i okazało się, że krótkie dimery tych lipopeptydów wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. Dodanie do dimeru kolejnego bloku i utworzenie trimeru nadaje aktywność przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, a dodanie jeszcze jednego i powstanie cząsteczki tetramerowej – poszerzenie spektrum działania przeciwko tym bakteriom oraz wyższą aktywność [27, 43, 72]. Udowodniono przy tym, że najpierw musi zostać osiągnięty pewien stopień hydrofobowości, aby umożliwić aktywność przeciwdrobnoustrojową; hydrofobowość zwiększa zarówno obecność reszt kwasów tłuszczowych, jak i przyłączanie kolejnych cząsteczek do oligomerów. Jak we wszystkich lipopeptydach, acylacja i wzrost hydrofobowości znacząco podwyższa aktywność antibakteryjną oraz spektrum działania

związków, w tym przypadku w stosunku do bakterii Gram-ujemnych (dla Gram-dodatnich spektrum nie jest poszerzane) [27, 43, 72].

Obie kategorie omawianych lipo-AA-peptydów ( $\alpha$  i  $\gamma$ ) wykazują podobny mechanizm działania, z błoną komórkową jako celem, nie różni się też między nimi znacząco spektrum działania. Wyjątek stanowią anionowe analogi lipo- $\gamma$ -AA-peptydów; podczas gdy kationowe wykazują szerokie i porównywalne spektrum przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, związki anionowe okazały się zupełnie pozbawione działania przeciwbakteryjnego. Prawdopodobnie jest to skutek braku oddziaływań elektrostatycznych tych związków z bakteryjną membraną komórkową także posiadającą ładunek ujemny. Grupa  $\gamma$ -AA-peptydów po koniugacji z nienasyconym ogonem kwasu tłuszczowego wykazuje również potencjalnie mniejszą skłonność do agregacji oraz zmniejszoną aktywność hemolityczną w stosunku do ludzkich erytrocytów, jak również wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową niż grupa  $\alpha$ -AA-peptydów, pomimo zbliżonego spektrum działania przeciwbakteryjnego. Najprawdopodobniej analogi  $\gamma$  wykazują działanie opierające się na mechanizmie dywanowym lub dywanopodobnym. Selektywnie permeabilizują błonę i strukturalnie ją modyfikują, prowadząc do opisywanego wcześniej efektu utraty potencjału błonowego, wycieku substancji wewnątrzkomórkowych i śmierci komórki. Zaobserwowano, że błony ssaczych komórek o wypadkowym ładunku obojętnym, zawierające cholesterol, nie są praktycznie wcale atakowane przez te lipopeptydy, co prawdopodobnie jest przyczyną względnie wysokiej selektywności i niskiej toksyczności [42, 43, 72]. W omawianej grupie peptydomimetyków oprócz lipo- $\gamma$ -AA-peptydów znajduje się także wiele związków modyfikowanych w inny sposób, na przykład sulfonowanych (sulfono- $\gamma$ -AA-peptydy). Bardzo dobrze naśladują one działanie magainin, posiadając szersze spektrum aktywności i większą odporność na degradację proteolityczną [20, 72].

Wadą omawianych związków jest skomplikowany proces produkcji – lipo-AA-peptydy są długimi cząsteczkami, wymagającymi wieloetapowej syntezy, co wiąże się również z dość wysokimi kosztami [37, 45]. Z tego powodu badano również krótkie peptydomimetyki, uzyskane poprzez hydrolizę gotowych lipo-AA-peptydów kategorii  $\alpha$  i  $\gamma$ , zawierających najczęściej 1 blok lipo- $\gamma$ -AA-peptydu i resztę lizyny – okazały się one aktywne np. w stosunku do szczepów MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*), MRSE (Methicillin Resistant *Staphylococcus epidermidis*), *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* czy *Escherichia coli* (MIC od 2 do 5  $\mu\text{g/ml}$ ) [43].

Cykliczne lipo-AA-peptydy z kolei zostały zaprojektowane w celu dalszej poprawy właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Z założenia powinny one wykazy-

wać wyższą aktywność przeciwko mikroorganizmom od liniowych analogów z uwagi na sztywniejszą, a więc i stabilniejszą strukturę amfipatyczną. Rezultaty wstępnych badań potwierdziły tę hipotezę – cykliczne związki okazały się być skuteczne wobec szeregu szczepów wieloopornych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych [43, 72]. Próbuje się je także stosować wobec biofilmu, m.in. *S. epidermidis* czy *P. aeruginosa* z obiecującymi wynikami [69]. Imitują one AMP również pod względem właściwości modulowania układu odpornościowego [43, 69, 72]. Niestety, są przy tym również znacznie bardziej hemolityczne [43].

Bada się także między innymi AA-peptydy o strukturze heliakalnej, jak również różne kombinacje połączeń tych związków ze sobą, których wstępne wyniki badań także są obiecujące [72].

Podsumowując, lipo-AA-peptydy z szerokim spektrum aktywności przeciwbakteryjnej, zwiększoną stabilnością cząsteczki i nieograniczonymi możliwościami modyfikacji struktury oraz funkcji są kolejnymi kandydatami na potencjalnie środki terapeutyczne przeciwko patogenom wieloopornym [43, 69, 77].

Dzięki względnie łatwej syntezie większości peptydomimetyków oraz łatwości modyfikowania ich struktury, wraz z opornością na działanie proteaz są one atrakcyjnymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi nakierowanymi na membranę bakteryjną [20, 43, 77].

### 5.3. Multiwaleńne lipopeptydy

Grupa multiwaleńnych lipopeptydów jest z pewnością najbardziej różnorodną z wymienianych w tym podziale. Cechą wspólną tej grupy jest proces oligomeryzacji czy też koniugacji kolejnych nowo powstałych peptydów i lipopeptydów ze sobą, celem poprawienia właściwości i osiągnięcia lepszej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, idących w parze ze zminimalizowaną cytotoxycznością i aktywnością hemolityczną w stosunku do ludzkich krwinek czerwonych [7, 43].

Defensyny, posiadające przede wszystkim zdolność powodowania szybkiej śmierci komórek bakterii, a także szerokie spektrum działania i niski odsetek generowanych szczepów opornych (*in vitro*), niejednokrotnie stanowią strukturę wyjściową do syntezy nowych związków. Podczas syntezy multiwaleńnych lipopeptydów badacze postanowili wykorzystać analogi C-końcowego fragmentu ludzkiej defensyny 3, składającego się z 10 reszt aminokwasowych jako aktywną sekwencję lub rusztowanie dla dalszych multiwaleńnych modyfikacji za pomocą reszt lizyny [6, 7, 43, 48]. Przykładowo, powstały związek B2088 (dimer) również cechuje się zdolnościami szybkiego zabijania, wykazuje obiecującą selektywność w stosunku do błon bakteryjnych, a narastanie wobec niego oporności jest znikome. Dla wzmożenia aktywności przeciwbakteryjnej

oczywiście zastosowano koniugację N-końca z dwiema resztami kwasu tłuszczowego, dzięki której osiągnięto pożądaną interakcję z bakteryjnym LPS. Dimery sprzęgano z resztami kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha węglowego (8 do 16 atomów), uzyskując zadowalające efekty przeciwko bakteriom Gram-ujemnym w przypadku związków zawierających reszty kwasów kaprylowego (o długości 8 atomów węgla – Kapr lub  $C_8$ ) i kaprynowego (o długości 10 atomów węgla –  $C_{10}$ ). Jednocześnie porównano wpływ oligomeryzacji i wykazano znacznie słabszą aktywność N-lipidowanych monomerów. Hemoliza nie była obserwowana dla żadnego syntezowanego związku [7, 43, 45], podobnie cytotoksyczność [7]. Badacze doszli do wniosku, że przyłączanie reszt kwasów tłuszczowych również do tego typu cząsteczek znacząco wpływa na poprawę aktywności przeciwbakteryjnych, choć użycie kwasów tłuszczowych posiadających w łańcuchu więcej niż czternaście atomów węgla skutkuje obniżeniem tej aktywności. Obserwowano także zwiększoną tendencję do autoagregacji wraz z dalszym wydłużaniem łańcucha kwasu tłuszczowego i w efekcie niższą aktywność przeciwdrobnoustrojową. Ostatecznie najlepszym związkiem otrzymanym w ten sposób okazał się  $C_8$ -B2088; uzyskano wysoką aktywność przeciwbakteryjną, najwyższą selektywność, zdolność szybkiego zabijania bakterii oraz świetną biokompatybilność. Lipopeptyd ten wykazywał również synergizm działania z konwencjonalnymi antybiotykami [7, 43, 45, 48].

W ramach badań nad możliwością działania przeciwko bakteryjnemu lipopolisacharydowi zsyntezowano związki nazwane multiwalentnymi  $\beta$ -bumerangami ( $\beta$ -Boomerangs). Są to peptydy przyjmujące właśnie bumerangopodobną konformację  $\beta$ -kartki w kompleksie z LPS [10, 43, 62]. N-końce tych peptydów acylowano kwasem butanowym i oktanowym, a część łańcucha zastąpiono resztą cysteiny i wytworzono multiwalentne  $\beta$ -bumerangi połączone mostkiem dwusiarczkowym. Zainteresowano się następnie zarówno wpływem długości łańcucha kwasu tłuszczowego; badanie wykazało podobną aktywność wszystkich analogów wobec bakterii Gram-ujemnych, jednak tylko związki posiadające resztę kwasu tłuszczowego zbudowaną z ośmiu atomów węgla wykazują działanie wobec bakterii Gram-dodatnich. Zaobserwowano, że nie bez znaczenia jest także obecność aminokwasów aromatycznych w strukturze – przy zamianie aminokwasów na niearomatyczne całkowicie utracono właściwości przeciwbakteryjne. Okazało się, że kluczowym w neutralizacji LPS jest jego ścisłe dopasowanie ze strukturą  $\beta$ -bumeragu, możliwe dzięki zastąpieniu aminokwasów alifatycznych na aromatyczne w omawianych związkach [10, 63]. Potwierdzono również po raz kolejny niezwykle korzystny wpływ acylacji na poprawę działania przeciwdrobnoustrojowego [10, 43, 63].

W innych badaniach również wykorzystano tworzenie wiązania dwusiarczkowego pomiędzy dimerami – ale homo- i hetero-dimerami peptydowych N-końcowych analogów laktoferyny oraz różnych krótkich lipopeptydów zawierających ornitynę i resztę kwasu tłuszczowego o długości dwunastu atomów węgla. Otrzymane związki wykazały wysoką aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, a także wobec grzybów (choć nie wobec np. *Candida albicans*). Większa część homodimerów nie cechowała się lepszymi właściwościami, niż odpowiadające im monomery – w przeciwieństwie do heterodimerów, które okazały się znacznie atrakcyjniejszymi związkami. Heterodimery N-końcowej pochodnej laktoferyny z krótkim lipopeptydem zawierającym ornitynę wykazywały znacząco wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową niż pozostałe dimery i monomery, jednocześnie wykazując najniższą aktywność hemolityczną wobec erytrocytów ludzkich [40, 43].

Badacze zajmują się także syntezowaniem dendrymerów. Można je podzielić na dwie kategorie, zależnie do ilości rozgałęzień amfifilowych: A i B. Grupa A zawiera ich znacznie więcej, podczas gdy kategoria B składa się z większej ilości lipofilnych struktur liniowych. Zarówno związki klasyfikowane jako A, jak i B lipiduje się z użyciem głównie reszt kwasów tłuszczowych o długości ośmiu lub dwunastu atomów węgla. Działania te w przypadku cząsteczek zawierających resztę kwasu laurynowego doprowadziły do poprawy właściwości przeciwbakteryjnych oraz zwiększenia selektywności w stosunku do różnych szczepów *Candida*; długość łańcucha reszty kwasu tłuszczowego nie wpływała na aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich ani Gram-ujemnych (we wszystkich syntetykach aktywność ta była identyczna). Szczegółowe analizy aktywności tych związków wykazały, iż śmierć grzybów następuje wskutek wpływu jonów potasu z wnętrza ich komórek, ale jednocześnie zaobserwowano także ich hamujący wpływ na aktywność syntazy  $\beta$ -(1,3)-glukanowej *Candida*, zależny od stężenia dendrymeru w miejscu docelowym [34, 43].

#### 5.4. Lipopeptydy usztywnione klamrą węglowodorową

Lipopeptydy usztywnione klamrą węglowodorową (Hydrocarbon-Stapled Lipopeptides – HSLP) stanowią stosunkowo nową i obiecującą grupę związków. Unikalna struktura opiera się na „zszyciu” węglowodorowym, obejmującym reakcję podwójnej wymiany i zamknięcia pierścienia (Ring-Closing Metathesis – RCM) i utworzenia związku cyklicznego. Zachodzi ona pomiędzy dwoma  $\alpha$ -podstawnikami niewystępujących naturalnie aminokwasów, zawierających nierozgałęzione łańcuchy boczne z grupami olefinowymi

w konkretnych pozycjach [37, 43]. Pozycje te są ważne, ponieważ warunkują możliwość zajścia katalitycznej reakcji cyklizacji, czyli właśnie spięcia węglowodorowego [37]. Upraszczając, dochodzi do formowania wiązania kowalencyjnego pomiędzy łańcuchami bocznymi lipopeptydów [37, 57]. Taka modyfikacja znacząco stabilizuje i usztywnia strukturę peptydu, konformację oraz potencjalnie wzmacnia oporność na degradację proteolityczną i aktywność przeciwdrobnoustrojową peptydu. Może to w efekcie również wpływać korzystnie na oddziaływanie z docelową błoną i być może wydłużać biologiczny czas półtrwania lipopeptydu [37, 43, 57]. Do reakcji tej używa się różnych lipopeptydów o poznanej strukturze, tworząc nowe lipopeptydy cykliczne [43]. Porównano działanie nowo powstałych analogów usztywnionych kłamrą węglowodorową z aktywnością lipopeptydów stanowiących strukturę wyjściową, użytą do ich syntezy. Porównanie to wykazało, że wszystkie wymienione związki wykazują zbliżone spektrum działania wobec bakterii Gram-dodatnich, oddziałując z błoną zewnętrzną, a następnie permeabilizując błonę wewnętrzną patogenu. Żaden jednak nie wykazywał działania przeciwko Gram-ujemnym patogenom [37].

Co ciekawe, technika usztywniania za pomocą kłamry węglowodorowej nie jest nowa; stosowana jest już od dłuższego czasu zwłaszcza przy opracowywaniu terapeutyków stosowanych np. w onkologii, dietetyce, kardiologii czy terapii zakażeń HIV, głównie z uwagi właśnie na korzyści polegające na poprawie stabilności, oporności na degradację proteolityczną oraz podwyższeniu aktywności biologicznej tak powstałych związków. Pod względem chemicznym, spięcie może zachodzić nie tylko poprzez „szycie” węglowodorowe, ale także triazolowe, azobenzenowe, tiolowe, laktamowe czy tioeterowe – a każde z nich generować będzie zupełnie odmienne właściwości, stabilność cząsteczki i bioaktywność. Zainteresowanie tą techniką nastąpiło, kiedy zaobserwowano, że usztywnione za pomocą kłamry cząsteczki wpływają na interakcje białek w komórkach docelowych, na przykład nowotworowych, w efekcie hamując różne proteiny. Opisywane jest zakłócanie za pomocą omawianych związków np. działania rodziny białek Bcl-2,  $\beta$ -kateniny, hormonów (m.in. estrogeny) czy też różnych czynników transkrypcyjnych [29, 57].

Na dzień dzisiejszy kierunek ten nie wydaje się być mniej atrakcyjnym od innych strategii obieranych w poszukiwaniu nowych, skutecznych i bezpiecznych środków do walki z drobnoustrojami.

### 5.5. Lipopeptydy przeciwdrobnoustrojowe w badaniach laboratoryjnych

Wiele ośrodków i zespołów badawczych, zarówno polskich jak i światowych, wykazało ogromne zainteresowanie lipopeptydami potwierdzając, poprzez wyniki

swoich badań prowadzonych zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, wysoki potencjał przeciwdrobnoustrojowy tej grupy związków.

Dawgul i wsp., analizowali aktywność przeciwdrobnoustrojową lipopeptydów w odniesieniu do szczepów klinicznych gronkowca złocistego. Jak pisze Dawgul, możliwość zastosowania krótkich lipopeptydów w zakażeniach skóry powodowanych przez *Staphylococcus aureus* byłoby świetną opcją terapeutyczną. Lipopeptydy cechują również dobre właściwości powierzchniowo czynne, co dodatkowo daje możliwość zastosowania ich jako emulgator czy konserwant w preparacie leczniczym.

Materiał badawczy stanowiły szczepy kliniczne *S. aureus* pochodzące od pacjentów z zapaleniem mieszków włosowych, czyrącznością i atopowym zapaleniem skóry, 5 syntetycznych lipopeptydów (Pal-KK-NH<sub>2</sub>, Pal-KKK-NH<sub>2</sub>, Pal-KKKK-NH<sub>2</sub>, Pal-KG-NH<sub>2</sub> oraz Pal-KGK-NH<sub>2</sub>) oraz antybiotyki konwencjonalne (chloramfenikol, erytromycyna, penicylina G i wankomycyna). Wyniki badań wykazały skuteczność analizowanych związków w odniesieniu do zastosowanych w pracy mikroorganizmów, nie wykazując różnicowania ich aktywności pomiędzy szczepami. Istotnym wydaje się wykazana przez autorów pracy aktywność lipopeptydów w odniesieniu do szczepów opornych na erytromycynę, penicylinę i chloramfenikol. Wysoką aktywność wykazano dla lipopeptydu Pal-KK-NH<sub>2</sub> [16]. Warto dodać, że badane lipopeptydy charakteryzowały właściwości bakteriobójcze w stężeniach równych lub dwukrotnie wyższych aniżeli ich MIC w odniesieniu do analizowanych szczepów [16].

Dawgul i wsp. oceniali również wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych, w tym również lipopeptydów Pal-KK-NH<sub>2</sub> i Pal-RR-NH<sub>2</sub>, na proces adhezji i tworzenia biofilmu oraz jego eradykacji. Do analizy wybrano szczep wzorcowy *C. albicans* (ATCC 10231), a jako biomateriał posłużył silikonowy cewnik Foley'a. Zastosowane lipopeptydy wykazywały zdolność do eradykacji biofilmu, były aktywne już w stężeniach niższych aniżeli ich wartość MIC. Dla porównania warto dodać, że nystatyna aktywna była dopiero w stężeniu odpowiadającym czterokrotności wartości MIC. Analizując wpływ peptydów na proces zapobiegania tworzenia biofilmu jak i eradykacji jego dojrzałych struktur, oba peptydy były skuteczne w stężeniach poniżej wartości MIC. W przypadku peptydu Pal-RR-NH<sub>2</sub> były to stężenia wielokrotnie niższe aniżeli wartość MIC [17].

Aktywność przeciwgrzybiczą lipopeptydu Pal-KK-NH<sub>2</sub> w odniesieniu do grzybów drożdżopodobnych, oceniali również Kamysz i wsp. Do analizy wybrano zarówno szczepy kliniczne (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*) jak i wzorcowe, a do porównania skuteczności lipopeptydu

– tradycyjne leki przeciwgrzybicze (flukonazol, amfoterycyna B, kapsoufungina). Autorzy pracy wykazali synergistyczne oddziaływanie między lipopeptydem, a tradycyjnymi lekami przeciwgrzybiczymi, szczególnie z kapsoufunginą. Jak zaznaczają autorzy pracy, wykazany synergizm może okazać się w przyszłości dobrą opcją terapeutyczną do leczenia inwazyjnych zakażeń o etiologii grzybiczej [39].

Barchiesi i wsp. analizowali również aktywność wspomnianego wcześniej peptydu Pal-KK-NH<sub>2</sub> wobec izolatów *Cryptococcus neoformans*. Analizie poddano 14 szczepów pochodzących z płynu mózgowo rdzeniowego i krwi. Wszystkie badane szczepy wykazywały wrażliwość na amfoterycynę B i flukonazol. Zespół badawczy wykazał synergistyczne oddziaływanie lipopeptydu z amfoterycyną B dla 3 analizowanych szczepów i znacznie szybsze, niż w przypadku amfoterycyny B, działanie grzybobójcze w stosunku do jednego szczepu. Odnotowano aktywność grzybobójczą lipopeptydu Pal-KK-NH<sub>2</sub> po 24 godzinach inkubacji. Uzyskane wyniki pozwalają wysunąć wniosek, że Pal-KK-NH<sub>2</sub> może w przyszłości stanowić dobrą alternatywę w terapii zakażeń wywołanych przez *C. neoformans* [9].

Właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze krótkich syntetycznych lipopeptydów analizowali również Greber i wsp. Aktywność przeciwdrobnoustrojową wybranych związków, różniących się między sobą m.in. długością łańcucha kwasu tłuszczowego, oceniali w odniesieniu do szczepów wzorcowych, bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych i grzybów. Wyniki uzyskane przez autorów pracy wskazują na wysoką aktywność przeciwbakteryjną, zarówno bakteriostatyczną jak i bakteriobójczą, lipopeptydu zawierającego w swojej strukturze resztę kwasu palmitynowego. Aktywność ta była zdecydowanie wyższa w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. Silny efekt bakteriostatyczny wykazano dla analogów z więcej niż jednym zasadowym aminokwasem (Pal-KK-NH<sub>2</sub>, Pal-KKK-NH<sub>2</sub>, Pal-KKKK-NH<sub>2</sub>, Pal-KGK-NH<sub>2</sub> i Pal-KGKG-NH<sub>2</sub>), w przeciwieństwie do lipopeptydów z jednym aminokwasem (Pal-K-NH<sub>2</sub> i Pal-KG-NH<sub>2</sub>). Lipopeptydy modyfikowane kwasem mirystynowym cechowały się wysoką aktywnością bakteriostatyczną wobec *Bacillus subtilis* i *S. epidermidis*, natomiast modyfikowane kwasem laurynowym – niską aktywnością wobec analizowanych w pracy szczepów. Zróżnicowaną aktywność odnotowano dla lipopeptydów z dwiema i trzema resztami lizyny (Laur-KK-NH<sub>2</sub>, Laur-KKK-NH<sub>2</sub>; C12/Laur – reszta kwasu laurynowego o długości 12 atomów węgla). Lipopeptydy modyfikowane kwasem kaprynowym wykazywały niską aktywność przeciwbakteryjną lub zupełny jej brak. Aktywność przeciwgrzybiczą wykazano dla Pal-KK-NH<sub>2</sub>, Pal-KKK-NH<sub>2</sub> i Pal-KKKK-NH<sub>2</sub>. Spośród analogów kwasu palmitynowego najniższą aktywność przeciwgrzybiczą wykazano dla lipopeptydów z jedną resztą lizyny

– Pal-K-NH<sub>2</sub>. Różną aktywnością przeciwgrzybiczą wykazywały lipopeptydy modyfikowane kwasem mirystynowym. Wykazano, że w tych samych stężeniach są one aktywne wobec *C. albicans*, *C. tropicalis* i *Aspergillus brasiliensis*. Lipopeptydy modyfikowane kwasem kaprynowym wykazywały brak aktywności wobec grzybów *Candida* i *A. brasiliensis* [24].

Autorzy pracy, oprócz oceny przeciwdrobnoustrojowej lipopeptydów, zbadali również ich właściwości hemolityczne. Lipopeptydy, modyfikowane kwasem palmitynowym, powodowały silną hemolizę erytrocytów. Wysoką toksyczność wykazano dla pochodnych palmitynowych z resztą lizyny (Pal-KK-NH<sub>2</sub>, Pal-KKK-NH<sub>2</sub> i Pal-KKKK-NH<sub>2</sub>) [24].

Aktywność syntetycznych lipopeptydów wobec biofilmu bakteryjnego również była przedmiotem badań. Mikroorganizmy tworzące strukturę biofilmu charakteryzują się dużo większą opornością na związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym aniżeli ich odpowiedniki planktonowe. Stale poszukuje się więc nowych preparatów, które wykazywałyby aktywność w odniesieniu do takiej struktury. Dałoby to możliwość, z jednej strony, eradykacji biofilmu, a co za tym idzie szybszą i bardziej skuteczną terapię zakażeń przebiegających z wytworzeniem jego struktur. Z drugiej zaś, dałoby możliwość zapobiegania tworzeniu tej odpornej na preparaty przeciwdrobnoustrojowej struktury.

Min i wsp. analizowali aktywność i stabilność cyklicznego syntetycznego lipopeptydu CLP-4 (CLP-4 – cyclic lipopeptide 4; analog fusarycydiny) w odniesieniu do *Streptococcus mutans* – zarówno komórek planktonowych, jak i w strukturze biofilmu. Dodatkowo autorzy pracy ocenili wpływ poddanego analizie lipopeptydu na komórki ludzkie. Badacze wykazali, że lipopeptyd działał bakteriobójczo w odniesieniu do *S. mutans* i wykazywał zależną od stężenia szybkość zabijania, doprowadzając do lizy komórek tylko w wyższych stężeniach. Lipopeptyd charakteryzował się wysoką aktywnością wobec biofilmu. Autorzy pracy sugerują, że peptyd CLP-4 może mieć różny mechanizm działania, zależny w pewien sposób od jego stężenia. Przy niskich stężeniach peptyd najprawdopodobniej zakłóca niektóre procesy komórkowe niezbędne do wzrostu mikroorganizmu, przy wysokich zaś zabija komórki bakteryjne przez uszkodzenie ich błony komórkowej. Co ważne, CLP-4 wykazywał również aktywność wobec biofilmu dojrzałego. Badając wpływ lipopeptydu wobec dojrzałego biofilmu wykazano zależne od stężenia zmniejszenie żywotności *S. mutans*. Autorzy pracy podkreślają, że analizowany peptyd charakteryzował się silną aktywnością bakteriobójczą, zarówno na komórki planktonowe i te w strukturze biofilmu. Dodatkowo, co warto podkreślić, wykazywał stabilność i niską cytotoxyczność w odniesieniu do ludzkich komórek. Jak podkreślają autorzy pracy, lipo-



peptyd CLP to nowy peptyd przeciwdrobnoustrojowy z możliwością zastosowania go w przyszłości zarówno w profilaktyce, ale także leczeniu próchnicy [58].

Cirioni i wsp. analizowali aktywność lipopeptydów w połączeniu z wankomycyną w odniesieniu do gronkowca złocistego, zarówno wobec form planktonowych jak i biofilmu. Materiał do analizy stanowiły krótkie lipopeptydy (Pal-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>, Pal-Lys-Lys) oraz wankomycyna, a głównym celem pracy była ocena aktywności analizowanych związków na szczurzym modelu infekcji wywołanej przez gronkowca złocistego. Wyniki badań w stosunku do planktonowych komórek *S. aureus* wykazały synergizm przy zastosowaniu wankomycyny w połączeniu z lipopeptydem. Wszystkie badane związki charakteryzowały się zbliżoną aktywnością, natomiast stosowanie wszystkich lipopeptydów w skojarzeniu z wankomycyną poprawiło ich skuteczność. Najsilniejsze działanie wykazano w przypadku połączenia Pal-Lys-Lys-NH<sub>2</sub> z wankomycyną [13].

## 6. Podsumowanie

Ciągle rosnąca liczba wieloopornych mikroorganizmów znacznie utrudnia terapię zakażeń, szczególnie tych ciężkich i zagrażających życiu pacjenta. Jak pokazuje literatura, syntetyczne lipopeptydy przeciwdrobnoustrojowe mogą stać się bardzo dobrą alternatywą w terapii takich zakażeń i to z nimi obecnie wiąże się nadzieje w kontekście walki z organizmami wieloopornymi [43]. Istotnym wydaje się szerokie spektrum działania tych związków i ich synergistyczne oddziaływanie w połączeniu z antybiotykami konwencjonalnymi, szczególnie z tymi z utrudnionym dotarciem do wnętrza komórki bakteryjnej. Podejmowane próby modyfikowania lipidów i pozyskania nowych dają nadzieję, na zastosowanie ich w przyszłości w monoterapii, jak i w terapii skojarzonej. Do rozwiązania nadal pozostaje problem bezpieczeństwa potencjalnego stosowania lipopeptydów w praktyce klinicznej ze względu na ich możliwą cytotoksyczność jak i właściwości hemolityczne.

## Piśmiennictwo

- Avrahami D., Shai Y.: A new group of antifungal and antimicrobial lipopeptides derived from non-membrane active peptides conjugated to palmitic acid. *J. Biol. Chem.* 279, 12277–12285 (2004)
- Avrahami D., Shai Y.: Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D,L-amino acid-containing antimicrobial peptides: A plausible mode of action. *Biochemistry-US*, 42, 14946–14956 (2003)
- Avrahami D., Shai Y.: Conjugation of a magainin analogue with lipophilic acids controls hydrophobicity, solution assembly and cell selectivity. *Biochemistry-US*, 41, 2254–2263 (2002)
- Azmi F, Elliot A.G., Marasini N., Ramu S., Ziara Z., Kavanagh A.M., Blaskovich M.A.T., Cooper M.A., Skwarczynski M., Toth I.: Short cationic lipopeptides as effective antibacterial agents: Design, physicochemical properties and biological evaluation. *Bioorgan. Med. Chem.* 24, 2235–2241 (2016)
- Bahar A.A., Ren D.: Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*, 6, 1543–1575 (2013)
- Bai Y., Liu S.P., Jiang P., Zhou L., Li J., Tang C., Verma C., Mu Y.G., Beuerman R.W., Pervushin K.: Structure-dependent charge density as a determinant of antimicrobial activity of peptide analogues of defensin. *Biochemistry-US*, 48, 7229–7239 (2009)
- Bai Y., Liu S.P., Li J.G., Lakshminarayan R., Sarawathi P., Tang C., Ho D.C., Verma C., Beuerman R.W., Pervushin K.: Progressive Structuring of a Branched Antimicrobial Peptide on the Path to the Inner Membrane Target. *J. Biol. Chem.* 287, 26606–26617 (2012)
- Barańska-Rybak W., Pikuła M., Dawgul M., Kamysz W., Trzonkowski P., Roszkiewicz J.: Safety profile of antimicrobial peptides: Camel, Citropin, Protegrin, Temporin A and lipopeptide on HaCaT keratinocytes. *Acta. Pol. Pharm.* 70, 795–801 (2013)
- Barchiesi F., Giacometti A., Cirioni O., Arzeni D., Silvestri C., Kamysz W., Abbruzzetti A., Riva A., Kamysz E., Scalise G.: *In vitro* activity of the synthetic lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH(2) alone and in combination with antifungal agents against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Peptides*, 28, 1509–1513 (2007)
- Bhunja A., Mohanram H., Domadia P.N., Torres J., Bhattacharjya S.: Designed beta-Boomerang Antiendotoxic and Antimicrobial peptides. Structures and activities in lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 284, 21991–22004 (2009)
- Błażewicz I., Jaśkiewicz M., Piechowicz L., Kamysz W., Nowicki R., Barańska-Rybak W.: Rola peptydów przeciwdrobnoustrojowych w wybranych dermatozach. *Przegl. Dermatol.* 103, 227–232 (2016)
- Catiau L., Traisnel J., Delval-Dubois V., Chihib N.E., Guillochon D., Nedjar-Arroume N.: Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. *Peptides*, 32, 633–638 (2011)
- Cirioni O., Scalise G. i wsp.: The lipopeptides Pal-Lys-Lys-NH(2) and Pal-Lys-Lys soaking alone and in combination with intraperitoneal vancomycin prevent vascular graft biofilm in a subcutaneous rat pouch model of staphylococcal infection. *Peptides*, 28, 1299–1303 (2007)
- Citterio L., Franzyk H., Palarasah Y., Andersen T.E., Mateiu R.V., Gram L.: Improved *in vitro* evaluation of novel antimicrobials: potential synergy between human plasma and antibacterial peptidomimetics, AMPs and antibiotics against human pathogenic bacteria. *Res. Microbiol.* 167, 72–82 (2016)
- Cochrane A.S., Findlay B., Bakhtiary A., Acedo J.Z., Rodriguez-Lopez E.M., Mercier P., Vederas J.C.: Antimicrobial lipopeptide tridecaptin A1 selectively binds to Gram-negative lipid II. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 11561–11566 (2016)
- Dawgul M., Barańska-Rybak W., Greber K., Guzik Ł., Nowicki R., Łukasiak J., Kamysz W.: Aktywność przeciwbakteryjna krótkich lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus*. *Alergia Astma Immunologia*, 16, 31–36 (2001)
- Dawgul M., Barańska-Rybak W., Bielińska S., Nowicki R., Kamysz W.: Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na biofilm *Candida*. *Alergia Astma Immunologia*, 15, 220–225 (2010)
- Dawgul M., Maciejewska M., Jaskiewicz M., Karafova A., Kamysz W.: Antimicrobial peptides as potential tool to fight bacterial biofilm. *Acta. Pol. Pharm.* 71, 39–47 (2014)

19. Eckhard L.H., Houry-Haddad Y., Sol A., Zeharia R., Shai Y., Beyth S., Domb A.J., Bachrach G., Beyth N.: Sustained release of Antibacterial Lipopeptides from Biodegradable Polymers against Pral Pathogens, *Plos One*, 11, e0162537 (2016)
20. Fenyong She, Nimmagadda A., Teng P., Su M., Zuo X.B., Cai J.F.: Helical 1:1 alpha/Sulfono-gamma-AA Heterogeneous Peptides with Antimicrobial Activity, *Biomacromolecules*, 17, 1854–1859 (2016)
21. Ghosh C., Konai M.M., Sarkar P., Samaddar S., Haldar J.: Design simple lipidates lysines: bifurcation imparts selective antimicrobial activity. *Chem. Med. Chem.*, 11, 2367–2371 (2016)
22. Giuliani A., Rinaldi A.C.: Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2255–2266 (2011)
23. Goldberg K., Sarig H., Zakoon F., Espand R.F., Espand R.M., Mor A.: Sensitization of Gram-negative bacteria by targeting the membrane potential. *Faseb J.* 27, 3818–3826 (2013)
24. Greber K.E., Dawgul M., Kamysz W., Sawicki W.: Cationic Net Charge and Counter Ion Type as Antimicrobial Activity Determinant Factors of Short Lipopeptides. *Front. Microbiol.* Doi: 10.3389/fmicb.2017.00123 (2017)
25. Greber K.E., Ciura K., Belka M., Kawczak P., Nowakowska J., Baczek T., Sawicki W.: Characterization of antimicrobial and hemolytic properties of short synthetic cationic lipopeptides based on QSAR/QSTR approach, *Amino acids*, DOI: 10.1007/s00726-017-2530-2 (2017)
26. Horn J.N., Sengillo J.D., Lin D.J., Romo T.D., Grossfield A.: Characterization of a potent antimicrobial lipopeptide via coarse-grained molecular dynamics, *BBA.-Biomembranes*. 1818, 212–218 (2012)
27. Hu Y.G., Amin M.N., Padhee S., Wang R.S.E., Qiao Q., Bai G., Li Y.Q., Mathew A., Cao C.H., Cai J.F.: Lipidated peptidomimetics with improved antimicrobial activity. *ACS. Med. Chem. Lett.* 3, 683–686 (2012)
28. Hu Y.G., Li X.L., Sebti S.M., Chen J.D., Cai J.F.: Design and synthesis of AApeptides: a new class of peptide mimics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 1469–1471 (2011)
29. Iyer V.: A review of stapled peptides and small molecules to inhibit protein-protein interactions in cancer. *Curr. Med. Chem.* 23, 3025–3043 (2016)
30. The APD: The Antimicrobial Peptide Database, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> (24.02.2018)
31. Jammal J., Zakoon F., Kaneti G., Goldberg K., Mor A.: Sensitization of Gram-negative bacteria to rifampin and OAK combinations. *Sci. Rep.-UK*, DOI: 10.1038/srep09216
32. Jammal J., Zaknoon F., Kaneti G., Herhkovits A.S., Mor A.: Sensitization of Gram-negative Bacilli to Host Antimicrobial Proteins, *JPN. J. Infect. Dis.* 215, 1599–1607 (2017)
33. Janiszewska J. Naturalne peptydy przeciwdrobnoustrojowe w zastosowaniach biomedycznych. *Polimery*, 59, 699–707 (2014)
34. Janiszewska J., Sowinska M., Rajnisz A., Solecka J., Lacka I., Milewski S., Urbanczyk-Lipkowska Z.: Novel dendrimeric lipopeptides with antifungal activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1388–1393 (2012)
35. Jansen R.O., Sandberg-Schaal A., Frimodt-Moller N., Nielsen H.M., Franzyk H.: End group modification: Efficient tool for improving activity of antimicrobial peptide analogues towards Gram-positive bacteria, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 95, 40–46 (2015)
36. Jaskiewicz M., Neubauer D., Kamysz W.: Comparative Study on Antistaphylococcal Activity of Lipopeptides in Various Culture Media. *Antibiotics*, DOI:10.3390/antibiotics6030015 (2017)
37. Jenner Z.B., Crittenden C.M., Gonzales M., Brodbelt J.S., Bruns K.A.: Hydrocarbon-stapled lipopeptides exhibit selective antimicrobial activity, *Biopolymers*, 108, e23006 (2017)
38. Jerala R.: Synthetic lipopeptides: a novel class of anti-infectives, *Expert. Opin. Inv. Drug.* 16, 1159–1169 (2007)
39. Kamysz E., Barchiesi F. i wsp.: *In vitro* activity of the lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>, alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of *Candida* spp. *Peptides*, 32, 99–103 (2011)
40. Kamysz E., Sikorska E., Dawgul M., Tyszkowski R., Kamysz W.: Influence of dimerization of lipopeptide Laur-Orn-Orn-Cys-NH<sub>2</sub> and N-terminal peptide of human lactoferricin on biological activity. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 21, 39–46 (2015)
41. Kamysz W.: Projektowanie, synteza i badania peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Akademia Medyczna. Gdańsk, 2007
42. Kaur P., Li Y.Q., Cai F.J., Song L.K.: Selective membrane disruption mechanism of an antibacterial gamma-AApeptide defined by EPR spectroscopy. *Biophys. J.* 110, 1789–1799 (2016)
43. Koh J.J., Lin S.M., Beuerman R.W., Liu S.P.: Recent advances in synthetic lipopeptides as anti-microbial agents: design and synthetic approaches, *Amino acids*, 49, 1653–1677 (2017)
44. Kozińska A., Sitkiewicz I.: „Nowe” i „Stare” antybiotyki – mechanizmy działania i strategie poszukiwania leków przeciwbakteryjnych. *Kosmos*, 66, 109–124 (2017)
45. Lakshminarayanan R., Beuerman R.W. I wsp.: Branched peptide, B2088, disrupts the supramolecular organization of lipopolysaccharides and sensitizes the Gram-negative bacteria, *Sci. Rep.-UK*, 6, DOI: 10.1038/srep25905 (2016)
46. Lavery G., McLaughlin M., Shaw C., Gorman S.P., Gilmore B.E.: Antimicrobial Activity of Short, Synthetic Cationic Lipopeptides, *Chem. Biol. Drug. Des.* 75, 563–569 (2010)
47. Li J., Koh J.J., Liu S., Lakshminarayanan R., Verma C.S., Beuerman R.W.: Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design. *Front. Neurosci.* Doi: 10.3389/fnins.2017.00073 (2017)
48. Li J.G., Liu S.P., Lakshminarayanan R., Bai Y., Pervushin K., Verma C., Beuerman R.W.: Molecular simulations suggest how a branched antimicrobial peptide perturbs a bacterial membrane and enhances permeability, *BBA. - Biomembranes*, 1828, 1112–1121 (2013)
49. Lin D.J., Grossfield A.: Thermodynamics of antimicrobial lipopeptide binding to membranes: origins of affinity and selectivity. *Biophys. J.* 107, 1862–1872 (2014)
50. Lohan S., Cameotra S.S., Bisht G.S.: Systematic study of non-natural short cationic lipopeptides as novel broad-spectrum antimicrobial agents. *Chem. Biol. Drug. Des.* 82, 557–566 (2013)
51. Majerle A., Kidric J., Jerala R.: Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain. *J. Antimicrob. Chemoth.* 51, 1159–1165 (2003)
52. Mak P., Pohl J., Dubin A., Reed M.S., Bowers S.E., Fallon M.T., Shafer W.M.: The increased bactericidal activity of a fatty acid-modified synthetic antimicrobial peptide of human cathepsin G correlates with its enhanced capacity to interact with model membranes. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 21, 13–19 (2003)
53. Makovitzky A., Avrahami D., Shai Y.: Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 15997–16002 (2006)
54. Makovitzky A., Baram J., Shai Y.: Antimicrobial lipopolyptides composed of palmitoyl di- and tricationic peptides: *in vitro* and *in vivo* activities, self-assembly to nanostructures and plausible mode of action. *Biochemistry-US*, 47, 10630–10636 (2008)
55. Malina A., Shai Y.: Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of cationic biologically inactive peptide, *Biochem. J.* 390, 695–702 (2005)
56. Mangoni M.L., Shai Y.: Short native antimicrobial peptides and engineered ultrashort lipopeptides: similarities and differences

- in cell specificities and modes of action, *Cell Mol. Life Sci.* 68, 2267–2280 (2011)
57. Migon D., Neubauer D., Kamysz W.: Hydrocarbon Stapled Antimicrobial Peptides. *Protein J.* DOI: 10.1007/s10930-018-9755-0 (2018)
  58. Min K.R., Galvis A., Williams B., Rayala R., Cudic P., Ajdic D.: Antibacterial and Antibiofilm Activities of a Novel Synthetic Cyclic Lipopeptide against Cariogenic *Streptococcus mutans* UA159. *Antimicrob. Agents. Chemother.* DOI: 10.1128/AAC.00776-17 (2017)
  59. Mirski T., Gryko R., Bartoszcze M., Bielwaska-Drózd A., Tyszkiewicz W.: Peptydy przeciwdrobnoustrojowe – nowe możliwości zwalczania infekcji u ludzi i zwierząt. *Medycyna Wet.* 67, 517–521 (2011)
  60. Mishra B., Lushnikova T., Wang G.S.: Small lipopeptides possess anti-biofilm capability comparable to daptomycin and vancomycin. *RSC. Adv.* 5, 59758–59769 (2015)
  61. Mizerska-Dudka M., Andrejko M., Kondefe-Szerszeń M.: Przeciwwirusowe peptydy kationowe człowieka i owadów. *Post. Mikrobiol.* 50, 209–216 (2011)
  62. Mohanram H., Bhattacharjya S.: ‘Lollipop’-shaped helical structure of a hybrid antimicrobial peptide of temporin B – lipopolysaccharide binding motif and mapping cationic residues in antibacterial activity. *BBA. – Gen. Subjects.* 1860, 1362–1372 (2016)
  63. Mohanram H., Bhattacharjya S.: beta-Boomerang Antimicrobial and antiendotoxic peptides: lipidation and disulfide bond effects on activity and structure. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 7, 482–501 (2014)
  64. Nasompag S., Dechsiri P., Hongsing N., Phonimdaeng P., Daduang S., Klaynongsruang S., Camesano T.A., Patramanon R.: Effect of acyl chain length on therapeutic activity and mode of action of the C-X-KYR-NH<sub>2</sub> antimicrobial lipopeptide. *BBA. – Biomembranes*, 1848, 2351–2364 (2015)
  65. Nedjar-Arroume N., Dubois-Delval V., Adje E.Y., Traisnel J., Krier F., Mary P., Kouach M., Briand G., Guillochon D.: Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, 29, 969–977 (2008)
  66. Niu Y.H., Cai J.F. I wsp.: Lipo-gamma-AApeptides as a new class of potent and broad-spectrum antimicrobial agents. *J. Med. Chem.* 55, 4003–4009 (2012)
  67. Omardien S., Brul S., Zaat S.A.J.: Antimicrobial Activity of Cationic Antimicrobial Peptides against Gram-Positives: Current Progress Made in Understanding the Mode of Action and the Response of Bacteria. *Front. Cell. Dev. Biol.* Doi: 10.3389/fcell.2016.00111 (2016)
  68. Oren Z., Lerman J.C., Gudmundsson G.H., Agerberth B., Shai Y.: Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem. J.* 341, 501–513 (1999)
  69. Padhee S., Li Y.Q., Cai J.F.: Activity of lipo-cyclic gamma-AApeptides against biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 2565–2569 (2015)
  70. Papo N., Oren Z., Pag U., Sahl H.G., Shai Y.: The consequence of sequence alternation of an amphipathic alpha-helical antimicrobial peptide and its diastereomers. *J. Biol. Chem.* 277, 33913–33921 (2002)
  71. Radziszewsky I.S., Rotem S., Bourdetsky D., Navon-Venezia S., Carmeli Y., Mor A.: Improved antimicrobial peptides based on acyl-lysine oligomers. *Nat. Biotechnol.* 25, 657–659 (2007)
  72. Sang P., Shi Y., Teng P., Cao A.N., Xu H., Li Q., Cai J.F.: Antimicrobial AApeptides, *Curr. Top. Med. Chem.* 17, 1266–1279 (2017)
  73. Sarig H., Livne L., Held-Kutnetsov V., Zakoon F., Ivankin A., Gidalevitz D., Mor A.: A miniature mimic of host defense peptides with systematic antibacterial efficacy. *Faseb J.* 24, 1904–1913 (2010)
  74. Shai Y., Makovitzky A., Avrahami D.: Host defense peptides and lipopeptides: mode of action and potential candidates for the treatment of bacterial and fungal infections. *Curr. Protein Pept. Sci.* 7, 479–486 (2006)
  75. Sikorska E., Dawgul M., Greber K., Iłowska E., Pogorzelska A., Kamysz W.: Self-assembly and interactions of short antimicrobial lipopeptides with membrane lipids: ITC, FTIR and molecular dynamics studies. *BBA.-Biomembranes*, 1838, 2625–2634 (2014)
  76. Straus S.K., Hancock R.E.W.: Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *BBA.-Biomembranes*, 1758, 1215–1223 (2006)
  77. Teng P., Cai J.F. I wsp.: Small Antimicrobial Agents Based on Acylated Reduced Amide Scaffold, *J. Med. Chem.* 59, 7877–7887 (2016)
  78. Wang G.: Improved Methods for Classification, Prediction and Design of Antimicrobial Peptides. *Method. Mol. Cell Biol.* 1268, 43–66 (2015)
  79. Wiesner J., Vilcinskas A.: Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 1, 440–464 (2010)
  80. Wódz K., Brzezińska-Błaszczak E., Katelicydiny – endogenne peptydy przeciwdrobnoustrojowe. *Postępy Biochemii*, 61, 93–101 (2015)
  81. Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Cytryńska M.: Różnorodność peptydów przeciwdrobnoustrojowych bezkręgowców. *Kosmos*, 66, 563–574 (2017)
  82. Zhang L.J., Gallo R.L.: Antimicrobial peptides. *Curr. Biol.* 26, 14–19 (2016)
  83. Żyłowska M., Wszyńska A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Defensyny – peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej. *Post. Mikrobiol.* 50, 223–234 (2011)



Elżbieta Rosiak\*, Katarzyna Kajak-Siemaszko, Monika Trzaskowska,  
Danuta Kołożyn-Krajewska

Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w listopadzie 2017 r., zaakceptowano w lutym 2018 r.

**Streszczenie:** Pojęcie „mikrobiologia prognostyczna” po raz pierwszy w języku polskim zostało użyte w 1994 roku przez prof. Ilnicką-Olejniczak. Natomiast początki prognozowania w mikrobiologii sięgają roku 1920 kiedy to Bigelow opracował zależność logarytmiczno-liniową kinetyki śmierci mikroorganizmów. Mikrobiologia prognostyczna jest subdyscypliną mikrobiologii żywności, której zadaniem jest przewidywanie zachowań mikroorganizmów w żywności z wykorzystaniem modeli matematycznych. Model prognostyczny w przypadku mikrobiologii jest z reguły uproszczonym opisem korelacji pomiędzy zaobserwowanymi reakcjami oraz czynnikami odpowiedzialnymi za pojawienie się tych reakcji. Wyróżnia się kilka głównych koncepcji modeli (empiryczne vs mechanistyczne; stochastyczne vs deterministyczne; dynamiczne vs statyczne) w ramach których istnieją podziały modeli w zależności od rodzaju badanego drobnoustroju czy natury problemów powodowanych przez drobnoustroje (kinetyczne vs probabilistyczne), opisywanych zmiennych (modele pierwszo-, drugo i trzeciorzędowe) czy oddziaływania czynników środowiskowych na populacje drobnoustrojów (modele wzrostu, przeżywalności, inaktywacji). Do nowej generacji modeli zalicza się modele molekularne i genomowe, modele transferu, ANN, modele interakcji między gatunkami oraz modele pojedynczej komórki.

Proces powstawania matematycznego modelu wymaga koordynacji pracy i wiedzy z zakresu: mikrobiologii, statystyki, matematyki, chemii, inżynierii procesowej oraz informatyki. Wymaga również odpowiedniego sprzętu i oprogramowania komputerowego. Wyróżnia się cztery etapy postępowania przy konstrukcji modelu matematycznego: planowanie; zbieranie i analiza danych; opis matematyczny; walidacja i przechowywanie danych.

W ostatnich latach opracowano liczne programy do prognozowania w mikrobiologii FISHMAP, FSSP, Dairy Product Safety Predictor, Sym'Previus, GroPIN, Listeria Meat FDA-iRISK, TRiMiCri, Microbial Responses, GlnaFiT, FILTRET, PMM-Lab. Natomiast baza danych ComBase, jest osiągnięciem pionierskim jako narzędzie działające on-line. Niektóre programy spełniają wymagania do tworzenia Repozytoriów Modeli Bezpieczeństwa Żywności (FSMR – Food Safety Model Repositories).

1. Wprowadzenie. 2. Idea mikrobiologii prognostycznej. 3. Rys historyczny mikrobiologii prognostycznej. 4. Pojęcie modelu i koncepcje modelowania w mikrobiologii żywności. 4.1. Koncepcja 1: modele empiryczne vs mechanistyczne. 4.2. Koncepcja 2: modele statyczne vs dynamiczne. 4.3. Koncepcja 3: modele stochastyczne vs deterministyczne. 5. Podziały modeli prognostycznych. 5.1. Sieci neuronowe. 5.2. Nowa generacja modeli prognostycznych. 6. Konstrukcja modelu prognostycznego. 6.1. Planowanie doświadczenia. 6.2. Zbieranie danych. 6.3. Analiza danych. 6.4. Walidacja modelu. 7. Prognozowanie mikrobiologiczne w analizie ryzyka. 8. Podsumowanie

### Predictive microbiology of food

**Abstract:** The beginnings of predictive microbiology date back to 1920 when Bigelow developed a logarithmic-linear dependence of kinetics on the death of microorganisms. Predictive microbiology is a sub-discipline of food microbiology, whose task is to predict the behavior of microorganisms in food using mathematical models. The predictive model for microbiology is usually a simplified description of the correlation between the observed reactions and the factors responsible for the occurrence of these reactions. There are several main conceptual models (empirical vs. mechanistic, stochastic vs. deterministic, dynamic vs. static), in which there are model divisions depending on the type of examined microorganism or the nature of the problems caused by microbes (kinetic vs. probabilistic), described variables (first, secondary and tertiary) or the influence of environmental factors on microbial populations (growth, survival, inactivation). The new generations of models include molecular and genomic models, transfer models, Artificial Neural Network, interactions between species, and single cell models.

The process of creating a mathematical model requires coordination of work and the knowledge of: microbiology, statistics, mathematics, chemistry, process engineering and computer and web science. It also requires appropriate hardware and software. There are four stages in the construction of a mathematical model: planning; data collection and analysis; mathematical description; validation and storage of data.

In recent years, numerous computer software programs have been developed: FISHMAP, FSSP, Dairy Product Safety Predictor, Symbiosis, GroPIN, Listeria Meat FDA-iRISK, TRiMiCri, Microbial Responses, GlnaFiT, FILTRET, PMM-Lab. ComBase database, on the other hand, is a pioneering achievement as an on-line tool. Some programs meet the requirements for creating Food Safety Model Repositories (FSMR).

1. Introduction. 2. The idea of predictive microbiology. 3. Historical background of predictive microbiology. 4. The concept of a model and modeling concepts in food microbiology. 4.1. Concept 1: empirical vs. mechanistic models. 4.2. Concept 2: static vs. dynamic models. 4.3. Concept 3: stochastic vs. deterministic models. 5. Breakdowns of prognostic models. 5.1. Neural networks. 5.2. A new generation of predictive models. 6. The construction of the predictive model. 6.1. Planning the experiment. 6.2. Collection of data. 6.3. Data analysis. 6.4. Model validation. 7. Predictive microbiology in risk analysis. 8. Summary

---

**Słowa kluczowe:** analiza ryzyka, mikrobiologia żywności, modele prognostyczne, programy prognostyczne

**Keywords:** risks analysis, food microbiology, predictive models, predictive software

---

\* Autor korespondencyjny: Elżbieta Rosiak, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Wydział Nauk o Żywieniu Człowieka i Konsumpcji, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa; tel. 22 593 70 70; e-mail: elzbieta\_rosiak@sggw.pl

## 1. Wprowadzenie

Pojęcie „mikrobiologia prognostyczna” po raz pierwszy w języku polskim zostało użyte w 1994 roku przez prof. Ilnicką-Olejniczak [45]. Definicja wówczas użyta nie straciła na aktualności. Mikrobiologia prognostyczna była definiowana jako szczegółowa wiedza o zachowaniu się mikroorganizmów w odpowiedzi na określone warunki środowiska. Termin „prognozowanie” oznacza racjonalne, naukowe przewidywanie przyszłych zdarzeń. Należy dodać, że przewidywanie przyszłych zdarzeń odbywa się na podstawie danych historycznych, czyli w mikrobiologii żywności są to wyniki doświadczeń naukowych prowadzonych w zaplanowanych, określonych warunkach. Odpowiedź mikroorganizmów jest zatem zmienną zależną w funkcji czynników środowiska wynikających ze składu produktu, użytej technologii, sposobu pakowania. Inna definicja wskazuje, że mikrobiologia prognostyczna jest subdyscypliną mikrobiologii żywności, której zadaniem jest przewidywanie zachowań mikroorganizmów w żywności z wykorzystaniem modeli matematycznych [76].

Właściwości i użyteczność modeli znalazły odzwierciedlenie w prawie żywnościowym Unii Europejskiej. W Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. z późniejszymi zmianami w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych jest zapis nakazujący aby ustalać termin przydatności do spożycia wykorzystując modele prognostyczne dla bakterii wskaźnikowych uwzględniając krytyczne czynniki wzrostu lub przeżywalności drobnoustrojów [86].

## 2. Idea mikrobiologii prognostycznej

Mikrobiologia żywności początkowo była zdominowana badaniami mikrobiologicznymi dotyczącymi konkretnych produktów, bez próby zrozumienia, co wpływa na wzrost mikroorganizmów. Uważano, że żywność sama w sobie jest głównym czynnikiem, warunkującym obecność drobnoustrojów. Koncepcja mikrobiologii prognostycznej zakłada, że obecność mikroorganizmów w żywności jest wynikiem kombinacji różnych czynników środowiska, przede wszystkim: temperatury, pH i aktywności wody [84].

Ideą mikrobiologii prognostycznej jest założenie, że odpowiedź mikroorganizmów na czynniki środowiska, które determinują ich wzrost jest powtarzalna. Zatem, w powtarzalnych warunkach środowiska zdefiniowanych: surowcem, technologią przetwarzania, materiałem i atmosferą pakowania odpowiedź drobnoustrojów jest przewidywalna i daje się opisać przy

użyciu modeli matematycznych. Modele takie mogą być stosowane w szerokim zakresie w odniesieniu do grup żywności, a nie tylko do pojedynczych produktów. Zostało dowiedzione, iż modele prognostyczne dostarczają wyników co najmniej 1000 razy szybciej niż challenge tests, polegające na szacowaniu okresu trwałości produktu w tych samych warunkach, jakie panują podczas dystrybucji czy przechowywania żywności, na podstawie liczby mikroorganizmów wyznaczających poziom akceptowalny lub poziom zepsucia [14, 84].

## 3. Rys historyczny mikrobiologii prognostycznej

Pierwsze modele prognostyczne opisujące zależność logarytmiczno-liniową kinetyki śmierci mikroorganizmów zostały opracowane przez Bigelowa w 1920 i 1921 roku [5] oraz Esty i Meyera w 1922 roku. W roku 1922 Esty i Meyer opisali inaktywację termiczną przetrwalników *Clostridium botulinum* typu A z wykorzystaniem modelu logarytmiczno-liniowego, który wciąż jest stosowany w produkcji żywności sterylizowanej w puszkach. Model ten określa tempo inaktywacji bakterii przy stałej temperaturze [60].

Pierwsza wzmianka w literaturze dotycząca koncepcji mikrobiologii prognostycznej pochodzi z 1937 roku. Dotyczy badań prowadzonych przez Scott'a, który wiedzę o tempie wzrostu wybranych mikroorganizmów w różnych temperaturach uważał za istotną w badaniach dotyczących zepsucia wołowiny. W oparciu o swoje badania zdefiniował prognozowanie mikrobiologiczne jako wiedzę o wzroście niektórych mikroorganizmów w różnych temperaturach na przykładzie chłodzonego mięsa wołowego. Scott prowadził również badania dotyczące specyficznego tempa inaktywacji drobnoustrojów zależnego od dostępności wody, dziś określanego jako aktywność wody oraz od poziomu dwutlenku węgla. Badania Scott'a bez odpowiedniej technologii takiej jak: rejestratory danych, komputery i internet były skazane na porażkę. Musiały czekać na czasy kiedy te innowacje zostaną opracowane i łatwo dostępne.

Zatem za erę „nowoczesnego” prognozowania mikrobiologicznego można uznać początek lat 60. XX wieku [66, 13]. Badania nad procesem psucia się żywności prowadzone przez australijskich naukowców, Olley'a i Ratkowsky'ego, doprowadziły do sformułowania w 1973 roku matematycznej zależności wpływu temperatury na relatywne tempo psucia się żywności. Wykreślono S-kształtną krzywą, którą nazwano „krzywą zepsucia” (general spoilage curve) [68]. Kształt litery „S” odpowiada dwóm fazom: początkowej fazie przyspieszenia (fragment wklęsły) oraz końcowej fazie opóźnienia (fragment wypukły) [65].

#### 4. Pojęcie modelu i koncepcje modelowania w mikrobiologii żywności

Model może być zdefiniowany jako: opis systemu, teorii lub zjawiska. Wyjaśnia ich znane lub sugerowane właściwości i może być wykorzystywany do dalszych badań nad tymi właściwościami. W powszechnym rozumieniu model jest mniejszą repliką prawdziwego obiektu. Jednak w przypadku nauki, inżynierii, finansów itp., model jest z reguły uproszczonym opisem korelacji pomiędzy zaobserwowanymi reakcjami oraz czynnikami odpowiedzialnymi za pojawienie się tych reakcji. Opis ten może być wyrażony za pomocą słów lub ilościowo za pomocą jednego lub kilku równań matematycznych. Zatem model matematyczny może po prostu opisywać zbiór danych, bądź też może stanowić hipotezę lub serię hipotez, dotyczących podstawowych relacji pomiędzy niezależnymi zmiennymi [65].

W mikrobiologii prognostycznej nie istnieje jednoznaczny i ostateczny podział modeli prognostycznych. Wyróżnia się kilka głównych koncepcji modeli (empiryczne vs mechanistyczne; stochastyczne vs deterministyczne; dynamiczne vs statyczne) w ramach których istnieją podziały modeli w zależności od rodzaju badanego drobnoustroju czy natury problemów powodowanych przez drobnoustroje (kinetyczne vs probabilistyczne), opisywanych zmiennych (modele pierwszo-, drugo i trzeciorzędowe) czy oddziaływania czynników środowiskowych na populacje drobnoustrojów (modele wzrostu, przeżywalności, inaktywacji). W klasyfikacji spotyka się modele, znajdujące się na pograniczu, które łączą różne podejścia, np. modele pojedynczych komórek łączą podejście stochastyczne i mechanistyczne realizowane w warunkach statycznych lub dynamicznych.

##### 4.1. Koncepcja 1: modele empiryczne vs mechanistyczne

Modele empiryczne zwane inaczej modelami „black box” opisują obserwowaną odpowiedź populacji mikroorganizmów na czynniki środowiskowe. Dopasowanie tradycyjnych zależności matematycznych do przebiegu danych empirycznych jest jedynym kryterium oceny modelu. Modele wielomianowe powierzchni odpowiedzi, model Gompertza, sieci neuronowe czy model pierwiastka kwadratowego to najlepiej poznane modele empiryczne. Modele mechanistyczne opierają się na zrozumieniu podstawowych procesów biochemicznych i wewnątrzkomórkowych, które kontrolują zachowanie komórek. Dlatego aktualna wiedza mikrobiologiczna może być niewystarczająca, do opracowania kompletnego modelu mechanistycznego. Bardzo często powstają modele łączące cechy mechanistyczne i elementy empiryczne [8, 31, 65, 66].

##### 4.2. Koncepcja 2: modele statyczne vs dynamiczne

Dane do konstruowania pierwszych modeli prognostycznych uzyskiwano w warunkach statycznych. Rzeczywiste warunki panujące w żywności podlegają zmianom w czasie, zatem potrzebne są modele uwzględniające tę zmienność, czyli modele dynamiczne. Istnieją różne czynniki, które można dodawać jako elementy składowe do podstawowego modelu dynamicznego, mianowicie: wahania warunków środowiskowych, zmienność stanu fizjologicznego komórek, interakcje i produkcję metabolitów mających wpływ na wzrost bakterii [10].

Równanie elementarne opisujące model dynamiczny można przedstawić następująco:

$$\begin{aligned} dN_i(t)/dt = & \\ = m_i \cdot N_i(t), N_j(t), fact(t), chem(t), phys(t) \cdot N_i(t) & \end{aligned} \quad (1)$$

gdzie:

$N_i(t)$  reprezentuje liczbę komórek drobnoustrojów,  $\mu_i$  ( $h^{-1}$ ) jest specyficznym współczynnikiem wynikającym z interakcji wewnątrz

( $N_j$ ) i między ( $N_j$ ) gatunkami drobnoustrojów, ( $fact$ ) fizykochemiczne uwarunkowania środowiskowe, ( $phys$ ) fizjologiczny stan komórek oraz ( $chem$ ) wytwarzanie metabolitów.

Współczynnik szybkości wzrostu/inaktywacji w zmieniających się w czasie warunkach zostanie obliczony przez model, jeśli odpowiednio  $\mu_i > 0$  lub  $\mu_i < 0$ . Dla każdego czynnika uwzględnionego w modelu należy opracować dodatkowe równania matematyczne opisujące jego zmienność w czasie [76].

##### 4.3. Koncepcja 3: modele stochastyczne vs deterministyczne

Deterministyczne modele matematyczne opisują zachowanie dużych populacji drobnoustrojów jako całości bez uwzględnienia odpowiedzi poszczególnych komórek drobnoustrojów na wybrane czynniki środowiskowe [55] natomiast podejście stochastyczne uwzględnia wpływ zmienności i niepewności związanych z odpowiedzią, na warunki środowiskowe, pojedynczej komórki w całej populacji mikroorganizmów [24].

#### 5. Podział modeli prognostycznych

Pierwszy podział ze względu na złożoność zależności pomiędzy zmiennymi uwzględnionymi w modelu obejmuje podział na modele pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowe. W modelach pierwszorzędowych bierze się pod uwagę zmianę liczby mikroorganizmów w czasie (wzrost lub inaktywacja) oraz wyznacza się parametry kinetyczne (lag faza, współczynnik szybkości wzrostu,

czas do osiągnięcia fazy stacjonarnej, tempo inaktywacji). Natomiast modele drugorzędowe opisują relację parametrów kinetycznych pochodzących z modelu pierwotnego do zmiennych środowiskowych (np. temperatura). Modele trzeciorzędowe to implementacja obu typów modeli w narzędziach komputerowych oraz bazach danych on-line [31, 43, 74, 98].

Najpowszechniej wykorzystywane modele pierwszorzędowe to funkcja Gompertza, logistyczna, Standarda (po reparametryzacji) oraz funkcja Schnuta'a i Richardsa [100]. Konsekwencją badań prowadzonych przez Zwieteringa i Gibsona, którzy porównali możliwości ww. funkcji do modelowania danych otrzymanych z hodowli okresowej *Lactobacillus plantarum* oraz innych bakterii było stwierdzenie że w większości przypadków modelem najlepiej opisującym i dopasującym się do danych jak również łatwym w zastosowaniu był zmodyfikowany model Gompertza [10, 31, 68, 74, 100].

Zmodyfikowana funkcja Gompertza (po reparametryzacji) jest powszechnie używanym empirycznym, pierwszorzędowym modelem opisującym zmianę liczby mikroorganizmów w czasie, w określonym środowisku. Dodatkowy parametr A reprezentuje dolną wartość asymptoty log liczby bakterii ( $\log \{N_{(-\infty)}\}$ ), co w niektórych przypadkach, kiedy wartość parametru A jest mniejsza niż  $N_{(0)}$  daje lepsze dopasowanie funkcji i oszacowanie początkowej gęstości komórek [67]. Na podstawie modeli pierwszorzędowych można uzyskać parametry kinetyczne służące do opisu populacji drobnoustrojów takie jak: czas generacji, czas trwania lag fazy, maksymalna szybkość wzrostu wykładniczego, czas do osiągnięcia specyficznej liczebności populacji [16, 68, 95]. Obecnie wielu autorów wykorzystuje model Gompertza (2) do obliczania terminu przydatności do spożycia produktów żywnościowych [14, 30, 40, 49, 56].

$$\text{Log } N_{(t)} = A + D \exp\{-\exp[-B(t-M)]\} \quad (2)$$

gdzie:

t = czas [h],

$N_{(t)}$  = liczebność populacji w czasie t [ $\log$  (jtk/ml)],

A = wartość dolnej asymptoty (np.  $\text{Log } N_{(-\infty)}$ ) [ $\log$  (jtk/ml)],

D = różnica pomiędzy górną i dolną wartością asymptoty [np.  $\text{Log } N_{(\infty)} - \text{Log } N_{(-\infty)}$ ] [ $\log$  (jtk/ml)],

M = czas po którym wykładnicza szybkość wzrostu jest maksymalna [h],

B = oznacza tangens kąta nachylenia krzywej wzrostu w czasie M.

Mimo powszechnego wykorzystania model Gompertza ma słabe strony, do których zalicza się m.in.: nie horyzontalny przebieg i szacowanie ujemnej wartości lag fazy, wyrażanie koncentracji komórek drobnoustrojów w skali logarytmicznej, nieprecyzyjne wyrażanie maksymalnego tempa wzrostu populacji punktem

przebiegu krzywej co sugeruje, że maksymalny współczynnik wzrostu może być wyższy niż oszacowany, wyrażenie wykładniczej fazy wzrostu funkcją nieliniową [9, 10, 97, 98].

W modelach drugorzędowych można wyróżnić dwa sposoby opisywania relacji parametrów kinetycznych do czynników środowiskowych: (1) wpływ kilku czynników środowiskowych jest opisany jednocześnie najczęściej przez funkcje wielomianowe niższego rzędu (pierwszego i drugiego rzędu; rzadziej trzeciego rzędu); (2) czynniki środowiskowe wpływające na populację drobnoustrojów są indywidualnie modelowane. Wśród tych modeli najczęściej wykorzystuje się model pierwiastka kwadratowego, model gamma, model parametrów kardynalnych oraz funkcję wielomianową (tzw. powierzchnie odpowiedzi) [74, 76].

Modele trzeciorzędowe nazywane są modelami zintegrowanymi w prognostycznych programach komputerowych [31, 98]. Wizualizują użytkownikowi czynniki środowiskowe takie jak:  $a_w$ , pH, temperatura, wprowadzone do matematycznego modelu i pozwalają na uzyskanie wyników prognozowania obliczonych na podstawie pierwszo i drugorzędowych modeli. Modele pierwszorzędowe określają zmiany liczby mikroorganizmów w czasie, natomiast modele drugorzędowe wskazują jak wartości wyliczone przez model pierwszorzędowy zmieniają się pod wpływem jednego lub kilku z czynników środowiskowych.

Pojawienie się w latach 80. XX wieku wydajnych komputerów umożliwiło szybsze wykonanie skomplikowanych obliczeń matematycznych. Dzięki temu możliwe było opracowanie modeli matematycznych z wykorzystaniem wieloetapowych algorytmów szacujących parametry modelu. Zaowocowało to lawinowym rozwojem tej dziedziny mikrobiologii żywności. W tabeli I przedstawiono dostępne obecnie programy komputerowe, które integrują modele w użyteczne dla użytkownika narzędzie i wizualizuje dane pierwotne, na których modele zostały zbudowane [62]. Chociaż pierwsze wersje programów do prognozowania w mikrobiologii były samodzielnymi narzędziami, obecnie dominują wersje programów on-line dostępne dla wszystkich i wszędzie przez Internet (tab. I) [43, 53, 80, 93].

Pionierskim programem był Pathogen Modeling Program (PMP), opracowany przez dwa Departamenty Rolnictwa Stanów Zjednoczonych (USDA): Agricultural Research Service (ARS) i Eastern Regional Research Center (ERRC), który jest odpowiedzialny za tworzenie i realizację polityki rolnej i żywnościowej rządu federalnego. Jest to najstarsze opracowanie wykorzystujące jako podstawę modele prognostyczne. Od 1990 roku PMP był rozpowszechniany w różnych formach: od pojedynczych arkuszy kalkulacyjnych, programów dostępnych komercyjnie, do samodzielnich programów dostępnych w Internecie nieodpłatnie. PMP obej-



muje pakiet modeli, które mogą być wykorzystane do przewidywania wzrostu i inaktywacji termicznej i nietermicznej (pasteryzacja i radiacja) przede wszystkim bakterii patogennych w żywności np. *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., Modele pierwszorzędowe wykorzystują równanie Gompertz'a [100]. Użytkownik dysponuje oszacowanymi parametrami opisującymi populację: czasem trwania lag fazy, czasem generacji, wykresem wzrostu lub inaktywacji z uwzględnieniem przedziału ufności w wybranych warunkach środowiska [20, 31, 43, 44]. Obecnie dostępna jest wersja 7.0 do ściągnię-

cia ze strony <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=11550>.

W ostatnich latach opracowano liczne programy do prognozowania w mikrobiologii żywności których przegląd zawiera Tab. I. Programy takie jak FISHMAP, FSSP, Dairy Product Safety Predictor, Sym'Previus, GroPIN, Listeria Meat Model opracowano z myślą o konkretnych mikroorganizmach w konkretnych matrycach. W opracowaniu innych (FDA-iRISK, TRiMiCri) priorytetem były modele wykorzystywane w ocenie ryzyka. Oszacowanie typu wzrost/brak wzrostu to przedmiot uwagi programu Microbial Responses Viewer [80, 87].

Table I  
Przegląd programów komputerowych do prognozowania w mikrobiologii żywności

Nazwa	Dostępność/link	Data opracowania	Affiliacja	Koncepcja modelowania	Grupa odbiorców
Baseline	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.baselineapp.com">www.baselineapp.com</a>	2012	University of Cordoba, Hiszpania	Deterministyczna	BŻ, N, S
ComBase	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.combase.cc">www.combase.cc</a>	2004	Institut of Food research, UK	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
Dairy Products Safety Predictor	Komercyjny, dostęp internetowy <a href="http://www.aqr.maisondulait.fr">www.aqr.maisondulait.fr</a>	2012	ACTALIA, Francja; French Dairy Interbranch Organization, Francja	Stochastyczna	BŻ
FDA-iRISK	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.irisk.foodrisk.org">www.irisk.foodrisk.org</a>	2012	Food and Drug Administration, USA	Stochastyczna	BŻ, N, S, ORz
FILTREX	Bezpłatny, do pobrania <a href="http://www.w3.jouy.inra.fr/unites/miaj/public/logiciels/filtrex/">www.w3.jouy.inra.fr/unites/miaj/public/logiciels/filtrex/</a>	2013	INRA, National Institute for Agronomy Research, Francja	Stochastyczna	N, S
FISHMAP	Bezpłatny, do pobrania <a href="http://www.azi.es/dowlands/dowlands/fishmap/#tab-description">www.azi.es/dowlands/dowlands/fishmap/#tab-description</a>	2011	AZTI, Transforming Science into Business, Hiszpania	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
Food Spoilage and Safety Predictor (FSSP)	Bezpłatny, do pobrania <a href="http://www.fssp.food.dtu.dk">www.fssp.food.dtu.dk</a>	1999	Technical University of Denmark, Dania	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
GlnaFit	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.cit.kluven.ve/biotec/dowland.php">www.cit.kluven.ve/biotec/dowland.php</a>	2003	Catholic University of Leuven, Belgia	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
GroPIN	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.aua.gr/psomas/gropin">www.aua.gr/psomas/gropin</a>	2013	Agricultural University of Athens, Grecja	Deterministyczna i stochastyczna	BŻ, N, S, ORz
Listeria Meat Model	Komercyjny, dostęp internetowy <a href="http://www.cpmf2.be">www.cpmf2.be</a>	2012	Catholic University of Leuven, Belgia	Deterministyczna	BŻ, ORz
MicroHibro	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.microhibro.com">www.microhibro.com</a>	2011	University of Cordoba, Hiszpania	Stochastyczna	BŻ, N, S, ORz
MRV, Microbial Responses Viewer	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.mrviewer.info/">www.mrviewer.info/</a>	2008	National Food Research Institute, Japonia	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
NIZO Premia	Komercyjny, brak dostępu internetowego	1995	NIZO Food Research, The Netherlands	Deterministyczna	BŻ
PMM-Lab	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.sourceforge.net/projects/pmmlab/">www.sourceforge.net/projects/pmmlab/</a>	2012	Federal Institute for Risk Assessment, Dania	Deterministyczna	N, S, ORz
Microbial Safety in Meat Products	Bezpłatny, dostęp internetowy <a href="http://www.dmrpredict.dk">www.dmrpredict.dk</a>	2006	Danish Meat Research Institute, Dania	Deterministyczna	BŻ, N, S, ORz
Sym'Previus	Komercyjny, dostęp internetowy <a href="http://www.symprevius.org">www.symprevius.org</a>	2003	Adria Development, Francja	Deterministyczna i stochastyczna	BŻ, N, S, ORz

Do generowania modeli prognostycznych opracowano programy: GlnaFiT, FILTREX, PMM-Lab.

Wymienione programy funkcjonują jako samodzielne narzędzia do prognozowania, jednak pojawienie się ComBase, jako programu i bazy danych działających on-line było osiągnięciem pionierskim dzięki któremu publikowane i niepublikowane modele są dostępne w sieci Internet. ComBase ma także ograniczenia polegające na tym, że ostateczny użytkownik nie może samodzielnie wprowadzić nowego modelu do bazy bez wiedzy i zgody twórcy. Ponadto nie można wyeksportować wykorzystanego do prognozowania modelu, a jedynie prognozy uzyskane on-line [51]. W latach 2011–2012 pojawiły się nowe programy dostępne on-line: MicroHibro i Basaline, które umożliwiają zbudowanie modeli zdefiniowanych przez użytkownika do prognozowania wzrostu lub inaktywacji dowolnego drobnoustroju w żywności. Jednak podobnie jak w ComBase użytkownik nie ma możliwości wyeksportowania uzyskanego w MicroHibro i Basaline modelu do innego narzędzia prognostycznego.

Nowatorskim rozwiązaniem i zarazem przyszłością mikrobiologii prognostycznej staje się tworzenie Repozytoriów Modeli Bezpieczeństwa Żywności (FSMR – Food Safety Model Repositories) czyli modułów, które umożliwiają eksport modeli prognostycznych do wystandaryzowanego formatu wymiany danych. Ponadto FSMR są przykładem podejścia opartego na przepływie zadań co zapewnia przejrzystość przetwarzania danych oraz ułatwia współpracę i kontrolę jakości wśród różnych naukowców. Program PPM-Lab został wybrany jako prototypowe narzędzie do tworzenia przykładowych modeli wzrostu, inaktywacji i przeżywalności *Salmonella* w mięsie wołowym dla Repozytorium Modeli Bezpieczeństwa Żywności [80].

Inny podział modeli uwzględnia modele wzrostu, przeżywalności i inaktywacji. Modele wzrostu stanowią najlepiej dopracowaną grupę modeli. Należą do nich m.in. omówione poniżej modele typu Arrheniusa i typu Bělehrádk'a. Wśród najczęściej stosowanych funkcji opisujących wzrost mikroorganizmów znajdują się zmodyfikowany model logistyczny i zmodyfikowana funkcja Gompertza.

Modele inaktywacji i przeżywalności charakteryzują się tym, że opisują redukcję liczby drobnoustrojów w czasie, koncentrując się na fazie śmierci populacji. Do opisu inaktywacji termicznej lub nietermicznej najczęściej stosuje się model log-liniowy (model Bigelow'a), model Weibull'a i modele „ramienia/ogona” (shoulder/tail model) [76].

Twórcy modelu logarytmiczno-liniowego byli pionierami prognozowania mikrobiologicznego żywności dzięki temu, że na wykresie półlogarytmicznym na osi Y umieścili logarytm liczby bakterii a na osi X temperaturę. Uzyskane równanie matematyczne opisujące

dane pozwala obliczyć wartość D (czas dziesięciokrotnej redukcji). Zmiana temperatury pozwalająca uzyskać wartość D jest określana jako wartość  $z$  [31].

Model Weibull'a jest pierwszorzędowym modelem inaktywacji bakterii wegetatywnych. Model ten zakłada nieliniowość krzywych przeżycia półlogarytmicznego w procesie inaktywacji poprzez uwzględnienie zmian biologicznych w odniesieniu do inaktywacji termicznej i jest w zasadzie statystycznym modelem rozkładu czasów inaktywacji. Model Weibull'a uwzględnia dwa parametry:  $a$  (czas) i bezwymiarowy parametr kształtu –  $b$ . Logarytm rozkładu parametru  $a$  zależy liniowo od temperatury; natomiast zależność parametru  $b$  od czasu nie jest dobrze ustalona. Chociaż model Weibull'a ma charakter empiryczny, może opisywać efekty fizjologiczne.  $b < 1$  wskazuje, że pozostałe po inaktywacji komórki mają zdolność adaptacji do warunków stresowych, podczas gdy  $b > 1$  wskazuje, że pozostałe po inaktywacji komórki są uszkodzone. Ta zmienność parametrów decyduje o większej elastyczności modelu Weibull'a niż modelu liniowego bazującego na wartości D. Funkcja dystrybucji Weibull'a (która jest blisko związana z rozkładem gamma, rozkładem wartości ekstremalnych i rozkładami log-normalnymi) jest również szeroko stosowana w inżynierii niezawodności, w celu opisu czasu awarii w systemach elektronicznych i mechanicznych oraz jest odpowiednia do analizy danych o przetrwaniu, tj. czasu do usterki po zastosowaniu obciążenia [76].

Model ramienia/ogona opisuje stan populacji przed inaktywacją, kiedy krzywa wzrostu jest płaska i nie zachodzą zmiany liczby mikroorganizmów. Proces inaktywacji powoduje zamieranie drobnoustrojów, zatem krzywa przyjmuje kształt „ramienia”. „Ogon” to fragment krzywej, który reprezentuje przeżycie drobnoustrojów po zastosowaniu procesu inaktywacji; dotyczy populacji wykazującej większą oporność, nie podlegających inaktywacji opisanej modelem log-liniowym [76]. Modele inaktywacji pozwalają ocenić efektywność stosowania różnych procesów technologicznych na inaktywację mikroorganizmów.

Modele prognostyczne mogą być także podzielone na kinetyczne i probabilistyczne. Modele kinetyczne stosowane są zwykle w przypadku nieprzetrwalnikujących patogenów, zwłaszcza tych, które stają się niebezpieczne dopiero po przekroczeniu pewnego progu wzrostu jak np. bakterie określane jako specyficzne organizmy psujące (SSO – Specific Spoilage Organism) [14, 30].

Powszechnie spotykane są dwa typy modeli opisujących kinetykę wzrostu mikroorganizmów pod wpływem temperatury i innych czynników środowiska. Pierwsze oparte są na równaniu Swante Arrheniusa opracowanym w 1889 roku, określającym wpływ temperatury na szybkość reakcji chemicznej, które wywodzi się z równania van't Hoff'a opisującego wpływ temperatury na termodynamikę gazów. Druga grupa modeli bazuje

na modelu pierwotnie opracowanym przez Jana Bělehrádka w 1930 roku. Funkcja wyraża wpływ temperatury na procesy biologiczne i jest rozwijana we współczesnych modelach Ratkowsky'ego [25, 68, 74].

Model zaprezentowany przez Bělehrádka w 1930 r. uwzględnił zero „biologiczne” (temperatura w której i poniżej której żaden wzrost drobnoustrojów nie jest możliwy).

Współczesny zapis modelu Bělehrádka:

$$k = a(t - t_0)^d \quad (3)$$

gdzie:  $k$  = stała szybkości wzrostu,  
 $a, d$  = parametry do dopasowania,  
 $t_0$  = matematyczny ekwiwalent  $a$ .

Do najbardziej znanych modeli typu Bělehrádka należy model pierwiastka kwadratowego Ratkowsky'ego; który dla pełnego zakresu temperatur ma postać:

$$\sqrt{k} = b(T - T_{\min}) \{1 - \exp [c(T - T_{\max})]\} \quad (4)$$

gdzie:  $T$  = temperatura inkubacji [°C],  
 $k$  = stała szybkości wzrostu,  
 $T_{\min}, T_{\max}$  = minimalna i maksymalna temperatura wzrostu [°C],  
 $b, c$  = parametry do dopasowania.

Modyfikacje podstawowej formuły modelu doprowadziły do uwzględnienia wpływu temperatury, aktywności wody i pH na wzrost mikroorganizmów [16, 68, 74, 83, 84, 95, 97].

Druga grupa modeli kinetycznych wyjaśniająca wpływ temperatury na szybkość wzrostu to modele Arrhenius'a i jego modyfikacje. Najprostszy model typu Arrhenius'a stosowany w mikrobiologii prognostycznej ma postać:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (5)$$

gdzie:  $k$  = stała szybkości wzrostu,  
 $E_a$  = energia aktywacji  $\text{KJ mol}^{-1}$ ,  
 $T$  = temperatura bezwzględna [C],  
 $R$  = stała gazowa:  $8,314 \text{ J K}^{-1} - \text{mol}^{-1}$ ,  
 $A$  = parametr do dopasowania.

W podstawowej postaci, wielu autorów uznało zależność Arrhenius'a jako nieodpowiednią do opisu szybkości reakcji w złożonych systemach biologicznych. Dlatego powstały liczne modyfikacje, podstawowej zależności z rozszerzeniem zastosowania dla niskich i wysokich temperatur. Za jedną z najlepszych modyfikacji wzoru Arrhenius'a uznaje się liniową modyfikację Davey'a [2, 3, 68, 83, 85].

Wzór Arrhenius'a z liniową modyfikacją Davey'a:

$$\ln k = C_0 + \frac{C_1}{T} + \frac{C_2}{T^2} \quad (6)$$

gdzie:  $k$  = współczynnik szybkości wzrostu,  
 $T$  = temperatura [°C],  
 $C_0, C_1, C_2$  = parametry do dopasowania.

Kolejna modyfikacja modelu oprócz temperatury uwzględnia aktywność wody jako czynnik wpływający na wzrost mikroorganizmów: [16, 68, 83, 85, 25, 26–28, 74].

Modele oparte na prawdopodobieństwie stosowane są zwykle w przypadku bakterii przetrwalnikujących, zwłaszcza *C. botulinum*, w przypadku których nawet najmniejszy wzrost jest niebezpieczny. Większość modeli opartych na prawdopodobieństwie wywodzi się z wzoru Hauschilda, służącego do obliczania prawdopodobieństwa wykiełkowania pojedynczego przetrwalnika *C. botulinum* i namnażania się potomnych komórek wegetatywnych, do poziomu, który jest niezbędny do wytworzenia toksyny botulinowej.

## 5.1. Sieci neuronowe

Sieci neuronowe mogą być stosowane wszędzie tam, gdzie pojawiają się zadania związane z predykcją, klasyfikacją czy sterowaniem [37]. Sieci neuronowe są wyrafinowaną techniką modelowania, zdolną do odwzorowywania złożonych funkcji, mających charakter nieliniowy, dzięki czemu mogą być wykorzystywane w prognozowaniu mikrobiologicznej żywności, w której często nie ma podstaw do aproksymacji liniowej występujących zjawisk i procesów biologicznych.

Model sztucznej sieci neuronowej (ANN – Artificial Neural Network) został zainspirowany fizyczną strukturą i mechanizmem działania układu biologicznego (Najjar i wsp., 1997). Definiowany jest jako obliczeniowy model statystyczny, łączący ze sobą pojedyncze elementy, nazwane neuronami lub węzłami w sieć. Sieć neuronów zorganizowana jest w warstwy: wejściową, ukrytą oraz wyjściową, które są w stanie dokonać równoległych obliczeń. W mikrobiologii prognostycznej znalazły zastosowanie dzięki swojej elastyczności i generowaniu danych charakteryzujących się wysokim stopniem dokładności w dopasowywaniu do danych eksperymentalnych, w porównaniu z innymi technikami regresji, a także dużej tolerancji na dane nieprecyzyjne (noise data) [12, 35, 71]. Na podstawie zgromadzonych reprezentatywnych danych, pokazujących zmienność zmiennej zależnej, uruchamiany jest algorytm uczenia powtarzany do momentu uzyskania satysfakcjonujących rozwiązań. Jego celem jest automatyczne wytworzenie potrzebnej struktury sieci, następnie w wyniku uczenia zbędne połączenia i neurony są usuwane. W oparciu o nie sieć realizuje wszystkie funkcje związane z eksploatacją utworzonego modelu [35, 91, 92].

Do najpopularniejszych architektur sieciowych należy perceptron wielowarstwowy (MLP – Multilayer Perceptron), który wykorzystuje liniową funkcję potencjału postsynaptycznego – PSP (Postsynaptic Potential function). Działanie sieci MLP polega na wyznaczeniu

ważonych sum wartości wejściowych, które są argumentem, zwykle nieliniowej, funkcji aktywacji. Standardową funkcją aktywacji dla sieci MLP jest funkcja logistyczna (nazywana również często, ze względu na kształt, sigmoidalną) stosowana domyślnie we wszystkich warstwach sieci. Wyjątek stanowią sieci WNN (Wavelet Neural Network) w których zamiast funkcji sigmoidalnej w warstwach ukrytych wykorzystywana jest funkcja nieliniowej transformacji falowej [4]. Sieci MLP mogą być uczone za pomocą wielu algorytmów: algorytmu gradientów sprzężonych, Quasi-Newtona, Levenberga-Marquardta, wstecznej propagacji błędów (back-propagation), szybkiej propagacji lub algorytmu Delta-bar-Delta. Sieci o tej architekturze znajdują liczne zastosowania w mikrobiologii prognostycznej żywności, zarówno do modelowania założonych zależności wzrostu bakterii w czasie jak również prognozowania parametrów wzrostu takich jak lag faza czy wykładnicze tempo wzrostu oraz wpływu zewnętrznych biochemicznych i środowiskowych czynników warunkujących wzrost [6, 36, 40, 47].

Innym rodzajem sieci wykorzystywanym w mikrobiologii prognostycznej są sieci realizujące regresję uogólnioną – GRNN (Generalized Regression Neural Network) oraz Sieci Neuronowe o Radialnych Funkcjach Bazowych (RBF) [36]. Sieci te uczą się w bardzo krótkim czasie, ale charakteryzują się tendencją do tworzenia struktur o dużych rozmiarach, co powoduje, że ich działanie podczas normalnej eksploatacji jest bardzo powolne. Natomiast sieci o radialnych funkcjach bazowych (RBF) mają w warstwie wejściowej i wyjściowej neurony liniowe, natomiast w warstwie ukrytej neurony radialne. W neuronach warstwy radialnej stosowane są wykładnicze funkcje aktywacji (radialne funkcje bazowe), zaś w warstwie wyjściowej neurony wyposażone są w liniowe funkcje aktywacji. Sieci o radialnych funkcjach bazowych uczą się stosunkowo szybko i mają tę zaletę, że nigdy nie dokonują ekstrapolacji funkcji na zbyt duże odległości od znanych danych, są więc w pewnym sensie najbezpieczniejsze. Jednakże z reguły są one znacznie większe niż rozwiązujące te same zadania sieci MLP, co jest bardziej czasochłonne [36].

## 5.2. Nowa generacja modeli prognostycznych

Do nowej generacji modeli zalicza się modele molekularne i genomowe, modele transferu, modele interakcji między gatunkami oraz modele pojedynczej komórki.

Rozwój biologii molekularnej i uzyskane w wyniku tych analiz dane dają nowe możliwości bardziej mechanistycznego opisu zachowania drobnoustrojów w żywności. Prowadzi to do powstania bardziej niezawodnych i solidnych modeli, które nazywa się modelami molekularnymi [15]. Biologia systemowa ma na celu zrozumienie

nie relacji genotyp-fenotyp. Modele matematyczne są niezbędne do opisanie tych relacji i stanowią kluczowe narzędzie, które umożliwia dogłębne zrozumienie, jak w rzeczywistości działają systemy biologiczne [42].

Obecnie uwaga skupia się na opracowywaniu modeli uwzględniających przenoszenie patogenu wzdłuż łańcucha żywnościowego (modele transferu) lub prawdopodobieństwo, że ten patogen może rosnąć lub nie rosnąć w zadanych warunkach środowiskowych (modele wzrostu/brak wzrostu). Modele wzrostu/brak wzrostu mogą być skutecznie stosowane, jeśli wymagane są dane dotyczące obecności/nieobecności patogenu. Szacuje się również przeżycie przez bakterie patogenne procesu inaktywacji i transfer między różnymi rodzajami żywności oraz na styku powierzchni roboczych/powietrza z żywnością [77]. W badaniach Pérez-Rodríguez i wsp. [78] bakterie patogenne *E. coli* O157:H7 i *Staphylococcus aureus* przenoszone były podczas krojenia, z zanieczyszczonej krajalnicy, do wędliny poddanej obróbce cieplnej (inaktywację opisano modelem inaktywacji logarytmiczno-liniowym i modelem Weibull'a). Do opisu wzrostu patogenów po transferze wykorzystano także funkcje wykładnicze [88].

Inne podejście skupia się na czynnikach hamujących wzajemny wzrost w populacji różnych mikroorganizmów. Efekt ten może być włączony do modelu drugorzędowego przez dodanie nowego czynnika, odpowiadającego funkcji hamującej. Uwzględnienie wpływu konkurencji między gatunkami w modelach predykcyjnych jest krokiem niezbędnym do osiągnięcia dokładniejszych przewidywań. Zastosowanie kultur bioochronnych jako środków utrwalających żywność i potrzeba poznania, w jaki sposób endogenna flora wpływa na wzrost patogenów w żywności, zwraca uwagę mikrobiologów na ten obszar. Modele uwzględniające te czynniki mogą mieć ważne zastosowania w przemyśle spożywczym [58].

Modelowanie zmienności odpowiedzi populacji na czynniki środowiskowe związane z lag fazą mikroorganizmów stanowi istotny aspekt oceny ryzyka mikrobiologicznego. Badania w tej dziedzinie wykazały, że źródła zmienności są związane właśnie z lag fazą, a nie z maksymalną szybkością wzrostu [7]. Wśród czynników wpływających na tę fazę, istotna jest dostępność składników odżywczych. Wzrost drobnoustrojów w pożywce bulionowej może nie obejmować lag fazy, ze względu na idealne warunki rozwoju. Inne czynniki, takie jak poziom inokulum lub warunki przed inkubacją (historia komórek) wpływają na długość tej fazy. Ponieważ zanieczyszczenie mikrobiologiczne żywności zwykle jest na niskim poziomie, spodziewana jest większa zmienność tej fazy, zwłaszcza gdy komórki są poddane stresowi. Przeprowadzenie badań na poziomie pojedynczych komórek, pozwala lepiej ocenić

zmiennosc i przewidywac zachowania bakterii w realnych warunkach. Modelowanie na poziomie pojedynczych komorek wykorzystuje procesy stochastyczne, gdy uwzględnia się zmienność między poszczególnymi komórkami. Lag faza i późniejszy wzrost przed fazą stacjonarną mogą być modelowane przy użyciu dwufazowej funkcji liniowej [76]. McKellar i Knight [63] opracowali model, który łączy etap adaptacji (nieciągły), jako właściwość pojedynczej komórki oraz etap logistycznego wzrostu bakterii (ciągły). Rozszerzenie modelu do ciągłego-nieciągłego-ciągłego obejmowało dynamiczne uwarunkowania modelowania lag fazy, ponieważ w tej fazie maksymalna szybkość wzrostu może zmieniać się w zależności od warunków środowiskowych. Ten rodzaj modelowania wykorzystał również Koutsoumanis [53] do oceny maksymalnych stężeń NaCl hamujących wzrost indywidualnych komórek bakterijnych prezentowane w tej pracy podkreślają potrzebę podejścia stochastycznego w mikrobiologii ilościowej, zwłaszcza w środowiskach bliskich granicy wzrostu.

## 6. Konstrukcja modelu prognostycznego

Proces powstawania matematycznego modelu wymaga koordynacji pracy i wiedzy z zakresu: mikrobiologii, statystyki, matematyki, chemii, inżynierii procesowej oraz informatyki. Wymaga również odpowiedniego sprzętu i oprogramowania komputerowego.

Wyróżnia się cztery etapy postępowania przy konstrukcji modelu matematycznego:

1. planowanie;
2. zbieranie i analiza danych;
3. opis matematyczny;
4. walidacja i przechowywanie danych.

### 6.1. Planowanie doświadczenia

Uwzględnienie etapu *planowania* doświadczenia umożliwia postawienie właściwego problemu badawczego oraz wykonanie niezbędnych badań wstępnych. Ponadto natura badanego mikroorganizmu i problemy wywołane przez niego w żywności określają rodzaj modelu. Różne typy modeli są stosowane do przewidywania prawdopodobieństwa wytworzenia toksyn, prawdopodobieństwa wzrostu, czasu trwania lag fazy bakterii patogennych bez tolerancji czasu jej przekroczenia, rozwoju patogenu do pewnej granicy tolerancji czy rozwoju bakterii saprofitycznych. Ponadto na tym etapie należy zaplanować czynniki, które w modelu będą uwzględnione jako zmienne. Ważna jest liczba zmiennych, interakcje pomiędzy zmiennymi, liczba niezbędnych danych dla każdej zmiennej [67].

### 6.2. Zbieranie danych

Zbieranie danych odbywa się za pomocą metod bezpośrednich, w których indywidualne mikroorganizmy są wyróżniane i liczone (metoda płytkowa) oraz metod pośrednich, w których oznaczane są niektóre właściwości takie jak: gęstość optyczna, sucha masa, impedancja [67].

Heterogenność produktów żywnościowych powoduje trudności w zbieraniu danych do konstrukcji modeli prognostycznych, dlatego do analiz stosowane są podłoża mikrobiologiczne, które mają stabilny skład i które mogą być łatwo modyfikowane w celu otrzymania wymaganych warunków. W niektórych sytuacjach mogą istnieć różne metody określania warunków środowiska, np. wybór środka zakwaszającego, czy substancji pochłaniającej wilgoć w celu dostosowania wartości pH oraz aktywności wody. W przypadku modelu, który ma być używany do szerszej grupy produktów spożywczych, stosowane są środki chemiczne o mniejszych właściwościach inhibujących, co zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia sytuacji, gdzie ryzyko mikrobiologiczne jest niedoszacowane (gdy np. przewidziane tempo wzrostu mikroorganizmów jest niższe niż w rzeczywistości). W przypadku jednak gdy model jest przeznaczony dla konkretnego produktu, wybór czynników może być bardziej zawężony.

Wybór szczepu, wielkość inokulum oraz warunki prowadzenia hodowli wpływają na otrzymywane dane oraz późniejsze prognozy. Wielkość inokulum musi zapewnić, że oczekiwana odpowiedź drobnoustrojów będzie mierzalna. Warunki hodowli powinny być tak dobrane, aby jak najdokładniej odzwierciedlać rzeczywiste warunki, w jakich potencjalny drobnoustrój będzie się rozwijać.

Czas w jakim pobierane są próbki jest ważnym czynnikiem w planowaniu doświadczenia i na tyle, na ile to tylko możliwe, powinien być zbliżony do okresu najbardziej gwałtownych zmian, np. koniec lag fazy w przypadku modeli wzrostu. W celu dopasowania funkcji sigmoidalnej do punktów empirycznych wymagane jest od 10 do 15 punktów pomiarowych [48].

### 6.3. Analiza danych

Na etapie *analizy danych* dokonywany jest wybór matematycznej funkcji s-kształtnej opisującej krzywą wzrostu. Technika regresji nieliniowej pozwala na matematyczne opisanie linii najlepszego dopasowania do punktów empirycznych, ale wymaga to zastosowania odpowiedniego oprogramowania komputerowego. Sigmoidalnymi modelami jednej zmiennej niezależnej z czterema parametrami są równania: Verhulst'a, funkcja logistyczna, funkcja Stannard'a, Richards'a, Morgana, Marcer'a, Flodin'a, Weibull'a, Chapman'a-Richards'a,

a najczęściej stosowanymi do opisu wzrostu populacji mikroorganizmów są zmodyfikowana funkcja Gompertza oraz logistyczna [68, 81].

#### 6.4. Walidacja modelu

Walidacja modelu wykonywana jest w celu sprawdzenia możliwości predykcyjnych modelu w nowej sytuacji. Prawdziwa wartość modelu ostatecznie oznacza jak dobrze może on przewidzieć zachowanie mikroorganizmów pod wpływem nowych warunków. Model może okazać się niewłaściwy z wielu powodów. Może to być naturalna różnorodność mikroorganizmów, błędy systematyczne analitycznych metod laboratoryjnych lub błędy w stosowanych technikach modelowania, nieadekwatnie opisujących dane. Szacuje się, że dla modeli konstruowanych przy użyciu danych zebranych w doświadczeniu prowadzonym na podłożach laboratoryjnych błąd względny w prognozowaniu wzrostu mikroorganizmów wynosi 7–10% w przypadku modeli pierwszorzędowych i 20–50% w przypadku modeli drugorzędowych. Na tym etapie istnieje pewien stopień akceptacji lub odrzucenia modelu, w związku z czym może się pojawiać potrzeba dostarczenia dodatkowych lub potwierdzenia istniejących danych, bądź też zastosowania innych technik modelowania [48].

Walidacja modelu w warunkach żywności obejmuje porównanie wartości prognozowanych przez model z danymi obserwowanymi: wzrostu, przeżywalności i/lub inaktywacji mikroorganizmów w żywności. Najszybszym i najtańszym sposobem walidacji jest wykorzystanie w tym celu wyników z publikacji naukowych [39]. Jednakże liczba dostępnych danych może być bardzo ograniczona oraz mogą być one niekompletne. Problemy te mogą być rozwiązane przy użyciu „challenge test”, specjalnie zaprojektowanych na potrzeby walidacji modelu w przypadku konkretnego produktu (walidacja zewnętrzna). W tym przypadku dane są bardziej odpowiednie, wiarygodne i kompletne. Ponieważ są czasochłonne, jak i wymagają dużych nakładów finansowych, z reguły są one wykorzystywane jako uzupełnienie danych pochodzących z publikacji naukowych [39, 48].

Istnieje także metoda walidacji wewnętrznej, wykorzystująca te same dane które pozwoliły na opracowanie modelu, do jego walidacji. Należy podzielić dane racjonalnie na podzbiory i w oparciu o część danych opracować model prognostyczny, a następnie zastosować ten model do predykcji pozostałych danych. Inna metoda polega na sekwencyjnym opuszczaniu danych. Model zbudowany na podstawie pozostałych danych stosowany jest do przewidywania wartości opuszczonych danych, a otrzymane wartości porównuje się z właściwą wartością opuszczonego punktu. Proces powtarza się w przypadku każdego punktu i oblicza sumę kwadratów reszt.

Dokładność dopasowania modelu do danych i oszacowanie akceptowalności predykcji modelu z uwzględnieniem błędu metody może być oszacowana metodą graficzną. Na wykresie umieszczane są dane przewidywane przez model względem danych obserwowanych lub opisanych w literaturze. W wyniku walidacji graficznej można łatwo sklasyfikować opracowane modele na fałszywie-bezpieczne jeśli model przeszacowuje wzrost i fałszywie-niebezpieczne, jeśli model niedoszacowuje wzrostu. Linia równoważności reprezentuje doskonałą zgodność pomiędzy wartościami prognozowanymi a obserwowanymi. Punkty znajdujące się poniżej linii równoważności z prawej strony wykresu oznaczają że model prognozuje fałszywie-niebezpiecznie, natomiast punkty układające się powyżej linii równoważności, po lewej stronie oznaczają predykcję fałszywie-bezpieczną [76].

Do szacowania dokładności modeli wykorzystuje się także wskaźniki matematyczno-statystyczne takie jak: średni błąd kwadratowy – Mean Squere Error (MSE); współczynnik determinacji  $R^2$ ; bias faktor  $B_f$ , accuracy  $A_f$  [74, 76].

Zastosowanie w praktyce modelu prognostycznego nie poddanego walidacji może zakończyć się poważnymi konsekwencjami dotyczącymi bezpieczeństwa zdrowotnego konsumenta i w konsekwencji prowadzić do odrzucania koncepcji mikrobiologii prognostycznej jako nieprzydatnej. Szczególnie w przypadku modeli powstałych w oparciu o dane nie pochodzące z systemów żywnościowych, uzyskanie bezwzględnej pewności, że model może być zastosowany w układzie żywności jest sprawą niezwykle ważną.

#### 7. Prognozowanie mikrobiologiczne w analizie ryzyka

Wyróżnia się dwa podejścia do oceny ryzyka mikrobiologicznego: ocenę jakościową i ocenę ilościową. Ocena jakościowa to ocena opisowa, oparta na analizie sprecyzowanych informacji dotyczących prawdopodobieństwa wystąpienia choroby (np. prawdopodobieństwo wysokie lub niskie). Oceny jakościowe są przeprowadzane w przypadku braku naukowych danych lub zasobów do przeprowadzenia pełnej oceny ilościowej [38, 57]. Ilościowa ocena ryzyka mikrobiologicznego (QMRA – Quantitative Microbial Risk Assessment) wymaga uwzględnienia znacznej bazy danych liczbowych do szacowania konsekwencji zdrowotnych związanych z zagrożeniem mikrobiologicznym za pomocą modelowania matematycznego. W QMRA bierze się pod uwagę wszystkie etapy produkcji i dystrybucji żywności (‘od pola do stołu’), a wynikiem analizy jest oszacowanie prawdopodobieństwa wystąpienia choroby po spożyciu badanego produktu spożywczego [32, 61].

QMRA składa się z czterech etapów: (1) identyfikacji zagrożeń, w której wskazuje się mikroorganizmy potencjalnie patogenne obecne w produkcie żywnościowym; (2) charakterystyki zagrożeń, która opisuje niekorzystne skutki zdrowotne związane z konsumpcją mikroorganizmu patogennego zawartego w produkcie żywnościowym; (3) oszacowania narażenia, które przewiduje szacunkową częstotliwość spożycia żywności oraz prawdopodobną liczbę mikroorganizmów w porcji; oraz (4) charakterystyki ryzyka w celu oszacowania ryzyka wystąpienia zakażeń związanych ze spożyciem produktu żywnościowego [19, 22, 32, 61].

Oszacowanie narażenia i charakterystyka ryzyka to dwie spośród czterech składowych QMRA, które wymagają zastosowanie modeli prognostycznych [76]. Do obliczenia ryzyka infekcji lub choroby w QMRA, konieczny jest wybór odpowiedniego modelu prognostycznego. Istotną rolę w charakterystyce ryzyka QMRA odgrywają modele typu dawka-odpowiedź (dose-response models) [29, 34]. Ten typ modelu określa matematyczną zależność między spożyciem dawki mikroorganizmów patogennych, przenoszonych przez żywność, a reakcją gospodarza polegającą na prawdopodobieństwie wystąpienia infekcji /choroby lub śmierci [19].

W literaturze dostępne są różne modele typu dawka-odpowiedź, w tym model wykładniczy [70], model  $\beta$ -Poissona [59], przybliżony model  $\beta$ -Poissona [79], model dwumianowy  $\beta$  [11, 41] oraz model Weibull-Gamma [21].

Ze względu na trudności w pozyskiwaniu danych skonstruowanie modelu dawka-odpowiedź nie jest sprawą prostą. Najlepiej byłoby, gdyby dane niezbędne do konstrukcji modelu pochodziły z badań prowadzonych wśród całej populacji, z uwzględnieniem wrażliwych subpopulacji: dzieci, osób starszych, kobiet w ciąży. Baza wyników powinna uwzględniać także różne początkowe poziomy drobnoustrojów patogennych [23]. Wyniki badań przeprowadzonych z udziałem ludzi przedstawiono w pracy Teunis i wsp. [94]. Dane wykorzystywane w ocenie ryzyka mikrobiologicznego niezbędne do konstrukcji modeli dawka-odpowiedź, pochodzą z różnych źródeł. Zalicza się do nich m.in.: testy przeprowadzane za zgodą wolontariuszy polegające na spożyciu produktu zanieczyszczonego znaną liczbą drobnoustrojów [33], ekstrapolację wyników badań prowadzonych na zwierzętach [89, 99] oraz analizy wyników badań epidemiologicznych dotyczących chorób przenoszonych przez żywność [17, 90].

Brak danych dotyczących zależności dawka-odpowiedź, w przypadku większości drobnoustrojów chorobotwórczych pokazuje, jak trudno jest zastosować właściwe podejście eksperymentalne w ilościowej ocenie ryzyka mikrobiologicznego. Biorąc pod uwagę niejednorodność populacji narażonych na mikroorga-

nizmy patogenne pod względem wieku, stanu zdrowia, nawyków żywieniowych i kulturowych oraz warunków geograficznych sytuacja komplikuje się jeszcze bardziej. W oszacowaniu narażenia należy wziąć pod uwagę nie tylko znaczne różnice regionalne lecz także podatności/wrażliwość organizmu [29, 50]. Ponadto w celu pełnego oszacowania prawdopodobieństwa wystąpienia choroby, należy wziąć pod uwagę nie tylko rozkład drobnoustrojów w surowcu, zmiany w populacji mikroorganizmów chorobotwórczych podczas produkcji, dystrybucji i przechowywania, ale również podczas przygotowywania żywności w domu [32]. Problematyczne stają się także sytuacje w przypadku niskiej początkowej liczby bakterii patogennych. Ze względu na brak wiedzy na temat podstawowych mechanizmów leżących u podstaw odpowiedzi organizmu na określoną dawkę mikroorganizmów, modelowanie matematyczne opiera się na wielu założeniach i ekstrapolacjach [18–19, 52]. Rozwiązania matematyczne uwzględniające te „niepewności” w modelu dawka-odpowiedź zaproponował w swojej pracy Moon i wsp. [69]. Z kolei Buchanan i wsp. [18], Julien i wsp. [46] proponują nowe strategie modelowania, takie jak Kluczowe Ramy Reakcji na Dawkę (KEDRF – the Key Events Dose-Response Framework), które jest analitycznym opisem wzorcowych relacji dawka-odpowiedź na podstawie istniejących informacji.

W celu oszacowania końcowego ryzyka (np. prawdopodobieństwa zachorowania lub liczby przypadków występowania drobnoustrojów w żywności), należy połączyć wyniki prognozowane przez dwa modele: model oszacowania narażenia i model dawka-odpowiedź. Przykładowy model szacowania narażenia przedstawiono w pracy Pujol i wsp. [82]. Dawka (rozpowszechnienie/częstość i koncentracja) wyznaczona na podstawie modelu oszacowania narażenia wprowadzana jest do modelu dawka-odpowiedź. Zaproponowano kilka podejść metodologicznych do przeprowadzenia tej procedury matematycznej, z których niektóre zostały szczegółowo omówione przez Perez-Rodriguez i wsp. [75, 77].

Ilościową ocenę ryzyka można przedstawić odpowiednio jako „oszacowanie punktowe” (deterministyczne) lub „probabilistyczne” (stochastyczne). Podstawową różnicą między tymi dwoma podejściami jest przedstawienie danych źródłowych niezbędnych do przeprowadzenia oceny ryzyka. Podejście deterministyczne oznacza, że dane wejściowe do oceny ryzyka są wykorzystywane jako pojedyncze wartości parametrów (wartość średnia lub minimalna) np. w celu oszacowania narażenia na średnią liczbę mikroorganizmów patogennych, obecnych w żywności spożywanej przez przeciętnego konsumenta [57]. Metoda deterministyczna jest prostsza i szybsza do wdrożenia, ponieważ bazuje na obliczeniach matematycznych, ale dostarcza jedynie

konkretnego wyniku bez informacji o wyjątkowych/rzadkich/niecodziennych przypadkach [1].

Podejście probabilistyczne, w przeciwieństwie do pojedynczych wartości parametrów, uwzględnia wszystkie dostępne dane i wykorzystuje rozkłady prawdopodobieństwa, co przekłada się na pełniejszą charakterystykę ryzyka wystąpienia choroby [57, 72]. Metoda probabilistyczna wymaga uwzględnienia rozkładów prawdopodobieństwa w celu odzwierciedlenia zmienności lub niepewności parametrów. Metoda ta jest trudniejsza, ale prowadzi do otrzymania rozkładu prawdopodobieństwa ryzyka i doprecyzowuje interpretację wyników modelu [1].

Podejście probabilistyczne, pomimo większej złożoności obliczeń, stało się bardziej wiarygodną metodą stosowaną w ilościowej ocenie ryzyka. Charakterystyka ryzyka powinna uwzględniać zmienność i niepewność informacji wykorzystywanych w celu oszacowania narażenia. Zmienność jest zasadniczo właściwością natury i reprezentuje różnorodność dobrze scharakteryzowanej populacji lub parametru. Każdy element podczas produkcji, w przetwórstwie i sprzedaży żywności charakteryzuje się zmiennością; zarówno sam mikroorganizm chorobotwórczy, jak i reakcja organizmu gospodarza na czynniki chorobotwórcze. Z drugiej strony niepewność wynika także z braku wiedzy na temat zjawiska lub parametru i niezdolności do jej scharakteryzowania. Rozpoznawanie i charakteryzowanie zmienności i niepewności są ważne, ponieważ wpływają one na końcowy wynik oceny ryzyka, a w konsekwencji na podejmowane decyzje dotyczące zarządzania ryzykiem [57].

Najczęściej stosowaną techniką przeprowadzenia oceny ryzyka mikrobiologicznego jest obecnie symulacja Monte Carlo. Metodologia ta wykorzystuje podejście stochastyczne, gdzie kluczowe czynniki w modelu są reprezentowane przez rozkład danych, a zestaw wartości wyjściowych jest generowany w formie wielokrotnych iteracji. Zatem dane wejściowe w postaci rozkładu prawdopodobieństwa na przykład w odniesieniu do częstości występowania i poziomów patogenu w produkcji lub do inaktywacji termicznej, łączą się w celu wygenerowania szacowanego prawdopodobieństwa wystąpienia choroby, które jest również prezentowane jako rozkład. Symulacja Monte Carlo może zapewnić bardziej realistyczne oszacowanie ryzyka niż podejście ściśle deterministyczne. Ponadto, biorąc pod uwagę zmienność opisaną jako rozkład częstotliwości, otrzymuje się bardziej realistyczną ocenę zagrożenia niż powstała w oparciu o jedną wartość dyskretną/pojedynczą: np. wartość średnią lub minimalną [32]. Niestety, wiele opublikowanych dotąd badań przedstawia dane mikrobiologiczne jako wartości dyskretne (np. wartość średnia log jtk/g), a nie rozkład, co ogranicza ich wykorzystanie w QMRA [72].

## 8. Podsumowanie

Mikrobiologia prognostyczna dzięki interdyscyplinarnym wysiłkom zarówno mikrobiologów jak i naukowców uczestniczących w opracowywaniu matematycznego modelu jest coraz częściej wykorzystywana przez środowiska akademickie oraz przemysł spożywczy do poprawy i zapewniania jakości i bezpieczeństwa żywności [39, 86]. W trakcie rozwoju tej subdyscypliny mikrobiologii żywności powstało kilka koncepcji modelowania, klasyfikacji i podziałów modeli prognostycznych ze względu na konieczność uporządkowania modeli oraz ich zastosowań. W procesie tworzenia modelu prognostycznego na etapie zbierania danych wykorzystywane są obecnie nowoczesne metody analityczne (modele molekularne i genomowe) jak również wciąż poszukuje się nowoczesnych narzędzi obliczeniowych czego przykładem jest wykorzystanie Sieci Neuronowych.

Wartość użytkowa modeli prognostycznych to m.in. szacowanie terminów przydatności do spożycia produktów żywnościowych jak również wykorzystanie w ocenie ryzyka mikrobiologicznego. Służą temu liczne programy komputerowe jak również bazy danych działające on-line. Nowatorskim rozwiązaniem i zarazem przyszłością mikrobiologii prognostycznej staje się tworzenie Repozytoriów Modeli Bezpieczeństwa Żywności czyli modułów, które umożliwiają eksport modeli prognostycznych do wystandaryzowanego formatu wymiany danych [80].

## Piśmiennictwo

1. Akmel D.C., Tapé T. i wsp.: Quantitative assessment of the microbiological risk associated with the consumption of attieke in Côte d'Ivoire. *Food Control*, **81**, 65–73 (2017)
2. Alber S.A., Schaffner D.W.: Evaluation of data transformations used with square root and Schoolfield models for predicting bacterial growth rate. *App. Environ. Microbiol.* **58**, 3337–3342 (1992)
3. Alber S.A., Schaffner D.W.: New modified square root and Schoolfield models for predicting bacterial growth rate as a function of temperature. *J. Ind. Microbiol.* **12**, 206–210 (1993)
4. Amina M., Panagou E.Z., Kodogiannis V.S., Nychas G.-J.E.: Wavelet neural networks for modeling high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in UHT whole milk. *Chemom. Intell. Lab. Syst. Discipline.* **103**, 170–183 (2010)
5. Aspidou Z., Koutsoumanis K.P.: Individual cell heterogeneity as variability source in population dynamics of microbial inactivation, *Food Microbiol.* **45**, 216–221 (2015)
6. Atsamnia D., Hamadache M., Hanini S., Benkortbi O., Oukrif D.: Prediction of the antibacterial activity of garlic extract on *E. coli*, *S. aureus* and *B. subtilis* by determining the diameter of the inhibition zones using artificial neural networks. *LWT – Food Science and Technology*, **82**, 287–295 (2017)
7. Augustin J.-Ch., Carlier V.: Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *Int. J. Food Microbiol.* **56**, 53–70 (2000)



8. Baranyi J., da Silva N.S.: The use of predictive models to optimize risk of decisions. *Int. J. Food Microbiol.* **240**, 19–23 (2017)
9. Baranyi J., Pin C.: Estimating bacterial growth parameters by means of detection times. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 732–736 (1999)
10. Baranyi J., Roberts T.A., McClure P.: A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* **10**, 43–59 (1993)
11. Barker-Reid F., Harper G.A., Hamilton A.J.: Affluent effluent: growing vegetables with wastewater in Melbourne, Australia – a wealthy but bone-dry city. *Irrigat. Drain Syst.* **24**, 79–94 (2010)
12. Basheer I.A., Hajmeer M.: Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. *J. Microbiological Methods*, Neural Computing in Microbiology, **43**, 3–31 (2000)
13. Bowman J., McMeekin T., McQuestion O., Mellefont L., Ross T., Tamplin M.: The future of predictive microbiology: strategic research, innovative applications and great expectations. *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 2–9 (2008)
14. Brucker S., Albrecht A., Petersen B., Kreyenschmidt J.: A predictive shelf life model as a tool for the improvement of quality management in pork and poultry chains. *Food Control*, **29**, 451–460 (2013)
15. Brul S., Mensonides F.I.C., Hellingwerf K.J., Teixeira de Mattos J.M.: Microbial systems biology: New frontiers open to predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* 5th International Conference on Predictive Modelling in Foods, **128**, 16–21 (2008)
16. Buchanan R.L.: Predictive food microbiology. *Trends Food Sci. Technol.* **4**, 6–11 (1993)
17. Buchanan R.L., Damert W.G., Whiting R.C., Van Schothorst M.: An approach for using epidemiologic and microbial food survey data to develop a 'purposefully conservative' estimate of the dose-response relationship between *Listeria monocytogenes* levels and the incidence of foodborne listeriosis. *J. Food Prot.* **60**, 918–922 (1997)
18. Buchanan R.L., Havelaar A.H., Smith M.A., Whiting R.C., Julien E.: The key events dose-response framework: its potential for application to foodborne pathogenic microorganisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 718–728 (2009)
19. Buchanan R.L., Smith J.L., Long W.: Microbial risk assessment: Dose-response relations and risk characterization. *Int. J. Food Microbiol.* **58**, 159–172 (2000)
20. Butler F., Xu Y.: Prediction of *Staphylococcus aureus* growth in ham during chilling using Pathogen Modeling Program. *Biosystem Engineering*, **16**, 20–23 (2011)
21. Carrasco E., Perez-Rodriguez F., Valero A., Garcia-Gimeno R.M., Zurera G.: Risk assessment and management of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce salads. *Compr. Rev. Food Sci.* **9**, 498–512 (2010)
22. Codex Alimentarius Commission. Report of the Thirtieth Session of the Codex Committee on Food Hygiene (CCFH). Ali-norm 99/13 Appendix IV: s. 58–64 1999. [http://www.codexalimentarius.net/download/report/112/Al99\\_13e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/report/112/Al99_13e.pdf) (18.09.2017)
23. Coleman M.E., Marks H.M.: Qualitative and quantitative risk assessment. *Food Control*, **10**, 289–297(1999).
24. Couvert O., Augustin J-Ch. i wsp. Validation of a stochastic modelling approach for *Listeria monocytogenes* growth in refrigerated foods. *Int. J. Food Microbiol.* **144**, 236–242 (2010)
25. Daughtry B.J., Davey K.R., King K.D.: Temperature dependence of growth kinetics of food bacteria. *Food Microbiol.* **14**, 21–30 (1997)
26. Davey K.R.: Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth. *J. App. Bacteriol.*, **70**, 253–257 (1991)
27. Davey K.R.: Linear-Arrhenius models for bacterial growth and depth and vitamin denaturations. *J. In. Microbiol.* **12**, 172–179 (1993)
28. Davey K.R.: Modeling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 295–303 (1994)
29. De Keuckelaere A., Jacxsens L., Amoah P., Medema G., McClure P., Jaykus L.-A., Uyttendaele M.: Zero risk does not exist: lessons learned from microbial risk assessment related to use of water and safety of fresh produce. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **14**, 387–410 (2015)
30. Dermesonluoglu E., Fileri K., Orfanoudaki A., Tsevdou M., Modeling the microbial spoilage and quality decay of pre-packed dandelion leaves as function of temperature. *J. Food Eng.* **184**, 21–30 (2016)
31. Devlieghere F., Francois K., Vermeulen A., Debevere J.: Predictive microbiology (w) Predictive modeling and risk assessment. Integrating safety and environmental knowledge into food studies towards European sustainable development, red. R. Costa, K. Kristbergsson, Springer, Boston, 2009, s. 29–53
32. Dominguez S., Schaffner D.W.: Microbiological quantitative risk assessment (w) Safety of meat and processed meat, red. F. Toldrá, Springer, New York, 2009, s. 591–614
33. FAO/WHO. Microbiological Risk Assessment Series 2: Risk Assessments of Salmonella in Eggs and Broiler Chickens. World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Geneva, Rome, 2002, [www.fao.org/3/a-y4392e.pdf](http://www.fao.org/3/a-y4392e.pdf) (11.09.2017)
34. FAO/WHO. Microbiological risk assessment series 3: Hazard characterization for pathogens in food and water. World Health Organization, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Geneva, Roma, 2003, [whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562374.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562374.pdf) (11.09.2017)
35. Fernández J.C., Hervás C., Martínez-Estudillo F.J., Gutiérrez P.A.: Memetic Pareto Evolutionary Artificial Neural Networks to determine growth/no-growth in predictive microbiology. *Appl. Soft Comput.* **11**, 534–550 (2011)
36. Fernández-Navarro F., Hervás-Martínez C., Cruz-Ramírez M., Gutiérrez P.A., Valero A.: Evolutionary q-Gaussian Radial Basis Function Neural Network to determine the microbial growth/no growth interface of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Soft Comput.* **11**, 3012–3020 (2011)
37. Ferrari A., Lombardi S., Signoroni A.: Bacterial colony counting with convolutional Neural Networks in Digital Microbiology Imaging. *Patter Recognit.* **61**, 629–640 (2017)
38. Giaccone V., Ferri, M.: Microbiological quantitative risk assessment and food safety: an update. *Vet. Res. Commun.* **29**, 101–106 (2005)
39. Guiller L.: Predictive microbiology models and operational readiness. *Procedia Food Sci.* **7**, 133–136 (2016)
40. Gunvig A., Hansen F., Borggaard C.: A mathematical modeling for predicting growth/no-growth of psychrotrophic *C. botulinum* in meat products with five variables. *Food Control*, **29**, 309–317 (2013)
41. Hamilton A.J., Stagnitti F., Premier R., Boland A.M., Hale G.: Quantitative microbial risk assessment models for consumption of raw vegetables irrigated with reclaimed water. *Appl Environ Mikrob.* **72**, 3284–3290 (2006)
42. Heinemann, M., Sauer U.: Systems biology of microbial metabolism. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 337–43 (2010)
43. Huang L.: IPMP 2013 – A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* **171**, 100–107 (2014).
44. Huang L., Juneja V. K., Yan X.: Thermal inactivation of foodborne pathogens in the USA pathogen modeling program. *J. Therm. Anals. and Colorim.* **106**, 191–198 (2011)
45. Ilnicka-Olejniczak O., Hornecka D.: Prognozowanie w mikrobiologii żywności (w) Food Product Development. Opracowanie nowych produktów żywnościowych. Wydawnictwo AR, Poznań, 1995, s. 149–168

46. Julien E., Boobis A.R., Olin S.S.: The key events dose-response framework: a cross disciplinary mode-of-action based approach to examining dose-response and thresholds. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* **49**, 682–689 (2009)
47. Keeratipibul S., Phewpan A., Lursinsap Ch.: Prediction of coliforms and *Escherichia coli* on tomato fruits and lettuce leaves after sanitizing by using Artificial Neural Networks. *LWT-Food Sci. Technol.* **44**, 130–138 (2011)
48. Kilcast D., Subramanian P.: The stability and shelf-life of food. Woodhead Publishing, Cambridge, 2000
49. Kim H.W., Lee K., Kim S. H., Rhee M.S.: Predictive modeling of bacterial growth in ready-to-use salted napa cabbage (*Brassica pekinensis*) at different storage temperatures. *Food Microbiol.* **70**, 129–136 (2018)
50. Klapwijk P.M., Jouve J.-L., Stringer M.F.: Microbiological risk assessment in Europe: the next decade. *Int. J. Food Microbiol.* **58**, 223–230 (2000)
51. Koseki S.: Microbial responses viewer (MRV): A new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *Int. J. Food Microbiol.* **134**, 75–82 (2009)
52. Koseki S.: Risk assessment of microbial and chemical contamination in fresh produce (w) Global Safety of Fresh Produce red. J. Hoorfan, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2014, s. 153–171
53. Koutsoumanis, K.: A study on the variability in the growth limits of individual cells and its effect on the behavior of microbial populations. *Int. J. Food Microbiol.* 5th International Conference on Predictive Modelling in Foods, **128**, 116–121 (2008)
54. Koutsoumanis K. P., Lianou A.: Stochasticity in Colonial Growth Dynamics of Individual Bacterial Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 2294–2301 (2013)
55. Koutsoumanis K. P., Lianou A., Gougoul M.: Latest developments of foodborne pathogens modeling. *Curr. Opin. Food Sci.* **8**, 89–98 (2016)
56. Krishnan K. R., Babuskin S., Babu P. A. S., Sivarajan M., Sukumar M.: Evaluation and predictive modeling the effect of spice extracts on raw chicken meat stored at different temperatures. *J. Food Eng.* **166**, 29–37 (2015)
57. Lammerding, A.M., Fazil, A.: Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* **58**, 147–157 (2000)
58. Larsen P., Yuki H., Gilbert J.: Modeling microbial communities: Current, developing, and future technologies for predicting microbial community interaction. *J. Biotechnol.* **160**, 17–24 (2012)
59. Lim K.Y., Jiang S.C.: Reevaluation of health risk benchmark for sustainable water practice through risk analysis of rooftop-harvested rainwater. *Water Res.* **47**, 7273–7286 (2013)
60. Mafart P.: Food engineering and predictive microbiology: on the necessity to combine biological and physical kinetics. *Int. J. Food Microbiol.* **100**, 239–251 (2005)
61. Magnússon S.H., Verhagen H.: State of the art in benefit – risk analysis: Food microbiology. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 33–39 (2012)
62. McKellar C., Xuewen L.: Modeling microbial responses in food. CRC Press, USA, 2004
63. McKellar, R. C., Knight K.: A combined discrete-continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **54** (3), 171–80 (2000)
64. McMeekin T.A.: Predictive microbiology: quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat Science*, **77**, 17–27 (2007)
65. McMeekin T. A., Bowman J., McQuestin O., Mellefont L., Ross T., Tamplin M.: The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 2–9 (2008)
66. McMeekin T.A., Olley J., Ratkowsky D.A., Ross T.: Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* **73**, 395–407 (2002)
67. McMeekin T.A., Olley J.N., Ross T., Ratkowsky D.A.: Predictive microbiology, theory and application, RST LTD, England, 1993
68. McMeekin T. A., Ross T.: Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *J. Food Microbiol.* **1**, 133–153 (2002)
69. Moon H., Kim S., Chen J., George N., Kodell R.: Model uncertainty and model averaging in the estimation of infectious dose for microbial pathogens. *Risk Anal.* **33**, 220–231 (2013).
70. Mota A., Mena K.D., Soto-Beltran M., Tarwater P.M., Chaidez C.: Risk assessment of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water irrigating fresh produce in Mexico. *J. Food Protect.* **72**, 2184–2188 (2009)
71. Najjar Y.M., Basheer I.A., Hajmeer H.N.: Computational neural networks for predictive microbiology: I. Methodology. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 27–49 (1997)
72. Nauta M.J.: Modelling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible? *Int. J. Food Microbiol.* **73**, 297–304 (2002)
73. Nauta, M. van der Fels-Klerx I., Havelaar A.: A poultry-processing model for quantitative microbiological risk assessment. *Risk Anal.* **25**, 85–98 (2005)
74. O'Mahony C., Seman D. L.: Modeling the microbial shelf life of Foods and Beverages (w) The Stability and Shelf Life of Food, red. Persis Subramaniam, Woodhead Publishing Series in Food Science, Cambridge, 2016, s. 253–289
75. Pérez-Rodríguez F., Campos D., Ryser E.T., Buchholz A.L., Posada-Izquierdo G.D., Marks B.P., Zurera G., Todd E.C.D.: A mathematical risk model for *Escherichia coli* O157:H7 cross contamination of lettuce during processing. *Food Microbiol.* **28**, 694–701 (2011)
76. Pérez-Rodríguez F., Valero A.: Application of Predictive Models in Quantitative Risk Assessment and Risk Management (w) Predictive Microbiology in Foods (red.) F. Pérez-Rodríguez, A. Valero, Springer, Berlin, 2013, s. 87–97
77. Pérez-Rodríguez F., Valero A., Carrasco E., García R.M., Zurera G.: Understanding and modeling bacterial transfer to foods: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **19**, 131–44 (2008)
78. Pérez-Rodríguez F., van Asselt E.D., Garcia-Gimeno R.M., Zurera G., Zwietering M.H.: Extracting additional risk managers information from a risk assessment of *Listeria monocytogenes* in deli meats. *J. Food Prot.* **70**, 1137–1152 (2007)
79. Petterson S.R, Ashbolt N.J., Sharma A.: Microbial risks from wastewater irrigation of salad crops: a screening-level risk assessment. *Water Environ. Res.* **73**, 667–672 (2001)
80. Plaza-Rodríguez C., Thoens C., Falenski A., Weiser A.A., Appel B., Kaesbohrer A., Filter M.: A strategy to establish Food safety Model Repositories. *Int. J. Food Microbiol.* **204**, 81–90 (2015)
81. Pruitt K.M., Kamau D.N.: Mathematical model of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. *J. Ind. Microbiol.* **12**, 221–231 (1993)
82. Pujol L., Albert I., Magras C., Johnson N., B., Membre J.-M., Probabilistic exposure assessment model to estimate aseptic-UHT product failure rate. *Int. J. Food Microbiol.* **192**, 124–141 (2015)
83. Ratkowsky D.A.: Principles of nonlinear regression modeling, *J. Ind. Microbiol.*, **12**, 195–199 (1993)
84. Roberts T. A.: Microbial Growth and Survival: Developments in Predictive Modelling. *Int. Biodeterior. Biodegr.* **36**, 297–309 (1995)
85. Ross T., McMeekin T.A.: Predictive microbiology. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 241–264 (1994)

86. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz.U. L 338 z 22.12.2005
87. Seliworstow T., Uyttendaele M., De Zutter L., Nauta M.: Application of TRiMiCri for the evaluation of risk based microbiological criteria for *Campylobacter* on broiler meat. *Microb. Risk Anal.* **2-3**, 78–82 (2016)
88. Sheen S., Hwang Ch.-A.: Mathematical modeling the cross-contamination of *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of ready-to-eat meat product while slicing. *Food Microbiol.* **27**, 37–43 (2010)
89. Smith M.A., Takeuchi K., Anderson G., Ware G.O., McClure H.M., Raybourne R.B., Mytle N., Doyle M. P.: Dose response for *Listeria monocytogenes* induced stillbirths in nonhuman primates. *Infect. Immun.* **76**, 726–731 (2008)
90. Strachan N.J.C., Doyle M.P., Kasuga F., Rotariu O., Ogden I.D.: Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* **10**, 35–47 (2005)
91. Tadeusiewicz R.: Elementarne wprowadzenie do techniki sieci neuronowych z przykładowymi programami, Akademicka Oficyna Wydawnicza PLJ, Warszawa, 1998
92. Tadeusiewicz R.: Sieci Neuronowe, Akademicka Oficyna Wydawnicza RM, Warszawa, 1993
93. Tenenhaus-Aziza F., Ellouze M.: Software for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair, *Food Microbiol.* **45**, 290–299 (2015)
94. Teunis, P.F.M., Van der Heijden, O.G., Van der Giessen, J.W.B., Havelaar, A.H.: The dose-response relation in human volunteers for gastro-intestinal pathogens, Report number 284550002. National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands 1996, [http://www.rivm.nl/en/Documents\\_and\\_publications/Scientific/Reports/1996/april/The\\_dose\\_response\\_relation\\_in\\_human\\_volunteers\\_for\\_gastro\\_intestinal\\_pathogens](http://www.rivm.nl/en/Documents_and_publications/Scientific/Reports/1996/april/The_dose_response_relation_in_human_volunteers_for_gastro_intestinal_pathogens) (4.09.2017)
95. van Gerwen S., Zwietering M.H.: Growth and inactivation models to be used in quantitative risk assessments. *J. Food Prot.* **61**, 1541–1549 (1998)
96. van Ginneken M., Oron G.: Risk assessment of consuming agricultural products irrigated with reclaimed wastewater: an exposure model. *Water Resour. Res.* **36**, 2691–2699 (2000)
97. Whiting R.C.: Microbial modeling in food. *Critical Reviews in Food Scie. and Nutrit.* **35**, 467–494 (1995)
98. Whiting, R. C., Buchanan R. L.: A classification of models for predictive microbiology. *Food Microbiology*, **10**, 175–177 (1993)
99. Williams D., Irvin E.A., Chmielewski R.A., Frank J.F., Smith M.A.: Dose response of *Listeria monocytogenes* after oral exposure in pregnant guinea pigs. *J. Food Prot.* **70**, 1122–1128 (2007)
100. Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., Van't Rient K.: Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1875–1881 (1990)

Katarzyna Talaga-Ćwiertnia<sup>1\*</sup>, Małgorzata Bulanda<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mykologii Katedra Mikrobiologii Wydział Lekarski Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

<sup>2</sup>Zakład Epidemiologii Zakażeń Katedra Mikrobiologii Wydział Lekarski Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

Wpłynęło w listopadzie 2017 r., zaakceptowano w kwietniu 2018 r.

**Streszczenie:** Lekooporne bakterie z rodzaju *Enterococcus* zaliczane są obecnie do jednych z najważniejszych patogenów odpowiedzialnych za zakażenia związane z opieką zdrowotną. Lekooporność tych bakterii narastała począwszy od lat 80. XX wieku, aby doprowadzić obecnie do ich wielolekooporności. Do tego stanu przyczyniła się presja selekcyjna występująca przede wszystkim w środowisku szpitalnym. Zaś w środowisku pozaszpitalnym presję selekcyjną stanowi stosowanie antybiotyków jako promotorów wzrostu przy hodowli zwierząt, a także w produkcji żywności. Rezerwuarem lekoopornych szczepów enterokoków są również zwierzęta towarzyszące człowiekowi. Wymiana genów oporności pomiędzy szczepami enterokoków z różnych nisz stwarza zagrożenie dla zdrowia publicznego.

1. Wprowadzenie. 2. Środowisko szpitalne. 3. Zwierzęta hodowlane. 4. Żywność. 5. Zwierzęta towarzyszące człowiekowi. 6. Podsumowanie

#### Drug resistance in the genus *Enterococcus* – current problem in humans and animals

**Abstract:** Drug-resistant bacteria from the genus *Enterococcus* are currently among the most important pathogens behind healthcare-associated infections. The drug resistance of these bacteria has been on the increase since the 1980s, leading to their multi-drug resistance. Selective pressure, present mainly in the hospital environment, contributed to this phenomenon. However, also outside the hospital environment selective pressure comes into play, namely the use of antibiotics as promoters of growth in animal husbandry and in food production. Household pets form a reservoir of drug-resistant enterococcal strains, too. The exchange of resistance genes between enterococcal strains from different niches poses a threat to public health.

1. Introduction. 2. Hospital environment. 3. Farm animals. 4. Food. 5. Household pets. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** antybiotykooporność, *Enterococcus*, środowisko szpitalne, zwierzęta hodowlane i towarzyszące człowiekowi, żywność

**Keywords:** antibiotic resistance, *Enterococcus*, hospital environment, farm animals and household pets, food

## 1. Wprowadzenie

Enterokoki przez wiele lat uchodziły za drobno-ustroje o marginalnym znaczeniu dla zdrowia człowieka, gdyż u ludzi i zwierząt stanowią składnik naturalnej mikrobioty przede wszystkim przewodu pokarmowego. Występują również dosyć powszechnie w żywności i wodzie [21]. Jednak obecnie zaliczane są do najgroźniejszych patogenów wielolekoopornych, określanymi akronimem ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.), odpowiedzialnych za zakażenia związane z opieką medyczną (HAI) [10]. Ewolucja z komensala do patogenu była możliwa ze względu na niezwykle plastyczny genom. Enterokoki mają bowiem zdolność do nabywania i kumulowania oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki poprzez łatwą wymianę genów umiejscowionych na mobilnych elementach genetycznych (m.in. plazmidach, transpozonach).

Enterokoki posiadają naturalną oporność na kilka grup leków przeciwbakteryjnych (cefalosporyny, niskie stężenia aminoglikozydów, trimetoprim/sulfametoksazol, klindamycynę) [12, 30]. Dodatkowo niektóre

gatunki wykazują wrodzoną obniżoną wrażliwość na penicyliny (*E. faecium*), niskie stężenia glikopeptydów (fenotyp oporności VanC u *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* i *E. flavescens*) oraz linkozamidy i streptograminy A (*E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. avium* i *E. casseliflavus*) [30, 37]. Ponadto pod koniec XX wieku enterokoki ujawniły zdolność do nabywania oporności na antybiotyki z grup: penicylin (ARE – Ampicillin Resistant *Enterococcus*), aminoglikozydów (HLAR – High Level Aminoglycoside Resistant), glikopeptydów (VRE – Vancomycin Resistant *Enterococcus*), tetracyklin, chinolonów, makrolidów, streptogramin oraz chloramfenikolu [12, 30]. W XXI wieku doprowadziło to do sytuacji, w której najbardziej odporne izolaty są niewrażliwe na prawie wszystkie dostępne obecnie antybiotyki (XDR – Extremely Drug Resistant), a powszechnym stało się izolowanie szczepów MDR (Multidrug Resistant) [43].

## 2. Środowisko szpitalne

Lekooporne enterokoki wywołują zakażenia związane z opieką medyczną (HAI – Hospital Acquired Infections) wyrażone klinicznie przede wszystkim

\* Autor korespondencyjny: Katarzyna Talaga-Ćwiertnia, Zakład Mykologii Katedra Mikrobiologii Wydział Lekarski Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Czysta 18, 31-121 Kraków; tel. 12 633 25 67 wew. 231; e-mail: katarzyna.talaga@uj.edu.pl

jako sepsa, zakażenie miejsca operowanego, zakażenie układu moczowego i bakteryjne zapalenie wsierdzia [53, 61]. Powodują tym samym zakażenia trudne w leczeniu ze względu na ograniczone możliwości terapeutyczne, wydłużenie pobytu pacjenta w szpitalu a nawet zgon [14, 53, 75]. Zakażenia wywoływane przez enterokoki rozwijają się głównie u pacjentów leczonych na oddziałach intensywnej opieki medycznej, oddziałach hematologicznych, onkologicznych, transplantologicznych, a także chirurgicznych [5].

Niekontrolowane stosowanie antybiotyków, przede wszystkim w lecznictwie zamkniętym, spowodowało stopniowe narastanie oporności wśród enterokoków. Niewątpliwie czynnikiem selekcyjnym stało się powszechne stosowanie cefalosporyn, na które to rodzaj *Enterococcus* jest naturalnie oporny. Na początku lat 80. zaczęto raportować zwiększone występowanie zakażeń wywołanych przez *E. faecalis* opornych na gentamycynę [12], które utrzymuje się nadal również wśród szczepów z gatunku *E. faecium* [20]. W tych samych latach pojawiły się także szczepy odporne na penicyliny (ARE). Powszechne stosowanie wankomycyny w USA w lecznictwie szpitalnym w latach 90., a w latach 2000. w Europie doprowadziło do rozprzestrzenienia szczepów VRE [12]. Z dotychczasowych obserwacji wynika, iż uzyskanie oporności na ampicylinę i często towarzyszącej temu oporności na ciprofloksacynę jest głównym markerem fenotypowym szpitalnych izolatów *E. faecium* poprzedzającym o kilka lat wystąpienie oporności na glikopeptydy [74]. Obecnie znanych jest osiem fenotypów oporności nabytej na glikopeptydy u enterokoków. Jednak tylko fenotyp VanA i w mniejszym stopniu VanB są najbardziej rozpowszechnione. Głównym rezerwuarem nabytej oporności na glikopeptydy jest gatunek *E. faecium*. Oporność na wankomycynę u pozostałych gatunków rodzaju *Enterococcus* nadal jest zjawiskiem dosyć rzadkim [12].

W związku z szybkim rozprzestrzenianiem izolatów MDR, w leczeniu zakażeń spowodowanych wielolekoopornymi enterokokami istotne znaczenie ma stosowanie tak zwanych leków ostatniej szansy, czyli linezolidu, tygecykliny i daptomycyny. Linezolid jest stosowany w leczeniu m.in. zapaleń płuc oraz zakażeń skóry i tkanek miękkich [30, 50]. W Europie tygecyklina uzyskała rejestrację do leczenia powikłanych zakażeń skóry i tkanek miękkich (z wyjątkiem zakażenia stopy cukrzycowej) oraz powikłanych zakażeń w obrębie jamy brzusznej u osób dorosłych. Dodatkowo, w USA uzyskała rejestrację do leczenia zakażeń krwi i pozaszpitalnych zapaleń płuc [53, 54]. Natomiast daptomycyna jest przeznaczona do leczenia ostrych bakteryjnych zakażeń skóry i tkanek miękkich, infekcyjnego zapalenia wsierdzia oraz związanych z nimi infekcji łożyska krwi [53, 54]. Niepokojącym zjawiskiem wśród enterokoków jest nabywanie oporności na wyżej przed-

stawione leki. Oporność na linezolid (LRE – Linesolid Resistant *Enterococcus*) jest nadal stosunkowo rzadko raportowana, mimo iż już po roku od wprowadzenia go do lecznictwa zaobserwowano nieskuteczność wobec klinicznych izolatów z rodzaju *Enterococcus* [50, 53, 54, 61]. Oporność na daptomycynę ogólnie nie jest częsta, natomiast zjawisko oporności na tygecyklinę jest niezwykle rzadkie [25]. W medycynie ludzkiej stosowane są także nowsze produkty lecznicze: dalbawancyna (lipopeptyd), oritawancyna i telawancyna (glikopeptydy) oraz tedizolid (oksazolidynon, następca linezolidu). Należy jednak nadmienić, iż aktywność tych leków wobec enterokoków, wskazania terapeutyczne oraz ich dostępność w różnych krajach są zróżnicowane [25, 61, 70]. W związku z powyższym zakażenia lekoopornymi enterokokami stanowią istotny problem epidemiologiczny i terapeutyczny.

Pacjent, którego przewód pokarmowy jest skolonizowany przez enterokoki, poddawany w czasie hospitalizacji procedurom diagnostycznym i leczniczym, w tym antybiotykoterapii, stanowi źródło lekoopornych izolatów z rodzaju *Enterococcus*. Środowisko szpitalne, w tym środowisko najbliższe pacjentowi (pomieszczenie, w którym pacjent przebywa oraz sprzęty, których dotyka i które są stosowane w czasie hospitalizacji) uznawane jest za rezerwuuar lekoopornych enterokoków. Natomiast personel medyczny, a szczególnie ręce pracowników ochrony zdrowia, uznawany jest za wektor, dzięki któremu dochodzić może do rozprzestrzeniania się enterokoków w środowisku szpitalnym (Rys. 1) [40]. Rosnąca częstotliwość występowania HAI, a tym samym rozprzestrzenianie determinant oporności wśród izolatów klinicznych jest pobudzana przez migrację pacjentów pomiędzy placówkami medycznymi oraz placówkami opieki długoterminowej. Szczególne znaczenie mają sytuacje, gdy pacjent skolonizowany i/lub zakażony lekoopornymi enterokokami jest wypisywany z jednego szpitala i przyjmowany na hospitalizację do innego, często specjalistycznego szpitala [67]. Taka sytuacja sprzyja utrzymywaniu się powszechnie stanu endemii z okresowo występującymi ogniskami epidemicznymi.

Z danych epidemiologicznych zebranych w ciągu ostatnich dwóch dekad wynika, że enterokoki zalicza się do grupy najważniejszych patogenów szpitalnych a szybkość rozprzestrzeniania zakażeń przez nie wywołanych jest zróżnicowana [12, 20, 53, 75]. Monitorowaniu podlegają zakażenia inwazyjne o etiologii *E. faecalis* i *E. faecium*, gdyż te dwa gatunki najczęściej (odpowiednio 60% i 40%) wywołują zakażenia inwazyjne w warunkach szpitalnych [25]. Największy odsetek zakażeń HAI odnotowują obecnie Stany Zjednoczone, Irlandia oraz Australia. Większość przypadków zakażeń o etiologii VRE w Stanach Zjednoczonych, Europie, krajach Azji, Ameryki Południowej i Afryki

jest obecnie spowodowana fenotypem VanA. Natomiast epidemie spowodowane izolataami o fenotypie VanB najczęściej występują w Australii i Singapurze [51].

### 3. Zwierzęta hodowlane

W środowisku pozaszpitalnym indukowanie lekooporności enterokoków przypisuje się hodowli zwierząt i rolnictwu. Enterokoki należą do patogenów zwierząt hodowlanych wywołując zakażenia o różnym obrazie klinicznym, dlatego nowoczesne metody hodowli wiążą się z dużym zapotrzebowaniem na antybiotyki [3, 9, 44, 63]. Antybiotyki stosowane są w celach nie tylko leczniczych i w profilaktyce, ale także w celach ochrony zdrowia konsumentów przed drobnoustrojami mogącymi skażać środowisko gospodarstw oraz produkty pochodzenia zwierzęcego [60]. Niestety antybiotyki znalazły także zastosowanie jako promotory wzrostu. Podawane mogą być różnymi drogami (z wodą, parenteralnie), ale przede wszystkim jako dodatki do pasz, którymi skarmiane są zwierzęta gospodarskie. W Polsce do żywności dla zwierząt stosowano jako dodatek początkowo penicylinę, następnie tetracykliny (chlorotetracyklinę i oksytetracyklinę) oraz cynk-bacetracynę i flawofosfolipol. Do najczęściej stosowanych, zarówno w Polsce jak i w całej Unii Europejskiej, antybiotykowych promotorów wzrostu należały m.in. awoparcyna, monenzyna, salinomycyna, spiramycyna, tylozyna, wirginamycyna i bacytracyna [24, 60].

Wiele badań dowiodło, iż zastosowanie awoparcyny (analogu wankomycyny) spowodowało krzyżową oporność na stosowane w lecznictwie antybiotyki glikopeptydowe i selekcję szczepów VRE w przewodach pokarmowych zwierząt hodowlanych [4, 6, 12]. Również analiza sytuacji epidemiologicznej występowania izolatów VRE w środowisku szpitalnym i pozaszpitalnym pozwala wnioskować o udziale antybiotyków stosowanych w rolnictwie w wygenerowaniu VRE. W Europie w populacji ludzi, którzy nie zostali poddani hospitalizacji izolaty VRE występują znacznie częściej, niż w USA, gdzie nie stosowano awoparcyny jako promotora wzrostu, ale w latach 80. XX wieku masowo stosowano wankomycynę w lecznictwie szpitalnym [29, 62].

Kolejnym przykładem wygenerowania oporności na lek stosowany w lecznictwie, czyli chinuprystynę/dalfopristinę, było stosowanie u zwierząt wirginamycyny. Od zwierząt skarmianych paszami z dodatkiem tylozyny i awilamycyny wyizolowano odpowiednie szczepy odporne na erytromycynę i ewerninomycynę [1, 8]. Te i inne fakty doprowadziły do ostatecznego zakazania przez Unię Europejską w 2006 roku zastosowania antybiotyków jako promotorów wzrostu. W pozostałych częściach świata, w tym w Rosji, Chinach i Stanach Zjednoczonych (najwięksi producenci

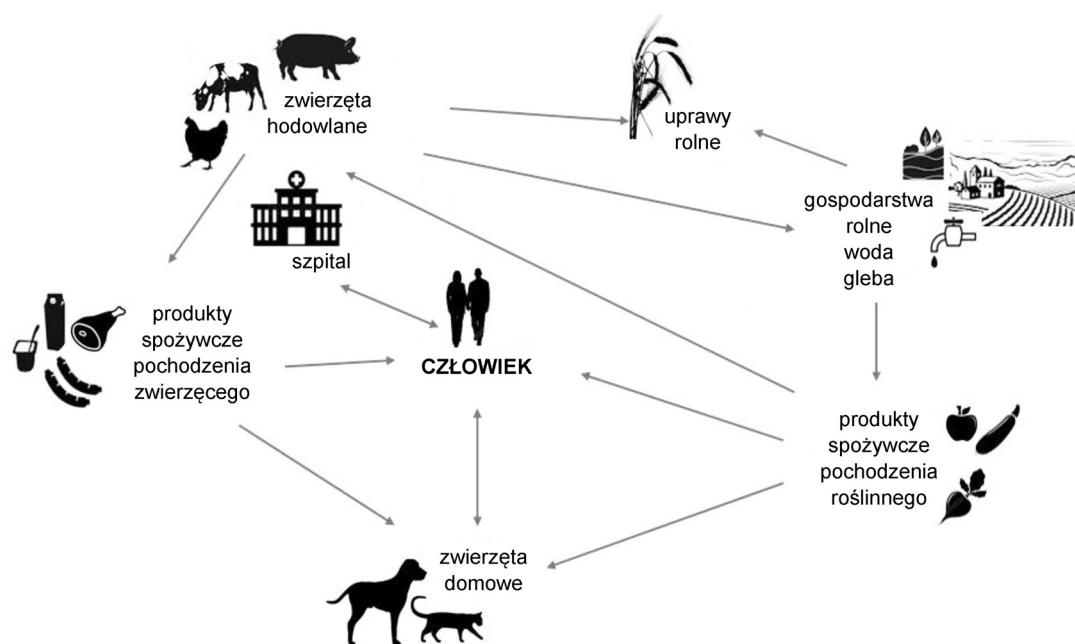
żywności) nadal można stosować antybiotyki w celu poprawy i przyspieszenia wzrostu zwierząt hodowlanych [60]. Właśnie w USA w wyniku powszechnego stosowania gentamycyny w hodowli drobiu obserwowana jest wysoka częstość izolacji szczepów enterokoków o fenotypie HLGR (High Level Gentamicin Resistant) [64]. W celach terapeutycznych w Unii Europejskiej oraz USA można stosować antybiotyki z grupy tetracyklin [15, 48] co znajduje odzwierciedlenie w powszechnie izolowanych z produktów pochodzenia zwierzęcego szczepów opornych na tę grupę antybiotyków [15].

Przenoszenie genów oporności między szczepami izolowanymi od zwierząt hodowlanych a szczepami zasiedlającymi ludzki przewód pokarmowy wzbudza wiele kontrowersji. Zwolennicy tej teorii twierdzą, iż izolaty lekooporne zasiedlające przewód pokarmowy zwierząt hodowlanych z żywnością mogą przedostawać się do organizmu konsumenta. Taki sposób rozprzestrzeniania oporności wśród bakterii jest możliwy i bardzo niebezpieczny dla zdrowia publicznego [4, 6, 68]. Natomiast przeciwnicy, uważają, że taki sposób krążenia genów oporności może mieć znaczenie marginalne, gdyż zwykle narażenie na lekooporne bakterie w spożywanych posiłkach jest niewielkie [26, 38, 55, 67]. Niemniej jednak, uznaje się, iż stosowanie antybiotyków w rolnictwie może stanowić równie poważne zagrożenie epidemiologiczne, jak leczenie w placówkach medycznych. Podstawą tego poglądu jest przeświadczenie, iż pozaszpitalna populacja ludzi „zdrowych” spożywająca codziennie kilka posiłków (skontaminowanych lekoopornymi enterokokami) jest liczniejsza niż hospitalizowana w tym samym czasie populacja pacjentów [67].

Zwierzęta karmione paszami z dodatkiem antybiotyków przyczyniają się do przedostawania się genów oporności na antybiotyki do innych nisz ekologicznych. Kał zwierząt hodowlanych zanieczyszczony bakteriami lekoopornymi stanowi podstawę kompostu, którym nawożone są pola uprawne. Użyźnianie pól może powodować skażenie gleby i wody i transfer genów oporności do zasiedlających te nisze bakterii, a tym samym stać się potencjalnym rezerwuarem, z którego lekooporne determinanty trafią do organizmu człowieka (Rys. 1) [41].

### 4. Żywność

Efektom stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu u zwierząt hodowlanych jest przedostawanie się antybiotyków lub ich metabolitów do tkanek i narządów zwierząt, a tym samym żywności pochodzenia zwierzęcego. Izolaty *E. faecium* i *E. faecalis* z żywności pochodzenia zwierzęcego prezentują oporność na antybiotyki stosowane w lecznictwie pozaszpital-



Rys. 1. Źródła i rezerwuary szczepów lekoopornych z rodzaju *Enterococcus*  
Opracowanie własne na podstawie [23].

nym i szpitalnym, m.in. ciprofloksacynę, norfloksacynę (wędliny, sery), tetracykliny [18, 71] a nawet linezolid (ryby i przetwory rybne) [65]. W żywności pochodzenia zwierzęcego produkowanej w Europie izolaty odporne na gentamycynę i streptomycynę występują rzadko, natomiast w Stanach Zjednoczonych jest to zjawisko dość częste [13].

Zwolennicy teorii o zagrożeniu dla zdrowia publicznego, jakie niesie za sobą spożywanie surowej i przetworzonej żywności zanieczyszczonej wielolekoopornymi drobnoustrojami wskazują na wyniki pracy opisanej przez Jahan i wsp. W warunkach laboratoryjnych dokonano bowiem przeniesienia genu warunkującego oporność na tetracyklinę i streptomycynę ze szczepów *E. faecium* i *E. faecalis* pochodzących z żywności do szczepów klinicznych [33].

Lekooporne enterokoki występują w żywności surowej pochodzenia zwierzęcego i roślinnego, ale też dość dobrze udokumentowano ich występowanie w żywności gotowej do spożycia (np. mleko pasteryzowane) [11, 22, 34]. Ponadto wykazano, iż izolaty występujące w żywności przetworzonej oraz z surowego mięsa wołowego, wieprzowego i drobiu posiadają podobny fenotyp oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe [13, 45].

Antybiotyki stosowano nie tylko w produkcji żywności pochodzenia zwierzęcego, ale także pochodzenia roślinnego [19]. Wśród kilku udokumentowanych zdarzeń wymienić można stosowanie od lat 50. XX wieku streptomycyny do zapobiegania zakażeniom grusz i jabłoni, które stworzyło presję selekcyjną i wygenerowało oporność na aminoglikozydy wśród enterokoków. Enterokoki odporne na aminoglikozydy izolowano ze

świeżych warzyw i owoców (Rys. 1) [49, 69]. Zagadnienie występowania opornych enterokoków w żywności roślinnej jest słabo poznane, mimo to nieliczne doniesienia wskazują, iż żywność roślinna nie stanowi rezerwuaru oporności na glikopeptydy. Ponadto z żywności pochodzenia roślinnego częściej niż gatunki *E. faecium* i *E. faecalis* izolowano *E. casseliflavus*, który był mniej odporny od dwóch pozostałych [52]. Można więc przyjąć, iż zjawisko lekooporności enterokoków pochodzących z żywności roślinnej nie jest tak częste jak wśród izolatów z produktów pochodzenia zwierzęcego, a szczepy nie kumulują tak wielu determinant oporności jak izolaty kliniczne [13, 39].

## 5. Zwierzęta towarzyszące człowiekowi

Znaczenie zwierząt domowych jako „członków rodziny” rośnie systematycznie [16, 32, 35]. Wśród wzrastającej liczby doniesień, istnieją badania wykazujące, że psy i koty skolonizowane enterokokami opornymi na różne grupy antybiotyków mogą stanowić rezerwuar genów oporności na antybiotyki (Rys. 1). Zoonotyczne przekazywanie lekoopornych enterokoków ze zwierząt na ludzi jest możliwe poprzez kontakt z wydzielinami i wydalninami zwierząt [2, 58]. Z badań przeprowadzonych w krajach europejskich, Japonii i USA wynika, iż to psy znacznie częściej są rezerwuarami lekoopornych enterokoków w porównaniu do kotów [7, 31, 32, 36]. Ciekawym faktem jest, iż od zwierząt izolowano najczęściej dwa gatunki, które również najczęściej wywołują zakażenia związane z opieką

zdrowotną: *E. faecium* i *E. faecalis*, znacznie rzadziej zaś *E. durans*, *E. casseliflavus* i *E. gallinarum* [2, 16, 31, 32, 35]. Zakażenia o etiologii enterokokowej wśród zwierząt domowych występują sporadycznie i objawiają się jako biegunki, zapalenia sutka, zapalenia dróg żółciowych, zakażenia dróg moczowych i zakażenia związane z cewnikowaniem [27, 46, 47, 57, 59]. Większość antybiotyków, w tym, ampicylina, tetracykliny, aminoglikozydy, cefalosporyny, chinolony, linkozamidy, makrolidy, chloramfenikol, stosowanych w medycynie weterynaryjnej do leczenia zakażeń innych niż enterokowe jest wspólne z medycyną ludzką. Wykazano, iż leczenie psów i kotów tetracyklinami w wyniku presji selekcyjnej doprowadza często do selekcjonowania szczepów opornych [32]. Analogicznie do pacjentów leczonych i osób zdrowych, również wśród zwierząt leczonych w klinikach weterynaryjnych znacznie częściej izolowano enterokoki oporne na antybiotyki, w tym szczepy ARE, oporne na erytromycynę, tetracyklinę, ciprofloksacynę, gentamycynę, nitrofurantoinę i chloramfenikol, w stosunku do zwierząt nieleczonych. Wśród badanych zwierząt nie wykrywano w ogóle [17, 32, 42] lub bardzo rzadko fenotypy świadczące o nabytej oporności na wankomycynę (VanA i VanB) [56, 72], które są charakterystyczne dla izolatów związanych z HAI. Od nielicznych zwierząt izolowano enterokoki z naturalnym fenotypem oporności na glikopeptydy (VanC) [36, 42]. Niemniej jednak badania przeprowadzone w różnych krajach wykazują bliskie pokrewieństwo izolatów VRE i ARE pochodzących od psów z izolatami odpowiedzialnymi za HAI u ludzi [28, 46, 66, 73].

## 6. Podsumowanie

Obecnie żadna nisza ekologiczna nie jest wolna od lekoopornych enterokoków i całkowita ich eradykacja ze środowiska wydaje się niemożliwa. Udział różnych środowisk jako źródła i rezerwuarów generujących i umożliwiających utrzymywanie lekooporności wśród enterokoków zmienia się i na siebie oddziałuje. Zjawisko narastania oporności wśród bakterii, w tym enterokoków jest problemem epidemiologicznym w skali globalnej. Nadużywanie antybiotyków nie tylko w lecznictwie szpitalnym, weterynarii, ale także przez hodowców zwierząt i producentów żywności, przy równoczesnym silnym ograniczeniu opcji terapeutycznych, będzie wpływało na pogłębianie się tego zjawiska.

## Piśmiennictwo

1. Aarestrup F.M., Bager F., Andersen J.S.: Association between the use of avilamycin for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers: epidemiological study and changes over time. *Microb. Drug Resist.* **6**, 71–75 (2000)
2. Abdel-Moein K.A., El-Hariri M.D., Wasfy M.O., Samir A.: Occurrence of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* carrying esp gene in pet animals: an upcoming threat for pet lovers. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **9**, 115–117 (2017)
3. Abe Y., Nakamura K., Yamada M., Yamamoto Y.: Encephalomalacia with *Enterococcus durans* infection in the brain stem and cerebral hemisphere in chicks in Japan. *Avian Dis.* **50**, 139–141 (2006)
4. Acar J., Casewell M., Freeman J., Friis C., Goossens H.: Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters: a plea for science in decision-making. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**, 477–482 (2000)
5. Agudelo Higueta N., Huycke M.: Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment (w) Enterococci from commensals to leading causes of drug resistant infection, red. Gilmore M, Clewell D, Ike Y, Shankar N, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, 2014, s. 65–99
6. Bager F., Madsen M., Christensen J., Aarestrup F.M.: Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev. Vet. Med.* **31**, 95–112 (1997)
7. van Belkun A., van den Braak N., Thomassen R., Verbrugh H., Endtz H.: Vancomycin-resistant enterococci in cats and dogs. *Lancet*, **348**, 1038–1039 (1996)
8. van den Bogaard A.E., Stobberingh E.E.: Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **14**, 327–335 (2000)
9. Bolin D.C., Williams N.M. i wsp.: Microbiologic and pathologic findings in an epidemic of equine pericarditis. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **17**, 38–44 (2005)
10. Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E., Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J.: Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 1–12 (2009)
11. Camargo C.H., Bruder-Nascimento A., Lee S.H.I., Júnior A.F., Kaneno R., Rall V.L.M.: Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* **45**, 111–115 (2014)
12. Cattoir V., Leclerc R.: Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 731–742 (2013)
13. Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Oporność na antybiotyki bakterii z rodzaju *Enterococcus* występujących w żywności. *Kosmos Probl. Nauk Biol.* **314**, 67–79 (2017)
14. Cheah A.L.Y., Spelman T., Liew D., Peel T., Howden B.P., Kong D.C.M.: Enterococcal bacteraemia: factors influencing mortality, length of stay and costs of hospitalization. *Eur. Soc. Clin. Infect. Dis.* **19**, E181–189 (2013)
15. Choi J.M., Woo G.J.: Transfer of tetracycline resistance genes with aggregation substance in food-borne *Enterococcus faecalis*. *Curr. Microbiol.* **70**, 476–484 (2015)
16. Cinquepalmi V., Monno R., Fumarola L., Ventrella G., Calia C., Greco M.F., Vito D. de, Soleo L.: Environmental contamination by dog's faeces: a public health problem? *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **10**, 72–84 (2012)
17. Damborg P., Sorensen A.H., Guardabassi L.: Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: first report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17. *Vet. Microbiol.* **132**, 190–196 (2008)
18. Delpech G., Pourcel G., Schell C., De Luca M., Basualdo J., Bernstein J., Grenovero S., Sparo M.: Antimicrobial resistance profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* iso-



- lated from artisanal food of animal origin in Argentina. *Foodborne Pathog. Dis.* **9**, 939–944 (2012)
19. Ding C., He J.: Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 925–941 (2010)
  20. ECDC. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf> (25.11.2017)
  21. Fisher K., Phillips C.: The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, **155**, 1749–1757 (2009)
  22. Fracalanza S.A.P., Scheidegger E.M.D., Santos P.F. dos, Leite P.C., Teixeira L.M.: Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **102**, 853–859 (2007)
  23. Godziszewska J., Guzek D., Głabski K., Wierzbička A.: Mobile antibiotic resistance – the spread of genes determining the resistance of bacteria through food products. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **70**, 803–810 (2016)
  24. Greła E.R., Lipiec A., Pisarski R.: Dodatki paszowe (w) Żywnienie zwierząt i paszoznastwo, red. Jamróz D, Potkański A, PWN, Warszawa, 2006, s. 311–315.
  25. Guzman Prieto A.M., van Schaik W., Rogers M.R., Coque T.M., Baquero F., Corander J., Willems R.J.: Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Front. Microbiol.* **26**, 788 (2016)
  26. Hammerum A.M.: Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 619–625 (2012)
  27. Hélie P., Higgins R.: Diarrhea associated with *Enterococcus faecium* in an adult cat. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **11**, 457–458 (1999)
  28. Herrero I.A., Fernandez-Garayzabal J.F., Moreno M.A.: Dogs should be included in surveillance programs for vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1384–1385 (2004)
  29. Hershberger E., Oprea S.F., Donabedian S.M., Perri M., Bozigar P., Bartlett P., Zervos M.J.: Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 127–130 (2005)
  30. Hollenbeck B., Rice L.: Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, **3**, 421–433 (2012)
  31. Iseppi R., Messi P., Anacarso I., Bondi M., Sabia C., Condò C., de Niederhausern S.: Antimicrobial resistance and virulence traits in *Enterococcus* strains isolated from dogs and cats. *New Microbiol.* **38**, 369–378 (2015)
  32. Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Davis J.A., Barrett J.B., Brousse J.H., Gustafson J., Kucher M.: Mechanisms of antimicrobial resistance and genetic relatedness among enterococci isolated from dogs and cats in the United States. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 2171–2179 (2009)
  33. Jahan M., Zhanel G.G., Sparling R., Holley R.A.: Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of *E. faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* **199**, 78–85 (2015)
  34. Johnston L.M., Jaykus L.-A.: Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3133–3137 (2004)
  35. Kataoka Y., Ito C., Kawashima A., Ishii M., Yamashiro S., Harada K., Ochi H., Sawada T.: Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from dogs and cats subjected to differing antibiotic pressures. *J. Vet. Med. Sci.* **75**, 749–753 (2013)
  36. Kataoka Y., Umino Y., Ochi H., Harada K., Sawada T.: Antimicrobial susceptibility of enterococcal species isolated from antibiotic-treated dogs and cats. *J. Vet. Med. Sci.* **76**, 1399–1402 (2014)
  37. Klare I., Konstabel C., Badstübner D., Werner G., Witte W.: Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 269–290 (2003)
  38. Klein G.: Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 123–131 (2003)
  39. Koluman A., Akan L.S., Cakiroglu F.P.: Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control*, **20**, 281–283 (2009)
  40. Kramer A., Schwebke I., Kampf G.: How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect. Dis.* **6**, 130 (2006)
  41. Kwon J.-W.: Mobility of veterinary drugs in soil with application of manure compost. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **87**, 40–44 (2011)
  42. López M., Tenorio C., Torres C.: Study of Vancomycin Resistance in faecal enterococci from healthy humans and dogs in Spain a decade after the avoparcin ban in Europe. *Zoonoses Public Health*, **60**, 160–167 (2013)
  43. Magiorakos A., Monnet D. i wsp.: 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)
  44. Makrai L., Nemes C., Simon A., Ivanics E., Dudás Z., Fodor L., Glávits R.: Association of *Enterococcus cecorum* with vertebral osteomyelitis and spondylolisthesis in broiler parent chicks. *Acta Vet. Hung.* **59**, 11–21 (2011)
  45. Mannu L., Paba A., Daga E., Comunian R., Zanetti S., Dupre I., Sechi L.A.: Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* **88**, 291–304 (2003)
  46. Manson J.M., Keis S., Smith J.M.B., Cook G.M.: Characterization of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VREF) isolate from a dog with mastitis: further evidence of a clonal lineage of VREF in New Zealand. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 3331–3333 (2003)
  47. Marsh-Ng M.L., Burney D.P., Garcia J.: Surveillance of infections associated with intravenous catheters in dogs and cats in an intensive care unit. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **43**, 13–20 (2007)
  48. Martinez J.L.: Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* **157**, 2893–2902 (2009)
  49. McGhee G.C., Guasco J., Bellomo L.M., Blumer-Schuette S.E., Shane W.W., Irish-Brown A., Sundin G.W.: Genetic analysis of streptomycin-resistant ( $Sm^R$ ) strains of *Erwinia amylovora* suggests that dissemination of two genotypes is responsible for the current distribution of  $Sm^R$  *E. amylovora* in Michigan. *Phytopathology*, **101**, 182–191 (2011)
  50. Mendes R.E., Deshpande L.M., Jones R.N.: Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist. Updat.* **17**, 1–12 (2014)
  51. Molton J.S., Tambyah P.A., Ang B.S.P., Ling M.L., Fisher D.A.: The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia. *Clin. Infect. Dis.* **56**, 1310–1318 (2013)
  52. Muller T., Ulrich A., Ott E.-M., Muller M.: Identification of plant-associated enterococci. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 268–278 (2001)
  53. O’Driscoll T., Crank C.W.: Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect. Drug Resist.* **8**, 217–230 (2015)
  54. Patel R., Gallagher J.C.: Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia pharmacotherapy. *Ann. Pharmacother.* **49**, 69–85 (2015)

55. Phillips I., Casewell M., Cox T., De Groot B., Friis C., Jones R., Nightingale C., Preston R., Waddell J.: Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 28–52 (2003)
56. Poeta P., Costa D., Rodrigues J., Torres C.: Study of faecal colonization by *vanA*-containing *Enterococcus* strains in healthy humans, pets, poultry and wild animals in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 278–280 (2005)
57. Pomba C., Couto N., Moodley A.: Treatment of a lower urinary tract infection in a cat caused by a multi-drug methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Enterococcus faecalis*. *J. Feline Med. Surg.* **12**, 802–806 (2010)
58. Pomba C., Törneke K. i wsp.: Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 957–968 (2017)
59. Pressel M.A., Fox L.E., Apley M.D., Simutis F.J.: Vancomycin for multi-drug resistant *Enterococcus faecium* cholangiohepatitis in a cat. *J. Feline Med. Surg.* **7**, 317–321 (2005)
60. Przeniosło-Siwczyńska M., Kwiatek K.: Dlaczego zakazano stosowania w żywieniu zwierząt antybiotykowych stymulatorów wzrostu? *Życie Weter.* **88**, 104–108 (2013)
61. Ranotkar S., Kumar P., Zutshi S., Prashanth K.S., Bezbaruah B., Anand J., Lahkar M.: Vancomycin-resistant enterococci: troublemaker of the 21st century. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2**, 205–212 (2014)
62. Rice L.B.: Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 183–187 (2001)
63. Rogers D.G., Zeman D.H., Erickson E.D.: Diarrhea associated with *Enterococcus durans* in calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**, 471–472 (1992)
64. Różańska H., Skrzypiec E., Osek J.: Pozostałości antybiotyków w żywności – ciągle aktualny problem. *Życie Weter.* **89**, 66–68 (2014)
65. Sergelidis D., Abraham A., Papadopoulos T., Kirkoudis J., Anagnostou V., Papavergou A., Papa A.: Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp. isolated from fresh water fish and personnel and equipment of fish markets in northern Greece. *J. Hell. Vet. Med. Soc.* **64**, 239–248 (2013)
66. Simjee S., White D.G., Mcdermott P.F., Wagner D.D., Zervos M.J., Donabedian S.M., English L.L., Hayes J.R., Walker R.D.: Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence of gene exchange between human and animal enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4659–4665 (2002)
67. Smith D.L., Dushoff J., Morris J.G.: Agricultural antibiotics and human health. *PLoS Med.* **2**, e232 (2005)
68. Song J.Y., Hwang I.S., Eom J.S., Cheong H.J., Bae W.K., Park Y.H., Kim W.J.: Prevalence and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci (VRE) strains isolated from animals and humans in Korea. *Korean J. Intern. Med.* **20**, 55–62 (2005)
69. Sundin G.W., Bender C.L.: Dissemination of the *strA*-*strB* streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants. *Mol. Ecol.* **5**, 133–143 (1996)
70. Talaga-Ćwiertnia K., Hońdo Ł., Bulanda M.: Dostępność leków do terapii zakażeń o etiologii wankomycynoopornych enterokoków w Polsce. *Zakażenia*, **17**, 15–20 (2017).
71. Thumu S.C.R., Halami P.M.: Acquired resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics in lactic acid bacteria of food origin. *Indian J. Microbiol.* **52**, 530–537 (2012)
72. Torres C., Tenorio C., Portillo A., García M., Martínez C., del Campo R., Ruiz-Larrea F., Zarazaga M.: Intestinal colonization by *vanA* – or *vanB2* – containing enterococcal isolates of healthy animals in Spain. *Microb. Drug Resist.* **9**, 47–52 (2003)
73. Tremblay C.-L., Charlebois A., Masson L., Archambault M., Novais C.: Characterization of hospital-associated lineages of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* from clinical cases in dogs and humans. *Front. Microbiol.* **4**, 245 (2013)
74. Werner G., Woodford N. i wsp.: Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.* **13**, 1–11 (2008)
75. Willems R.J., van Schaik W.: Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Futur. Microbiol.* **4**, 1125–1135 (2009)

## PATOGENY PRZENOSZONE PRZEZ KLESZCZE U OSÓB ZAKAŻONYCH WIRUSEM NIEDOBRU ODPORNOŚCI (HIV-1)

Renata Welc-Falęciak<sup>1,3\*</sup>, Małgorzata Bednarska<sup>1,3</sup>, Magdalena Szatan<sup>3</sup>,  
Agnieszka Pawełczyk<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Parazytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,

<sup>2</sup>Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>3</sup>Laboratorium Diagnostyki Zarażeń Pasożytniczych i Odzwierzęcych AmerLab Sp. z o. o.

Wpłynęło w lutym, zaakceptowano w maju 2018 r.

**Streszczenie:** Badania dotyczące występowania i różnorodności patogenów przenoszonych przez kleszcze u osób zakażonych wirusem HIV są nieliczne w porównaniu z innymi infekcjami towarzyszącymi zakażeniu HIV. Nieswoiste symptomy chorób odkleszczowych stanowią wyzwanie w opiece klinicznej i mogą prowadzić do błędnej diagnozy, szczególnie u pacjentów zakażonych wirusem HIV, u których często występuje jednocześnie wiele, mało specyficznych objawów klinicznych. Dodatkowo u pacjentów z obniżoną odpornością może wystąpić znaczne opóźnienie wytwarzania przeciwciał, przez co wyniki testów serologicznych mogą być błędnie interpretowane. Niniejszy przegląd koncentruje się na najczęstszych infekcjach przenoszonych przez kleszcze u pacjentów zakażonych wirusem HIV w Europie.

1. Wprowadzenie. 2. Kleszcze jako wektory. 3. Babesjoza. 3.1. Diagnostyka i leczenie. 4. Borelioza z Lyme. 4.1. Diagnostyka i leczenie. 5. Riketsjozy. 5.1. Diagnostyka i leczenie. 6. Podsumowanie

### Tick-Borne Pathogens in Individuals with Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Infection

**Abstract:** The studies on the occurrence and diversity of tick-borne infections in HIV-infected individuals have been few, and the subject has been relatively neglected when compared with other infections associated with HIV. Non-specific symptoms of tick-borne diseases pose a challenge in clinical care and may lead to misdiagnosis, especially in HIV-positive patients, who often experience many non-specific clinical symptoms. Additionally, in immunocompromised patients, a significant delay of antibody production may occur, and the results of a serological test may be misinterpreted. This review focuses on the most common tick-borne infections in HIV-positive patients in Europe.

1. Introduction. 2. Ticks as vectors. 3. Babesiosis. 3.1. Diagnostics and treatment. 4. Lyme borreliosis. 4.1. Diagnostics and treatment. 5. Rickettsiosis. 5.1. Diagnostics and treatment. 6. Conclusions

**Słowa kluczowe:** *Babesia*, *Borrelia*, HIV, *Rickettsia*

**Keywords:** *Babesia*, *Borrelia*, HIV, *Rickettsia*

## 1. Wprowadzenie

Od czasu wprowadzenia leków antyretrowirusowych i skutecznych schematów terapii antyretrowirusowej (HAART – Highly Active Antiretroviral Therapy) rokowanie dla osób zakażonych HIV (Human Immunodeficiency Virus) uległo znacznej poprawie. Obecnie czas przeżycia od chwili zdiagnozowania AIDS wydłużył się z kilku miesięcy w początkach epidemii do kilkudziesięciu lat [60]. Pomimo tego w 2016 r. na świecie zmarło około 1 mln osób zakażonych HIV [92]. W Polsce od 1985 r. zakażenie potwierdzono u ponad 22 tys. osób, z czego 1.4 tys. zmarło [72]. Większość przypadków śmiertelnych na świecie jest odnotowywana w krajach Afryki Subsaharyjskiej, gdzie częstość zakażeń oportunistycznych towarzyszących zakażeniu HIV/AIDS jest znacznie wyższa [20]. Zaburzenia układu immunologicznego, będące konsekwencją obniżonego poziomu limfocytów T CD4+, istotnie podnosi ryzyko zachorowań wywołanych przez patogeny, których namna-

żanie i chorobotwórczość jest zwykle kontrolowana przez humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną. Do najczęstszych chorób oportunistycznych towarzyszących zakażeniu HIV zaliczana jest gruźlica, wirusowe zapalenie wątroby typu B i C, kandydoza przełyku, pneumocystozowe zapalenie płuc, zakażenia MAC (*Mycobacterium avium* Complex) oraz malaria i leiszmanioza w regionach endemicznych [20]. Lista patogennych organizmów stanowiących istotne zagrożenie dla zakażonych HIV jest zdecydowanie dłuższa i zależy od badanego regionu, a wraz z postępem nauki ulega ciągłym modyfikacjom.

Szybko rozprzestrzeniające się choroby zakaźne (EID – Emerging Infectious Diseases) stanowią niezwykle istotny problem dla zdrowia publicznego [61]. Liczba przypadków EID znacząco wzrosła w latach 80. XX w., co było związane m.in. z pandemią HIV [80]. Zdecydowaną większość przypadków EID stanowią choroby odzwierzęce (zoonozy), spośród których w ponad 70% źródło zarażenia stanowią zwierzęta dziko żyjące.

\* Autor korespondencyjny: Renata Welc-Falęciak, Zakład Parazytologii, Wydział Biologii Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel.: 22 554 10 31; e-mail: rwelc@biol.uw.edu.pl

Prawie 30% przypadków EID stanowią tzw. choroby transmisyjne (vector-borne diseases), których czynnikiem etiologicznym są mikroorganizmy przenoszone przez krwio pijne stawonogi [45]. Najważniejszymi wektorami w aspekcie medycznym i weterynaryjnym są, zaraz po komarach, kleszcze.

Kleszcze są kompetentnymi wektorami dla wielu gatunków patogennych wirusów, bakterii czy pierwotniaków [84]. Istotnym problemem w epidemiologii chorób odkleszczowych są koinfekcje, czyli jednocześnie, wielogatunkowe zakażenia, szczególnie trudne do diagnostyki u ludzi. Koinfekcje u kleszczy są wynikiem ich żerowania na zwierzętach, które są żywicielami dla kilku różnych gatunków patogenów. Gryzonie i ptaki stanowią jedną z najważniejszych grup żywicieli, zarówno dla licznych patogenów (m. in. z rodzaju *Borrelia*, *Babesia*, *Anaplasma*, *Neoehrlichia*), jak i samych kleszczy (larw i nimf). Dlatego też u samic kleszczy, które często atakują ludzi i zwierzęta hodowlane, dochodzi do kumulacji patogenów nabytych podczas pasożytowania larw i nimf w wyniku transmisji transstadialnej (przekaz mikroorganizmów pomiędzy poszczególnymi stadiami rozwojowymi) i transowarialnej (przekaz mikroorganizmów na drodze samica-jajo-larwa). Zjawisko koinfekcji ma istotne znaczenie dla diagnostyki i leczenia chorób odkleszczowych. Warto podkreślić, że oprócz najlepiej poznanej drogi zakażenia z wykorzystaniem krwio pijnych stawonogów, infekcje patogenami wektorowanymi możliwe są także poprzez bezpośredni kontakt z krwią zarażonych zwierząt (np. podczas polowań) oraz w trakcie transfuzji krwi i preparatów krwiopochodnych od bezobjawowych dawców [68, 78].

U osób z niedoborami odporności (w tym zakażonych HIV) częściej obserwuje się kliniczne symptomy chorób przenoszonych przez krwio pijne stawonogi niż u osób immunokompetentnych, u których często mają one przebieg skąpo- bądź bezobjawowy [4, 39]. W niniejszej pracy zostaną omówione najczęstsze infekcje odkleszczowe u osób HIV-pozytywnych w Europie.

## 2. Kleszcze jako wektory

Głównym wektorem dla patogenów odkleszczowych w Europie jest kleszcz pospolity *Ixodes ricinus*. Gatunek ten związany jest z lasami liściastymi i mieszanymi, jednak obserwowana przez ostatnie dekady ekspansja *I. ricinus* pozwoliła poszerzyć zasięg jego występowania o północne obszary kontynentu oraz tereny położone na wyższej wysokości [29, 44, 46]. Wzrost zagażenia kleszczy, także na obszarach zurbanizowanych, oraz wydłużenie okresu aktywności tych pajęczaków są prawdopodobnie wynikiem zmian zachodzących w środowisku m.in. w użytkowaniu gruntów w rolnic-

twie, zarządzaniu lasami, zmianami w liczebności i rozmieszczeniu wolno żyjących zwierząt oraz zmianami klimatu [15, 53, 59, 67]. Obserwowane zmiany przekładają się bezpośrednio na wzrost ryzyka transmisji patogenów przenoszonych przez kleszcze, co może stanowić istotny problem dla osób z zaburzeniami układu immunologicznego, których udział w społeczeństwie stale wzrasta [48].

Żywicielami dla kleszczy *I. ricinus* może być ponad 300 gatunków kręgowców [84]. Cykl życiowy kleszczy pospolitych obejmuje trzy aktywne stadia rozwojowe (larwa, nimfa, osobnik dorosły), które poszukują żywiciela, odżywiają się jego krwią, a następnie linieją lub składają jaja (samice). Okres pasożytowania kleszczy na żywicielu ogranicza się do kilku lub kilkunastu dni (larwy 3–5 dni, nimfy 4–7 dni, samice 7–11 dni), podczas gdy czas życia wszystkich stadiów rozwojowych może trwać kilka lat [84]. Ten niezwykle złożony cykl życia sprawia, że kleszcze są podatne na zmiany w strukturze siedlisk i dostępności żywicieli.

Odsetek zakażonych w Polsce kleszczy *I. ricinus* różni się w zależności od obszaru badań. Dla krętków *Borrelia burgdorferi* ekstensywność zakażenia kleszczy waha się w granicach od 4% do ponad 25% [22, 49, 79, 93, 98], obecność DNA *Rickettsia* (*R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. raoulti*) potwierdzono nawet u 28% badanych osobników *I. ricinus* [9, 21, 91]. Zakażenie pierwotniakami z rodzaju *Babesia* (*B. microti*, *B. venatorum*) wykazano u 1–13% kleszczy w zależności od badanego regionu [77, 79, 82, 83, 90].

## 3. Babeszjoza

Babeszjoza jest chorobą odkleszczową, wywołaną u ludzi przez pierwotniaki z rodzaju *Babesia* głównie w USA (*B. microti*) i Europie (*B. divergens*, pojedyncze przypadki zarażeń z udziałem *B. venatorum* i *B. microti*) [39]. W USA w roku 2014 odnotowano ponad 1700 przypadków babeszjozy [17]. W Europie dotychczas opisano ponad 50 przypadków zachorowań, jednak ich przebieg był znacznie ostrzejszy niż w USA [39].

Babeszjoza, określaną także jako ‘malaria północy’ ze względu na podobieństwo morfologii *Babesia* i *Plasmodium* oraz objawów chorobowych powodowanych przez oba gatunki pierwotniaków, u osób zdrowych zwykle ma przebieg skąpo- bądź bezobjawowy. Zarażenie jest szczególnie niebezpieczne dla osób z obniżoną odpornością (zakażonych HIV, przyjmujących leki immunosupresyjne, asplenicznych, po radio- i chemioterapii). Wzrost zachorowań na babeszjozę w ostatnich latach można wiązać zarówno ze zwiększoną ekspozycją na kleszcze, jak i wzrostem liczby pacjentów z zaburzeniami odporności generowanymi m.in. wrodzonymi

i nabytymi niedoborami odporności, jak również leczeniem immunosupresyjnym [39]. Pojawia się także coraz więcej udokumentowanych doniesień o transmisji pierwotniaków z przetaczaną krwią i jej składnikami. Przypadki te charakteryzuje cięższy, często zakończony zgonem przebieg [38, 54]. W inwazji *Babesia* utrzymuje się długotrwała faza przewlekła [51, 89], która często przy braku objawów i bardzo niskiej parazytemii stwarza realne zagrożenie zakażeniami potransfuzyjnymi dla biorców, szczególnie tych z zaburzeniami odporności [38, 54].

Przypadki zarażeń *Babesia* u osób zakażonych HIV odnotowano dotychczas w USA [8, 32, 34, 56, 63, 86] oraz jeden przypadek na terenie Europy, w Hiszpanii [37]. Badania molekularne potwierdziły zarażenia z udziałem *B. microti* (USA [34, 86]) lub *B. divergens* (Hiszpania [37]). W pojedynczych przypadkach pełnobjawowe zarażenia *Babesia* obserwowano u asplenicznych pacjentów HIV pozytywnych [56, 63] lub objawy chorobowe pojawiły się dopiero po splenektomii [37].

Objawy zarażenia *Babesia* pojawiają się około 5–30 dni po ugryzieniu przez kleszcza, jednak wiele osób nie pamięta kontaktu z pajęczakiem [41]. Obraz kliniczny babeszjozy jest mało specyficzny, podobny do malarii i obejmuje typowe symptomy grypopodobne tj. wysoka gorączka (powyżej 40°C), dreszcze, zmęczenie, bóle głowy i mięśni, bóle brzucha, oraz hepatosplenomegalię. Niektórzy pacjenci skarżą się na ból gardła, światłowstręt, nietypowe zabarwienie moczu lub chwiejność emocjonalną. U osób z obniżoną odpornością, oprócz wyżej wymienionych objawów, odnotowywano również obfite pocenie się, silną anemię związaną z wysoką parazytemią, żółtaczkę, objawy neurologiczne oraz niewydolność krążeniowo-oddechową. U pacjentów zakażonych HIV obserwowano długotrwałą fazę przewlekłą zarażenia pierwotniakami, trwającą kilka miesięcy pomimo stosowanego leczenia oraz nawroty choroby wymagające transfuzji krwi ze względu na wysoką parazytemię [86]. Wydaje się, że przyczyną tego zjawiska jest obniżona produkcja interferonu gamma (INF- $\gamma$ ) przez komórki NK (Natural Killer) u osób HIV pozytywnych, jednej z najważniejszych cytokin biorących udział w zwalczaniu wczesnego stadium infekcji *Babesia* u myszy [2, 43, 58] oraz obniżona liczba limfocytów T CD4+, które odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko *Babesia*, co wykazano w badaniach na modelu mysim [23]. Brakuje danych dotyczących wpływu zakażenia HIV na patogenę babeszjozy. Wzajemne oddziaływania w przebiegu koinfekcji zostały za to udowodnione w przypadku zakażeń *Plasmodium*/HIV [3]. Infekcja HIV zwiększa ryzyko nasilenia przebiegu malarii, co z kolei ułatwia tempo jej przenoszenia. Zakażenie *Plasmodium* wiąże się także z silną aktywacją limfocytów T CD4 +

i wzrostem stężenia cytokin prozapalnych, co ułatwia rozprzestrzenianie wirusa wśród limfocytów T CD4+ i jego szybką replikację [3].

### 3.1. Diagnostyka i leczenie

Obecnie w Europie diagnostyka babeszjozy opiera się na bezpośredniej identyfikacji pierwotniaków we krwi pacjenta na podstawie obserwacji mikroskopowych cienkiego rozmazu krwi lub PCR [39]. Formy pierwotniaka w erytrocytach rozmazów krwi barwionych metodą Giemsa są zwykle widoczne u pacjentów objawowych. W przypadku niskiej parazytemii oraz w początkowej fazie infekcji konieczne może być powtórzenie rozmazu w odstępach 8–12 godzinnych [41]. Metoda PCR, gdzie najczęściej stosowanym markerem jest gen *18S rRNA*, charakteryzuje się wysoką specyficznością i czułością [11], jednak dotychczas na rynku europejskim nie są dostępne standaryzowane testy molekularne przeznaczone do rutynowej diagnostyki babeszjozy [39]. Uważa się, że u osób z obniżoną odpornością należy powtórzyć badania krwi po okresie kilku miesięcy od zakończenia leczenia w celu wykluczenia fazy przewlekłej zarażenia [34].

Badania serologiczne w diagnostyce babeszjozy oparte są na teście immunofluorescencji pośredniej (IF). Specyficzne dla *B. microti* przeciwciała klasy IgM mogą być wykrywane już po upływie dwóch tygodni od zarażenia [16]. Podwyższony poziom przeciwciał może utrzymywać się od kilkunastu miesięcy do 6 lat. U osób z niedoborami odporności, w tym zakażonych HIV, zaobserwowano zaburzenia w produkcji przeciwciał, co wydłuża okres okienka serologicznego [39]. Wyniki fałszywie pozytywne testu IF obserwowano u pacjentów z chorobami tkanki łącznej i autoimmunologicznymi [42] oraz inwazjami pasożytniczymi z udziałem *Toxoplasma* i *Plasmodium* [35, 42], co tłumaczy się występowaniem reakcji krzyżowych.

W leczeniu objawowej babeszjozy stosuje się atowakwon, azytromycynę, klindamycynę i chininę. U pacjentów zakażonych HIV może być konieczne stosowanie wyższych dawek oraz dłuższego czasu leczenia w celu całkowitego usunięcia pierwotniaków [52]. U pacjentów ze znacznie obniżoną odpornością obserwowano oporność na azytromycynę-atowakwon w trakcie leczenia babeszjozy [94]. W nielicznych przypadkach standardowa terapia babeszjozy u osób zakażonych HIV była nieskuteczna. Wówczas w schemat terapii włączano transfuzje krwi oraz atowakwon-proguanil, powszechnie stosowany zarówno w profilaktyce, jak i leczeniu malarii [86]. Dodatkowo u pacjentów z HIV obserwowano skuteczne leczenie babeszjozy antybiotykami stosowanymi w równoległej terapii infekcji oportunistycznych (*Mycobacterium avium*) [32].

#### 4. Borelioza z Lyme

Krętki z gatunku *B. burgdorferi* są czynnikiem etiologicznym boreliozy z Lyme, najczęściej występującej w USA i Europie choroby odkleszczowej. W ostatnich latach w Europie odnotowuje się każdego roku około 65 tys. przypadków nowych zachorowań [40], w Polsce – ok. 20 tys. [62]. Najczęstszym symptomem klinicznym wczesnej fazy miejscowej zakażenia jest rumień wędrujący (EM – *erythema migrans*). W fazie rozsianej zakażenia bakterie penetrują do tkanek organizmu, głównie skóry, centralnego układu nerwowego, stawów i serca [81]. We wczesnej neuroboreliozie najczęściej występuje zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie nerwu twarzowego lub innych nerwów czaszkowych, zapalenie korzeni nerwowych [98]. W boreliozie późnej obserwuje się m.in. zapalenie mózgu i rdzenia (neuroborelioza), nadżerki chrząstek i kości (postać stawowa) czy przewlekłe zanikowe zapalenie skóry (ACA – *acrodermatitis chronica atrophicans*) [81]. W USA jedynym patogennym dla ludzi gatunkiem jest *B. burgdorferi* sensu stricto. W Europie, co najmniej pięć gatunków uznano za chorobotwórcze (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*), czego skutkiem jest znacznie większa niż w USA różnorodność objawów klinicznych boreliozy [81].

Dotychczas odnotowano jedynie kilka przypadków zakażeń *Borrelia* u osób HIV pozytywnych [13, 85], pomimo wysokiej częstości występowania zakażeń HIV na terenach endemicznych dla boreliozy. W większości były to wczesne infekcje, ale przebiegające z objawami ze strony układu nerwowego, w jednym przypadku (Holandia) potwierdzono neuroboreliozę przebiegającą m. in. z parastezją kończyn dolnych, bez objawów skórnych [13, 85]. Objawy towarzyszące zakażeniom *Borrelia* u osób HIV-pozytywnych to gorączka, bóle głowy, dreszcze, utrata wagi, obustronne porażenie twarzy, diplopia, zapalenie korzeni nerwowych oraz bóle stawów i mięśni [13, 18, 28, 85]. U chorych obserwowano także niewielkie podwyższenie poziomu enzymów wątrobowych we wczesnej fazie choroby, podwyższony wskaźnik sedymentacji erytrocytów (rzadko przekraczający 80 mm/h) oraz pleocytozę limfocytarną i podwyższony poziom białka w płynie mózgowo-rdzeniowym [95]. Wydaje się, że u osób zakażonych HIV przebieg infekcji jest cięższy, z nietypowymi objawami neurologicznymi w porównaniu do pacjentów ze stwierdzoną neuroboreliozą z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym [13].

Niewiele wiadomo na temat przebiegu koinfekcji z udziałem HIV i *B. burgdorferi* oraz mechanizmów immunologicznych w przebiegu zakażenia HIV, które mogłyby wpływać na infekcje krętkami. Najprawdopodobniej niski poziom limfocytów T CD4+ jest przyczyną silnej bakteriemii i ostrzejszego przebiegu bore-

liozy, co zaobserwowano na modelach zwierzęcych [6, 12]. Co ciekawe, u pacjentów z neuroboreliozą zaobserwowano istotnie wyższy poziom wirerii HIV w płynie mózgowo-rdzeniowym w porównaniu do osocza [13]. Tłumaczy się to aktywacją stanu zapalnego przez bakterie i napływem limfocytów zakażonych HIV do centralnego układu nerwowego („ścieżka konia trojańskiego”) [7]. Więcej wiadomo na temat współistniejących zakażeń HIV i krętków *Treponema pallidum*. U osób HIV-pozytywnych częściej obserwuje się bezobjawowy przebieg wczesnej kiły oraz szybszy nawrót kiły II okresu, której przebieg jest zazwyczaj bardziej agresywny z towarzyszącymi objawami neurologicznymi [48, 71]. Nie wykazano wpływu koinfekcji na skuteczność leczenia *T. pallidum*, było ono tak samo skuteczne dla osób zakażonych HIV, jak i zdrowej populacji [48, 71].

Profilaktyczna antybiotykoterapia u osób zakażonych HIV lub leczenie stosowane w przypadku infekcji oportunistycznych mogą także mieć wpływ na przebieg boreliozy z Lyme [85]. Dotychczas brakuje danych dotyczących wpływu leków antyretrowirusowych na krętki *Borrelia*. Jednak biorąc pod uwagę, że neuroborelioza była diagnozowana u pacjentów przyjmujących terapię HAART, powyższy związek wydaje się być mało prawdopodobny [85]. Pomimo licznych przypadków zakażenia HIV, koinfekcje z udziałem *Borrelia* nie są często notowane, co jest trudne do wytłumaczenia. Niektórzy autorzy sugerują, że znaczenie może mieć także fakt, że borelioza z Lyme jest chorobą diagnozowaną najczęściej u mieszkańców terenów wiejskich i podmiejskich ze względu na ich częstszy kontakt z kleszczami, podczas gdy zakażenia HIV są charakterystyczne dla obszarów miejskich [18]. Należy jednak wziąć pod uwagę obserwowany ostatnio wzrost zagęszczenia kleszczy na zielonych terenach miejskich, silnie zurbanizowanych oraz występowanie na tych obszarach patogennych gatunków mikroorganizmów przenoszonych przez te pajęczaki [50, 91].

##### 4.1. Diagnostyka i leczenie

Rumień wędrujący, któremu mogą towarzyszyć objawy grypopodobne, jest jedynym swoistym objawem zakażenia krętkami *B. burgdorferi* i jest wskazaniem do rozpoczęcia leczenia. We wczesnym stadium choroby specyficzne przeciwciała nie są jeszcze obecne, co może być przyczyną wyników fałszywie negatywnych testów serologicznych [1, 27]. Obecnie, ok. 4–6 tygodni po zakażeniu, zalecana jest serologiczna diagnostyka dwustopniowa obejmująca przesiewowy test immunoenzymatyczny ELISA należący przynajmniej do testów II generacji oraz test potwierdzający Wetern Blot wykonywany w przypadku wyniku pozytywnego lub wątpliwego testu ELISA z tej samej próbki surowicy [1]. Należy wziąć pod uwagę, że swoiste przeciwciała

wykrywane są także wśród zdrowej populacji i odsetek ten może być znaczny (od kilku do nawet 50% w grupach zwiększonego ryzyka) [19].

Diagnostyka boreliozy z Lyme u osób zakażonych HIV jest uważana za skomplikowaną z powodu obniżonego PPV (Positive Predictive Value) dla badań serologicznych u tej grupy pacjentów [27, 69]. Obecnie większość pacjentów osiąga satysfakcjonującą odbudowę immunologiczną i ryzyko obniżonego PPV dla badań serologicznych jest znacznie niższe [27]. Zarówno przypadki wyników fałszywie negatywnych, jak i fałszywie pozytywnych były opisywane dla pacjentów zakażonych HIV [69]. W pojedynczych przypadkach nie potwierdzono obecności specyficznych przeciwciał w płynie mózgowo-rdzeniowym w przebiegu neuroboreliozy [28]. Wykazano natomiast fałszywie pozytywne wyniki badań serologicznych u osób zakażonych HIV i kiłą oraz reakcje krzyżowe z innymi krętkami (*T. pallidum*) [10]. Dlatego u osób zakażonych HIV pośrednie metody diagnostyczne oparte na testach serologicznych powinny zostać uzupełnione o metody bezpośredniej identyfikacji patogenu m. in. z wykorzystaniem technik biologii molekularnej (PCR) [31]. O ile czułość metody PCR jest bardzo wysoka (98–100%), to jej specyficzność zależna jest od wybranego do badań materiału. Zalecany materiałem jest wycinek skóry (rumień wędrujący, ACA; specyficzność 73–76%), płyn mózgowo-rdzeniowy (38%), płyn stawowy lub chrząstka stawowa (78%) [1]. Specyficzność metody PCR z wykorzystaniem krwi pełnej lub surowicy jest dość niska (14%), dlatego uzyskane wyniki wymagają potwierdzenia (sekwencjonowania). Najczęstszymi markerami genetycznymi w identyfikacji zakażeń *B. burgdorferi* są geny *16S rRNA* i białka powierzchniowego OspA [31].

Zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych w leczeniu boreliozy stosuje się doksycylinę lub amoksycylinę, azytromycynę lub klarytromycynę w przypadku rumienia wędrującego u osób z nadwrażliwością na antybiotyki  $\beta$ -laktamowe [65]. W przypadku neuroboreliozy lekiem z wyboru jest ceftriaksone lub cefotaksym. U osób zakażonych HIV z powodzeniem stosuje się powyższą antybiotykoterapię [13]. Zarówno wśród osób immunokompetentnych, jak i z obniżoną odpornością, nawracające gorączki, leukopenia, trombocytopenia i anemia w przebiegu boreliozy pomimo podanego leczenia wymagają dalszej diagnostyki pod kątem koinfekcji odkleszczowych z udziałem *Babesia* i/lub *Anaplasma phagocytophilum* towarzyszących zakażeniu *Borrelia* [96].

## 5. Riketsjozy

Riketsjozy odkleszczowe powodowane są przez wewnątrzkomórkowe, Gram-ujemne bakterie należące do rodzaju *Rickettsia* wywołujące gorączki pla-

miste (SFG – Spotted Fever Group). Obecnie znanych jest około 30 gatunków, z czego co najmniej 13 uważanych jest za patogenne dla człowieka m.in. *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. slovaka*, *R. raoultii*, *R. monacensis*, *R. rioja* [64]. Riketsje, po wnikięciu do organizmu żywiciela, wnikają do komórek nabłonka małych i średnich naczyń krwionośnych prowadząc do stanu zapalnego na skutek efektu cytotoksycznego [87, 88]. W większości przypadków obserwowane są plamiste wykwity skórne, którym czasami towarzyszy nekrotyczna grudka. Efekt cytotoksyczny skutkuje wytworzeniem rozsianych wielonarządowych zmian obejmujących zapalenie naczyń krwionośnych, wybroczyny i wylewy w obrębie drobnych naczyń skóry, płuc, serca, nerek i mózgu, a także innych narządów wewnętrznych. Uszkodzenie śródbłonka naczyń prowadzi do ogniskowej martwicy, tworzenia się nacieków wokół tych naczyń i do zwolnienia przepływu krwi w naczyniach włosowatych. Niedokrwienie i niedotlenienie prowadzi z kolei do uszkodzenia narządów i układów, m.in. ośrodkowego układu nerwowego, nerek, nadnerczy, czy mięśnia sercowego. Zakażenie riketsjami może prowadzić do nawracających gorączek o nieznannej etiologii, a w najcięższych przypadkach m.in. do zapalenia mięśnia sercowego czy zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego [87, 88]. Bez leczenia, mało swoiste symptomy, takie jak podwyższona temperatura ciała, uczucie zmęczenia, zawroty i bóle głowy, poty, bóle mięśni i utrata apetytu, mogą utrzymywać się nawet przez 18 miesięcy od zakażenia [87, 88].

W Europie najczęściej notowana jest gorączka guzkowa (MSF – Mediterranean Spotted Fever) powodowana głównie przez *R. conorii*, rzadziej przez *R. monacensis* [64]. Gorączka ta występuje w basenie Morza Śródziemnego, na wybrzeżu Morza Czarnego i Kaspijskiego [64]. Okres inkubacji wynosi ok. 10 dni (od 4 do 21 dni), pierwsze symptomy obejmują gorączkę, bóle głowy, mięśni i stawów oraz światłowstręt. U ponad 70% zakażonych, na skórze pojawia się pojedyncza zmiana w postaci czarnego strupa ('tache noir') w miejscu ukąszenia przez kleszcza, w pojedynczych przypadkach, głównie u dzieci, zmiany te mogą być liczne [25]. Po kilku dniach pojawia się grudkowa wysypka. Ciężkie formy zakażenia, czasem prowadzące do śmierci (około 3% przypadków), opisano wśród osób starszych, chorujących na cukrzycę, niewydolność krążeniową, niewydolność nerek, chorobę alkoholową oraz u pacjenta po przeszczepie wątroby, ale także u osób immunokompetentnych [5, 14, 24, 25, 30, 36, 73, 75].

W odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko *Rickettsia* wydaje się, że kluczową rolę odgrywają limfocyty T CD4+ i T CD8+ [57]. Limfocyty T wytwarzają interferon gamma (INF- $\gamma$ ), który pełni kluczową rolę w kontrolowaniu zakażenia *Rickettsia*, poprzez aktywację komórek śródbłonka będących miejscem

docelowej lokalizacji bakterii, co prowadzi do efektywnej eliminacji patogenów [5]. Wykazano jednak, że deplecja limfocytów T CD4+ u myszy nie miała wpływu na przebieg infekcji *Rickettsia* [57], w przeciwieństwie do limfocytów T CD8+, których deplecja skutkowałą długotrwałą bakteremią, ostrą infekcją i często śmiercią zwierząt [87].

Dotychczas opisano pojedyncze przypadki zakażeń *Rickettsia* u osób HIV pozytywnych [26]. Symptomy infekcji obejmują gorączkę, bóle głowy, bóle mięśni i stawów, hepatomegalię oraz charakterystyczną wysypkę guzkowatą i czarny strup w miejscu ukąszenia przez kleszcza. Obserwowano także obecność licznych wybroczyn i znaczną trombocytopenię, co może wskazywać na skłonność pacjentów zakażonych HIV do szybszego rozwoju choroby oraz cięższego jej przebiegu [26]. Opisano także pacjentów, u których pierwsze, nieswoiste symptomy zakażenia HIV były podobne do ostrej mononukleozy [74] i zostały pierwotnie zdiagnozowane jako MSF [76]. W tych przypadkach zakażenie HIV rozpoznano w odstępie kilku dni lub lat od pojawienia się pierwszych objawów zbliżonych do MSF.

### 5.1. Diagnostyka i leczenie

W początkowej fazie zakażenia diagnostyka oparta jest o metody molekularne (PCR), a materiał do badań stanowi krew pełna, leukocyty z krwi obwodowej, materiał biopsyjny pobrany ze zmian skórnych i/lub węzłów chłonnych [55]. Najczęściej stosowane markery genetyczne to gen *16S rRNA*, *gltA* (syntaza cytrynianowa), *ompA* oraz *ompB* (białko powierzchniowe A i B). Ze względu na liczbę znanych gatunków i podgatunków chorobotwórczych *Rickettsia* zalecane jest sekwencjonowanie otrzymanych produktów PCR [55].

Metody immunodiagnostyczne (IFA, ELISA) stanowią 'złoty standard' w diagnostyce riketsjoz [66]. Ich czułość/specyficzność szacowana jest na poziomie 83–100%. Główne ograniczenia wynikają z niskiej czułości testów w fazie ostrej infekcji (przeciwciała klasy IgM i IgG pojawiają się po upływie 7–15 dni od wystąpienia pierwszych objawów) oraz, w przypadku IFA, reakcji krzyżowych z *Legionella* sp., *Proteus* sp. oraz *Francisella tularensis* [55]. Przeciwciała klasy IgM mogą utrzymywać się przez kilka miesięcy, a IgG – nawet przez kilka lat, co uzasadnia porównanie poziomu obu klas przeciwciał w fazie ostrej i w fazie zdrowienia w celu potwierdzenia rozpoznania [70]. W przypadku pacjentów zakażonych HIV diagnostyka oparta była na detekcji DNA *Rickettsia* metodą Real-Time PCR z krwi pełnej oraz testie IFA przeprowadzonym dwa tygodnie po wystąpieniu pierwszych objawów [26].

W leczeniu riketsjoz, zarówno u osób immunokompetentnych, jak i z obniżoną odpornością, stosuje się doksycyklinę przez okres 7–10 dni [26, 33].

## 6. Podsumowanie

Choroby odkleszczowe u osób zakażonych HIV zazwyczaj przebiegają z odmiennymi i/lub ostrzejszymi niż u osób immunokompetentnych symptomami klinicznymi. Stosowane powszechnie w diagnostyce rutynowej metody serologiczne u pacjentów HIV pozytywnych mogą z wyższą częstością, niż w przypadku zdrowej populacji, wskazywać wyniki fałszywie pozytywne lub fałszywie negatywne oraz reakcje krzyżowe. Dlatego też w tej grupie pacjentów metody wykrywania zakażeń/zarażeń oparte na bezpośredniej detekcji patogenów (DNA/RNA, antygeny) nabierają istotnego znaczenia. Na terenach endemicznych należy zatem szczególnie rozważyć historię ukąszeń przez kleszcze jako część wywiadu w klinicznej opiece nad pacjentami zakażonymi wirusem HIV.

Badania finansowane w ramach projektu Iuventus Plus nr IP2014050373 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

## Piśmiennictwo

1. Agüero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P.: Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 484–509 (2005)
2. Aguilar-Delfin I., Wettstein P.J., Persing D.H.: Resistance to acute babesiosis is associated with interleukin-12- and gamma interferon-mediated responses and requires macrophages and natural killer cells. *Infect. Immun.* **71**, 2002–2008 (2003)
3. Alemu A., Shiferaw Y., Addis Z., Mathewos B., Birhan W.: Effect of malaria on HIV/AIDS transmission and progression. *Parasit. Vectors*, **6**, 18 (2013)
4. Bakken J.S., Dumler J.S.: Human granulocytic anaplasmosis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **29**, 341–355 (2015)
5. Barrio J., de Diego A., Ripoll C., Perez-Calle J.L., Núñez O., Salcedo M., Clemente G.: Mediterranean spotted fever in liver transplantation: a case report. *Transplant Proc.* **34**, 1255–1256 (2002)
6. Barthold S.W., Sidman C.L., Smith A.L.: Lyme borreliosis in genetically resistant and susceptible mice with severe combined immunodeficiency. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**, 605–613 (1992)
7. Bell J.E.: An update on the neuropathology of HIV in the HAART era. *Histopathology*, **45**, 549–559 (2004)
8. Benezra D., Brown A.E., Polsky B., Gold J.W., Armstrong D.: Babesiosis and infection with human immunodeficiency virus (HIV). *Ann. Intern. Med.* **107**, 944 (1987)
9. Biernat B., Stańczak J., Michalik J., Sikora B., Cieniuch S.: *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis* infections in immature *Ixodes ricinus* ticks derived from sylvatic passerine birds in west-central Poland. *Parasitol. Res.* **115**, 3469–3477 (2016)
10. Blatz R., Kühn H.J., Hermann W., Rytter M., Rodloff A.C.: Neurosyphilis and neuroborreliosis. Retrospective evaluation of 22 cases. *Nervenarzt.* **76**, 724–732 (2005)
11. Bloch E.M., Lee T.H., Krause P.J., Telford S.R. 3rd, Montalvo L., Chafets D., Usmani-Brown S., Lepore T.J., Busch M.P.: Development of a real-time polymerase chain reaction assay for sensitive detection and quantitation of *Babesia microti* infection. *Transfusion*, **53**, 2299–2306 (2013)



12. Bockenstedt L.K., Kang I., Chang C., Persing D., Hayday A., Barthold S.W.: CD4+ T helper 1 cells facilitate regression of murine Lyme carditis. *Infect. Immun.* **69**, 5264–5269 (2001)
13. Bremell D., Säll C., Gisslén M., Hagberg L.: Lyme neuroborreliosis in HIV-1 positive men successfully treated with oral doxycycline: a case series and literature review. *J. Med. Case Rep.* **5**, 465 (2011)
14. Brouqui P., Parola P., Fournier P.E., Raoult D.: Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **49**, 2–12 (2007)
15. Buczek A., Ciura D., Bartosik K., Zając Z., Kulisz J.: Threat of attacks of *Ixodes ricinus* ticks (Ixodida: Ixodidae) and Lyme borreliosis within urban heat islands in south-western Poland. *Parasit. Vectors*, **7**, 562 (2014)
16. Centers of Disease Control and Prevention, CDC, Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern, <https://www.cdc.gov/dpdx/babesiosis/dx.html> (styczeń 2018 r.)
17. Centers of Disease Control and Prevention, CDC, Surveillance for Babesiosis - United States, 2014, [https://www.cdc.gov/parasites/babesiosis/resources/babesiosis\\_surveillance\\_summary\\_2016.pdf](https://www.cdc.gov/parasites/babesiosis/resources/babesiosis_surveillance_summary_2016.pdf) (styczeń 2018 r.)
18. Cerný R., Machala L., Bojar M., Rozsypal H., Pícha D.: Neuroborreliosis in an HIV-1 positive patient. *Infection*, **34**, 100–102 (2006)
19. Cetin E., Sotoudeh M., Auer H., Stanek G.: Paradigm Burgenland: risk of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection indicated by variable seroprevalence rates in hunters. *Wien. Klin. Wochenschr.* **118**, 677–681 (2006)
20. Chang C.C., Crane M., Zhou J., Mina M., Post J.J., Cameron B.A., Lloyd A.R., Jaworowski A., French M.A., Lewin S.R.: HIV and co-infections. *Immunol. Rev.* **254**, 114–142 (2013)
21. Chmielewski T., Podsiadły E., Karbowski G., Tylewska-Wierzbanowska S.: *Rickettsia* spp. in ticks, Poland. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 486–488 (2009)
22. Cisak E., Wójcik-Fatla A., Stojek N., Chmielewska-Badora J., Zwoliński J., Buczek A., Dutkiewicz J.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (eastern Poland). *Ann. Agric. Environ. Med.* **13**, 301–306 (2006)
23. Clawson M.L., Paciorkowski N., Rajan T.V., La Vake C., Pope C., La Vake M., Wikel S.K., Krause P.J., Radolf J.D.: Cellular immunity, but not gamma interferon, is essential for resolution of *Babesia microti* infection in BALB/c mice. *Infect. Immun.* **70**, 5304–5306 (2002)
24. Colomba C., Saporito L., Colletti P., Mazzola G., Rubino R., Pampinella D., Titone L.: Atrial fibrillation in Mediterranean spotted fever. *J. Med. Microbiol.* **57**, 1424–1426 (2008)
25. Colomba C., Saporito L., Siracusa L., Giammanco G., Bonura S., Titone L.: Mediterranean spotted fever in paediatric and adult patients: two clinical aspects of the same disease. *Infez. Med.* **19**, 248–253 (2011)
26. Colomba C., Siracusa L., Madonia S., Saporito L., Bonura C., De Grazia S., Giammanco G.M.: A case of spotted fever rickettsiosis in a human immunodeficiency virus-positive patient. *J. Med. Microbiol.* **62**, 1363–1364 (2013)
27. Cook M.J., Puri B.K.: Application of Bayesian decision-making to laboratory testing for Lyme disease and comparison with testing for HIV. *Int. J. Gen. Med.* **10**, 113–123 (2017)
28. Cordoliani F., Vignon-Pennamen M.D., Assous M.V., Vabres P., Dronne P., Rybojad M., Morel P.: Atypical Lyme borreliosis in an HIV-infected man. *Br. J. Dermatol.* **137**, 437–439 (1997)
29. Daniel M., Materna J., Honig V., Metelka L., Danielová V., Harcarik J., Kliegrová S., Grubhoffer L.: Vertical distribution of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne pathogens in the northern Moravian mountains correlated with climate warming (Jeseníky Mts., Czech Republic). *Cent. Eur. J. Public Health*, **17**, 139–145 (2009)
30. de Sousa R., Walker D.H. i wsp.: Host- and microbe-related risk factors for and pathophysiology of fatal *Rickettsia conorii* infection in Portuguese patients. *J. Infect. Dis.* **198**, 576–585 (2008)
31. Dunaj J., Moniuszko A., Zajkowska J., Pancewicz S.: The role of PCR in diagnostics of Lyme borreliosis. *Przegl. Epidemiol.* **67**, 35–39 (2013)
32. Falagas M.E., Klemmner M.S.: Babesiosis in patients with AIDS: a chronic infection presenting as fever of unknown origin. *Clin. Infect. Dis.* **22**, 809–812 (1996)
33. Fang R., Blanton L.S., Walker D.H.: Rickettsiae as Emerging Infectious Agents. *Clin. Lab. Med.* **37**, 383–400 (2017)
34. Froberg M.K., Dannen D., Bakken J.S.: Babesiosis and HIV. *Lancet*, **363**, 704 (2004)
35. Gabrielli S., Galuppi R., Marcer F., Marini C., Tampieri M.P., Moretti A., Pietrobelli M., Cancrini G.: Development of culture-based serological assays to diagnose *Babesia divergens* infections. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **12**, 106–110 (2012)
36. Giammanco G.M., Vitale G., Mansueto S., Capra G., Caleca M.P., Ammatuna P.: Presence of *Rickettsia conorii* subsp. *israelensis*, the causative agent of Israeli spotted fever, in Sicily, Italy, ascertained in a retrospective study. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 6027–6031 (2005)
37. González L.M., Castro E., Lobo C.A., Richart A., Ramiro R., González-Camacho F., Luque D., Velasco A.C., Montero E.: First report of *Babesia divergens* infection in an HIV patient. *Int. J. Infect. Dis.* **33**, 202–204 (2015)
38. Gubernot D.M., Lucey C.T., Lee K.C., Conley G.B., Holness L.G., Wise R.P.: *Babesia* infection through blood transfusions: reports received by the US Food and Drug Administration, 1997–2007. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 25–30 (2009)
39. Hildebrandt A., Gray J.S., Hunfeld K.P.: Human babesiosis in Europe: what clinicians need to know. *Infection*, **41**, 1057–1072 (2013)
40. Hubálek Z.: Epidemiology of lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.* **37**, 31–50 (2009)
41. Hunfeld K.P., Hildebrandt A., Gray J.S.: Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.* **38**, 1219–1237 (2008)
42. Hunfeld K.P., Lambert A., Kampen H., Albert S., Epe C., Brade V., Tenter A.M.: Seroprevalence of *Babesia* infections in humans exposed to ticks in midwestern Germany. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2431–2436 (2002)
43. Igarashi I., Toyoda Y. i wsp.: Roles of CD4(+) T cells and gamma interferon in protective immunity against *Babesia microti* infection in mice. *Infect. Immun.* **67**, 4143–4148 (1999)
44. Jaenson T.G.1, Jaenson D.G., Eisen L., Petersson E., Lindgren E.: Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasit. Vectors*, **5**, 8 (2012)
45. Jones K.E., Patel N.G., Levy M.A., Storeygard A., Balk D., Gittleman J.L., Daszak P.: Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, **451**, 990–993 (2008)
46. Jore S., Viljugrein H., Hofshagen M., Brun-Hansen H., Kristoffersen A.B., Nygård K., Brun E., Ottesen P., Sævik B.K., Ytrefhus B.: Multi-source analysis reveals latitudinal and altitudinal shifts in range of *Ixodes ricinus* at its northern distribution limit. *Parasit. Vectors*, **4**, 84 (2011)
47. Karp C.L., Auwaerter P.G.: Coinfection with HIV and tropical infectious diseases. I. Protozoal pathogens. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 1208–1213 (2007)
48. Karp G., Schlaeffer F., Jotkowitz A., Riesenberk K.: Syphilis and HIV co-infection. *Eur. J. Intern. Med.* **20**, 9–13 (2009)

49. Kiewra D., Stańczak J., Richter M.: *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in Lower Silesia, Poland-preliminary study. *Ticks Tick Borne Dis.* **5**, 892–897 (2014)
50. Kowalec M., Szewczyk T., Welc-Falęciak R., Siński E., Karbowski G., Bajer A.: Ticks and the city – are there any differences between city parks and natural forests in terms of tick abundance and prevalence of spirochaetes? *Parasit. Vectors*, **10**, 573 (2017)
51. Krause P.J., Persing D.H. i wsp.: Persistent parasitemia after acute babesiosis. *N. Engl. J. Med.* **339**, 160–165 (1998)
52. Krause P.J., Spielman A. i wsp.: Persistent and relapsing babesiosis in immunocompromised patients. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 370–376 (2008)
53. Léger E., Vourc'h G., Vial L., Chevillon C., McCoy K.D.: Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Exp. Appl. Acarol.* **59**, 219–244 (2013)
54. Levin A.E., Krause P.J.: Transfusion-transmitted babesiosis: is it time to screen the blood supply? *Curr. Opin. Hematol.* **23**, 573–580 (2016)
55. Luce-Fedrow A., Mullins K., Kostik A.P., St John H.K., Jiang J., Richards A.L.: Strategies for detecting rickettsiae and diagnosing rickettsial diseases. *Future Microbiol.* **10**, 537–564 (2015)
56. Machtinger L., Telford S.R. 3rd, Inducil C., Klapper E., Pepkowitz S.H., Goldfinger D.: Treatment of babesiosis by red blood cell exchange in an HIV-positive, splenectomized patient. *J. Clin. Apher.* **8**, 78–81 (1993)
57. Mansueto P., Vitale G., Cascio A., Seidita A., Pepe I., Carrocio A., di Rosa S., Rini G.B., Cillari E., Walker D.H.: New insight into immunity and immunopathology of Rickettsial diseases. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 967852 (2012)
58. Mavilio D., Fauci A.S. i wsp.: Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 2886–2891 (2005)
59. Medlock J.M., Van Bortel W. i wsp.: Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit. Vectors*, **6**, 1 (2013)
60. Ministerstwo Zdrowia, Program Zdrowotny 'Leczenie antyretrovirusowe osób żyjących z HIV w Polsce w latach 2017–2021', <http://www.mz.gov.pl/wpcontent/uploads/2017/11/nowy-program-arv-2017-2021-aktualizacja.pdf> (styczeń 2018 r.)
61. Morens D.M., Folkers G.K., Fauci A.S.: The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, **430**, 242–249 (2004)
62. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny: Zachorowania na wybrane choroby zakaźne w Polsce od 1 stycznia do 31 grudnia 2017 r. oraz w porównywalnym okresie 2016 r., [http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2017/INF\\_17\\_12B.pdf](http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/2017/INF_17_12B.pdf) (styczeń 2018 r.)
63. Ong K.R., Stavropoulos C., Inada Y.: Babesiosis, asplenia, and AIDS. *Lancet*, **336**, 112 (1990)
64. Oteo J.A., Portillo A.: Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* **3**, 271–278 (2012)
65. Pancewicz S.A., Garlicki A.M., Moniuszko-Malinowska A., Zająkowska J., Kondrusik M., Grygorczuk S., Czupryna P., Dunaj J.: Diagnostyka i leczenie chorób przenoszonych przez kleszcze. Rekomendacje polskiego towarzystwa epidemiologów i lekarzy chorób zakaźnych. *Przegl. Epidemiol.* **69**, 421–428 (2015)
66. Paris D.H., Dumler J.S.: State of the art of diagnosis of rickettsial diseases: the use of blood specimens for diagnosis of scrub typhus, spotted fever group rickettsiosis, and murine typhus. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **29**, 433–439 (2016)
67. Pfäffle M., Littwin N., Muders S.V., Petney T.N.: The ecology of tick-borne diseases. *Int. J. Parasitol.* **43**, 1059–1077 (2013)
68. Poglód R., Rosiek A., Siński E., Łętowska M.: Choroby odkleszczowe w aspekcie bezpiecznego krwiodawstwa. *J. Transf. Med.* **4**, 4–22 (2011)
69. Raoult D., Hechemy K.E., Baranton G.: Cross-reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with human immunodeficiency virus infection, syphilis, and leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2152–2155 (1989)
70. Richards A.L.: Worldwide detection and identification of new and old rickettsiae and rickettsial diseases. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **64**, 107–110 (2012)
71. Rolfs R.T., Larsen S. i wsp.: A randomized trial of enhanced therapy for early syphilis in patients with and without human immunodeficiency virus infection. The Syphilis and HIV Study Group. *N. Engl. J. Med.* **33**, 307–314 (1997)
72. Sadowska-Todys M., Paradowska-Stankiewicz I., Rosińska M., Czarkowski M.P.: Zakażenia ludzkim wirusem upośledzenia odporności (HIV) (w) Sytuacja zdrowotna ludności Polski i jej uwarunkowania, red. Wojtyniak B., Goryński P., Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Warszawa, 2016, s. 200–203.
73. Saporito L., Giammanco G.M., Rubino R., Ingrassia D., Spicola D., Titone L., Colomba C.: Severe Mediterranean spotted fever complicated by acute renal failure and herpetic oesophagitis. *J. Med. Microbiol.* **59**, 990–992 (2010)
74. Schacker T., Collier A.C., Hughes J., Shea T., Corey L.: Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann. Intern. Med.* **125**, 257–264 (1996)
75. Schmulewitz L., Lecuit M. i wsp.: Splenic rupture and malignant Mediterranean spotted fever. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 995–997 (2008)
76. Segura F., Antón E., Font B., Sala M., Cervantes M.: Primary HIV type-1 infection misdiagnosed as Mediterranean spotted fever. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**, 478–479 (2002)
77. Siński E., Bajer A., Welc R., Pawełczyk A., Ogrzewalska M., Behnke J.M.: *Babesia microti*: prevalence in wild rodents and *Ixodes ricinus* ticks from the Mazury Lakes District of North-Eastern Poland. *Int. J. Med. Microbiol.* **296** (S1), 137–143 (2006)
78. Siński E., Welc-Falęciak R., Poglód R.: *Babesia* spp. infections transmitted through blood transfusion. *Wiad. Parazytol.* **57**, 77–81 (2011)
79. Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., Sawczuk M.: Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. *J. Parasitol.* **89**, 194–196 (2003)
80. Smolinski M. S., Hamburg M. A., Lederberg J.: Microbial threats to health: emergence, detection, and response. National Academies Press, Washington DC, 2003.
81. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F.: Lyme borreliosis. *Lancet*, **379**, 461–473 (2012)
82. Stańczak J., Cieniuch S., Lass A., Biernat B., Racewicz M.: Detection and quantification of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks from urban and rural environment, northern Poland, by real-time polymerase chain reaction. *Exp. Appl. Acarol.* **66**, 63–81 (2015)
83. Stańczak J., Gabre R.M., Kruminis-Łozowska W., Racewicz M., Kubica-Biernat B.: *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann. Agric. Environ. Med.* **11**, 109–114 (2004)
84. Swanson S.J., Neitzel D., Reed K.D., Belongia E.A.: Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 708–727 (2006)
85. van Burgel N.D., Oosterloo M., Kroon F.P., van Dam A.P.: Severe course of Lyme neuroborreliosis in an HIV-1 positive

- patient; case report and review of the literature. *BMC Neurol.* **10**, 117 (2010)
86. Vyas J.M., Telford S.R., Robbins G.K.: Treatment of refractory *Babesia microti* infection with atovaquone-proguanil in an HIV-infected patient: case report. *Clin. Infect. Dis.* **45**, 1588–1590 (2007)
  87. Walker D.H., Olano J.P., Feng H.M.: Critical role of cytotoxic T lymphocytes in immune clearance of rickettsial infection. *Infect. Immun.* **69**, 1841–1846 (2001)
  88. Walker D.H.: Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. *Clin. Infect. Dis.* **45** (S1), 39–44 (2007)
  89. Welc-Falęciak R., Bajer A., Bednarska M., Paziewska A., Siński E.: Long term monitoring of *Babesia microti* infection in BALB/c mice using nested PCR. *Ann. Agric. Environ. Med.* **14**, 287–290 (2007)
  90. Welc-Falęciak R., Bajer A., Paziewska-Harris A., Baumann-Popczyk A., Siński E.: Diversity of *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks in Poland. *Adv. Med. Sci.* **57**, 364–369 (2012)
  91. Welc-Falęciak R., Kowalec M., Karbowski G., Bajer A., Behnke J.M., Siński E.: Rickettsiaceae and Anaplasmataceae infections in *Ixodes ricinus* ticks from urban and natural forested areas of Poland. *Parasit. Vectors*, **7**; 121 (2014)
  92. World Health Organizations, HIV/AIDS Global Health Observatory (GHO) data, [http://www.who.int/gho/hiv/epidemic\\_status/deaths/en/](http://www.who.int/gho/hiv/epidemic_status/deaths/en/) (styczeń 2018 r.)
  93. Wodecka B.: Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in *Ixodes ricinus* ticks in North-western Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **10**, 171–178 (2003)
  94. Wormser G.P., Prasad A., Neuhaus E., Joshi S., Nowakowski J., Nelson J., Mittleman A., Agüero-Rosenfeld M., Topal J., Krause P.J.: Emergence of resistance to azithromycin-atovaquone in immunocompromised patients with *Babesia microti* infection. *Clin. Infect. Dis.* **50**, 381–386 (2010)
  95. Wormser G.P., Ramanathan R., Nowakowski J., McKenna D., Holmgren D., Visintainer P., Dornbush R., Singh B., Nadelman R.B.: Duration of antibiotic therapy for early Lyme disease. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **138**, 697–704 (2003)
  96. Wormser GP, Nadelman RB i wsp.: The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1089–1134 (2006)
  97. Wójcik-Fatla A., Zając V., Sawczyn A., Sroka J., Cisak E., Dutkiewicz J.: Infections and mixed infections with the selected species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex in *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland: a significant increase in the course of 5 years. *Exp. Appl. Acarol.* **68**, 197–212 (2016)
  98. Zajkowska J., Dunaj J.: Borelioza z Lyme. Diagnostyka laboratoryjna, trudności i wyzwania. *Forum Zakażeń*, **4**, 223–251 (2013)

Maria Walencka, Agnieszka Matusiak, Magdalena Chmiela\*

Pracownia Gastroimmunologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej,  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano w maju 2018 r.

**Streszczenie:** Rodzaj *Campylobacter* spp. obejmuje Gram-ujemne, spiralne, termofilne, zdolne do ruchu bakterie, które do wzrostu wymagają mikroaerofilnego środowiska. Posiadają ograniczony katabolizm węglowodanów, mają natomiast dobrze rozwinięty mechanizm pozyskiwania mikroelementów. Wykazują oporność na wiele powszechnie stosowanych antybiotyków. Znaczącym problemem, szczególnie w krajach o niskim statusie socjalno-ekonomicznym, są campylobakteriozy wywoływane najczęściej przez szczepy *Campylobacter jejuni*, których głównym źródłem jest źle przygotowane mięso drobiowe, a także zanieczyszczona tymi bakteriami woda pitna. Mimo licznych przypadków zachorowań, patogeniza chorób wywołanych przez te drobnoustroje nie jest dobrze poznana. Istotne w tym procesie są: ruchliwość bakterii, zdolność do adhezji i wnikania do komórek nabłonkowych jelita gospodarza oraz wydzielanie toksyn. Oprócz typowych ostrych zakażeń przewodu pokarmowego, *C. jejuni* jest czynnikiem etiologicznym demielinizacyjnej polineuropatii nerwów obwodowych o podłożu autoimmunizacyjnym pod nazwą Zespół Guillaina-Barrégo (GBS), której często towarzyszy niewydolność oddechowca. Przyczyną choroby spowodowanej wcześniejszą infekcją *C. jejuni* jest mimikra molekularna pomiędzy strukturami ściany komórkowej tych bakterii i gangliozydami komórek nerwowych gospodarza. Strategie leczenia GBS obejmują wymianę osocza lub dożylnie podanie preparatu immunoglobulinowego IVIg, celem zminimalizowania patologicznej reakcji zapalnej powodującej uszkodzenie włókien nerwowych. Poważne zagrożenia zdrowotne wynikające z zakażeń *C. jejuni* stanowią przesłankę do monitorowania czystości mikrobiologicznej żywności i wody pitnej, przebiegu procesów produkcji mięsa drobiowego, a także do rozwoju metod zapobiegania lub minimalizowania jego skażenia.

1. Wstęp. 2. Rezerwuary i drogi transmisji *Campylobacter* spp. 3. Patogeneza zakażeń *Campylobacter* spp. 3.1. Czynniki wirulencji. 4. Obwodowe konsekwencje zakażeń *Campylobacter* spp. u ludzi. 4.1. Rola zakażenia *C. jejuni* w inicjowaniu demielinizacji nerwów obwodowych. 4.2. Mimikra antygenowa pomiędzy gangliozydami gospodarza i *C. jejuni*. 4.3. Udział cytokin w rozwoju GBS. 4.4. Strategie leczenia Zespołu Guillaina-Barrégo. 5. Podsumowanie

#### The role of *Campylobacter jejuni* infection in the development of Guillain-Barré Syndrome

**Abstract:** *Campylobacter* spp. are Gram-negative, spiral, thermophilic, motile bacteria, which require microaerophilic environment for growth. They have restricted carbohydrate catabolism, but have well-developed mechanism of acquiring micronutrients instead. A common problem, especially in developing countries, is campylobacteriosis, mostly caused by *Campylobacter jejuni*. The major reason of this disease is the increasing resistance of these bacteria to commonly used antibiotics. The most frequent source of infection is poorly cooked poultry meat. Despite numerous cases of campylobacteriosis, its pathogenesis is not fully understood. However, the role of bacterial motility, adhesion, ability to invade hosts intestinal epithelial cells and secretion of toxins have been found significant. In addition to developing gastrointestinal infections, *C. jejuni* is firmly established as a causative agent of Guillain-Barré Syndrome, which is an autoimmune-mediated demyelinating polyneuropathy of peripheral nerves. Molecular mimicry between bacterial surface structures and hosts gangliosides is responsible for the development of this disease. The serious local and systemic consequences of *C. jejuni* infections are the reason for monitoring the microbial purity of food, especially meat and drinking water, for *C. jejuni* contamination. necessitating also new approaches to contamination prevention or minimization.

1. Introduction. 2. Colonization and transmission pathways of *Campylobacter* spp. 3. The pathogenesis of *Campylobacter* spp. 3.1. Virulence factors. 4. Systemic consequences of *Campylobacter* spp. infections in humans. 4.1. Role of *C. jejuni* infection in demyelination of peripheral nerves. 4.2. Antigenic mimicry between host gangliosides and *C. jejuni*. 4.3. Role of cytokines in the development of GBS. 4.4. Strategies in Guillain-Barré Syndrome therapy. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** *Campylobacter jejuni*, zakażenie, Zespół Guillaina-Barrégo

**Key words:** *Campylobacter jejuni*, infection, Guillain-Barré Syndrome

## 1. Wstęp

Rodzaj *Campylobacter* należy do typu *Proteobacteria*, klasy *Proteobacteria* oraz rodziny *Campylobacteraceae*. Nazwa rodzaju *Campylobacter* wywodzi się od spiralnego kształtu należących do niego drobnoustrojów („campylos”, spirala w języku greckim). Mikroorganizmy te są Gram-ujemnymi, nieprzetrwalnikującymi

pałeczkami, szerokości 0,2–0,9 µm i długości 0,5–5 µm [18, 58]. Większość gatunków z rodzaju *Campylobacter* jest ruchliwych dzięki pojedynczej wici umieszczonej na jednym lub obu biegunach komórki (np. *C. jejuni*) [18, 43, 53, 57, 58, 62], choć są także gatunki posiadające wiele wici (np. *C. showae*) oraz nieruchliwe (np. *C. gracilius*). Bakterie te mogą ulegać transformacji w formę kulistą [14], co jest powiązane ze stacjonarną

\* Autor korespondencyjny: Magdalena Chmiela, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16, e-mail: magdalena.chmiela@biol.uni.lodz.pl

fazą wzrostu. Wykazano, że ziarniaki, w przeciwieństwie do postaci spiralnych, nie są zdolne do ruchu ze względu na braki energetyczne. Bakterie *Campylobacter* spp. przyjmują formę ziarnistą podczas niedoboru substancji odżywczych, przy zmianie temperatury otoczenia na suboptymalną, w warunkach stresu osmotycznego oraz po ekspozycji na tlen atmosferyczny. Jakkolwiek, mimo wzrostu w środowisku mikroaerofilnym, pałeczki *C. jejuni*, mogą dzielić się w atmosferze otoczenia, co jest wynikiem adaptacji tych bakterii do tlenowego środowiska, lub namnażać się w obecności nośników wiążących tlen, na przykład krwi. Tworzą biofilm [8, 45], a w nim warstwy, które w różnym stopniu są narażone na tlen atmosferyczny. Wyróżnia się w nich zarówno formy spiralne jak i ziarniste, te ostatnie w strukturach biofilmowych chronią bardziej żywotne formy spiralne przed nieprzyjaznym środowiskiem [8, 14, 19].

Pałeczki *Campylobacter* spp. zasiedlają szeroki zakres zwierzęcych gospodarzy, ale *in vitro* są bardzo wymagające pod względem odżywczym [18, 27, 53, 56, 64, 70]. *Campylobacter jejuni* to szczepy termofilne, zdolne do wzrostu w zakresie temperatur 37–42°C, ale optymalna temperatura wynosi 41,5°C. Bakterie te nie przeżywają w temperaturze powyżej 55°C i nie są zdolne do podziału w temperaturze poniżej 30°C, co może być spowodowane brakiem białek szoku cieplnego u tych bakterii [27, 62]. Mimo to *C. jejuni* przeżywa, a także wykazuje aktywność metaboliczną oraz wytwarza ATP, przez długi czas w temperaturze 4°C. Sprawia to, że chłodzone mięso, skażone tymi drobnoustrojami podczas uboju, stanowi szczególnie częste źródło zakażenia [18].

Badania nad pozyskiwaniem energii przez te bakterie wykazały, że nie wykorzystują one glukozy, ani innych węglowodanów, jako substratów do wzrostu, ponieważ nie posiadają 6-fosfofruktokinazy, która jest kluczowym enzymem w metabolizmie energetycznym [27]. Jako źródło węgla, *C. jejuni* wykorzystują aminokwasy oraz produkty pośrednie cyklu kwasu cytrynowego, poczynając od seryny przez kwas asparaginowy, asparaginę i kwas glutaminowy. Niektóre szczepy wykorzystują także prolinę, choć dopiero po wykorzystaniu wszystkich innych źródeł węgla [18].

*Campylobacter* spp. pozyskuje w organizmie gospodarza siarkę i żelazo, które są kluczowe dla aktywności wielu bakteryjnych enzymów [46, 56]. Źródłem siarki są peptydy zawierające cysteinę wydzielane z komórek nabłonkowych jelita gospodarza. Uwolnienie siarki w świetle jelita może modulować pH, stymulować uwalnianie mediatorów zapalenia i zaburzać skład mikrobioty jelitowej gospodarza [27, 32, 53, 56, 63, 70]. *Campylobacter* spp. nie wytwarzają własnych związków chelatujących, które umożliwiałyby wychwytywanie żelaza, ale wykorzystują siderofory innych gatunków bakterii bytujących w jelicie [32, 64, 70].

Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe bakterii izolowanych z żywności pochodzenia zwierzęcego, w tym *Campylobacter* spp., stała się w ostatnich latach istotnym problemem zdrowia publicznego, zarówno w krajach o wysokim jak i niskim rozwoju socjalno-gospodarczym. Opisano oporność gatunków *C. jejuni* i *C. coli* na penicyliny i większość cefalosporyn, jak również trimetoprim, sulfametoksazol, ryfampicynę i wankomocynę [13, 33, 49, 58, 68]. Antybiotykami, najczęściej stosowanymi w leczeniu zakażeń *Campylobacter* spp. są: erytromycyna, azytromycyna i gentamycyna [43, 58, 65]. Stosuje się także fluorochinolony, jednak coraz więcej izolatów *Campylobacter* spp. jest na nie oporna. Dotyczy to głównie ciprofloksacynu i kwasu nalidyksowego, na które ponad 70% szczepów *C. jejuni* i niemal 100% szczepów *C. coli* wykazuje oporność [32]. Jest to spowodowane mutacją w genach *gyrA* i *gyrB* kodujących podjednostki GyrA i GyrB gyrazy oraz *parC* i *parE*, które kodują podjednostki topoizomerazy IV [33, 58, 68]. Wzrastająca oporność *Campylobacter* spp. na fluorochinolony jest spowodowana częstym ich stosowaniem w weterynarii [43].

W ostatnich latach rośnie oporność szczepów *Campylobacter* spp. także na makrolidy [7, 10, 17, 23, 77], aminoglikozydy i antybiotyki beta-laktamowe. Oporność *Campylobacter* spp. na makrolidy jest wynikiem modyfikacji miejsca wiązania podjednostki 50S rybosomu wskutek mutacji 23S rRNA, zamiast metylacji lub enzymatycznej modyfikacji antybiotyku, obserwowanych u innych gatunków bakterii. Oporność *Campylobacter* spp. na makrolidy może być również spowodowana modyfikacjami w rybosomalnych białkach L4 i L22 [4, 13]. U *Campylobacter* spp. opisano wiele enzymów, które modyfikują aminoglikozydy, w tym fosfotransferazę aminoglikozydową typu I, III, IV oraz VII, adenylotransferazę aminoglikozydową, a także adenylotransferazę 6-aminoglikozydową. Enzymy te są zaangażowane w wytwarzanie fosfotransferazy 30-O-aminoglikozydowej. Oporność na aminoglikozydy wynika z modyfikacji enzymatycznej, która zmniejsza powinowactwo tych antybiotyków do miejsca A w rRNA [13].

Oporność na tetracykliny jest warunkowana genem *tet(O)*, który powszechnie występuje zarówno u *C. jejuni* jak i *C. coli*, natomiast inne geny *tet* powiązane z opornością na tetracykliny nie zostały wykryte u *Campylobacter* spp. Gen *tet(O)* koduje białka RPPs (rybosome protected proteins) chroniące rybosom, które rozpoznają i wiążą miejsce A w podjednostce 30S bakteryjnego rybosomu zmieniając jego konformację, przez co cząsteczka tetracykliny zostaje odłączona. Zmiana konformacyjna utrzymuje się przez dłuższy czas, co uniemożliwia dalsze, efektywne wydłużanie białka. Gen *tet(O)* znajduje się na plazmidzie, jednak opisano również izolaty *C. jejuni* odporne na tetracykliny, które nie posiadają plazmidów, ale mają chromosomalny

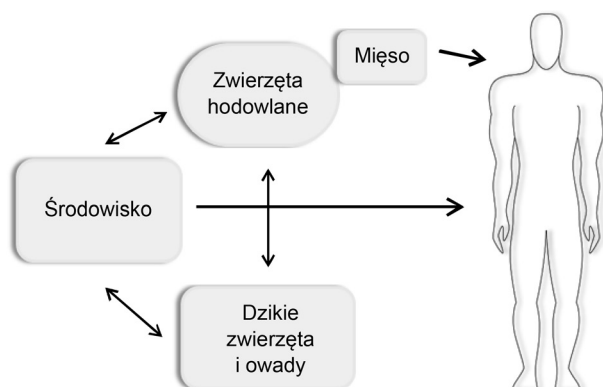
gen *tet* (*O*), warunkujący wysoki poziom oporności na tetracykliny [4, 13, 22].

Mechanizmy oporności *Campylobacter* spp. na niektóre antybiotyki beta-laktamowe, takie jak ampicylina i cefalosporyny o poszerzonym spektrum działania nie są jasno zdefiniowane. Z wyjątkiem niektórych karbapenemów, większość szczepów *Campylobacter* spp. jest opornych na penicyliny i cefalosporyny o wąskim zakresie działania. Antybiotyki te łączą się z białkami wiążącymi penicylinę i tym samym zaburzają sieciowanie peptydoglikanu podczas tworzenia ściany komórkowej bakterii. Zmiany w strukturze błony komórkowej lub kanałach białkowych i systemie pomp efluksowych mogą prowadzić do powstania oporności na tę grupę antybiotyków. *Campylobacter* spp. są z natury odporne na wiele beta-laktamów, ale pozostają wrażliwe na amoksyliny i ampicylinę ze względu na wytwarzanie beta-laktamazy [2, 21, 33, 37, 68].

## 2. Rezerwuary i drogi transmisji *Campylobacter* spp.

Kraje o niskim statusie socjalno-ekonomicznym są uważane za hiperendemiczne pod względem zakażeń *Campylobacter* spp., których źródłem są środowisko i żywność pochodzenia zwierzęcego, zanieczyszczone tymi drobnoustrojami (Rys. 1) [9, 18, 25, 36, 37, 62, 64, 72, 77]. *Campylobacter* spp. kolonizuje jelita zwierząt w sposób bezobjawowy. Wykazano, że także inne drobnoustroje należące do mikrobioty jelitowej, mogą mieć wpływ na zdolność kolonizacji *Campylobacter* spp. i rozwój objawów chorobowych u ludzi i zwierząt [32].

Zakażenia *Campylobacter* spp. poprzez spożycie skażonych produktów drobiowych, wieprzowiny i wołowiny są główną przyczyną chorób pokarmowych u ludzi. Z powodu naturalnie wyższej temperatury ciała u ptaków, to drób jest podstawowym rezerwuarem termotolerancyjnych pałeczek *C. jejuni* uznawanych za drobnoustroje komensalne w jelitach ptasich, gdzie kątnica i okrężnica mogą być dobrym środowiskiem dla rozwoju tych bakterii, które w procesie przetwórstwa



Rys. 1. Drogi transmisji *Campylobacter jejuni*

mięsa mogą być przenoszone na powierzchnię skóry [18, 26–29, 62, 63, 77]. Szacuje się, że 80% przypadków kampylobakteriozy u ludzi wynika z konsumpcji produktów drobiowych zanieczyszczonych tymi patogenami w trakcie uboju i przetwarzania tusz mięsa. Także wołowina, wieprzowina, surowe mięso owcze, mleko, zanieczyszczona woda i żyjące w niej skorupiaki są przyczyną wielu zgłaszanych przypadków kampylobakteriozy. Gleba i woda odgrywają kluczową rolę w transmisji *Campylobacter* spp. bezpośrednio na ludzi lub zwierzęta [9, 18, 26, 32, 41, 58], ponieważ bakterie te wykorzystują szereg strategii pozwalających na przetrwanie w środowisku. Mają stosunkowo mały genom, który zawiera geny kodujące ograniczoną liczbę szlaków biochemicznych, ale wiele systemów transportowych, co umożliwia pobieranie zasobów produkowanych przez inne drobnoustroje [9].

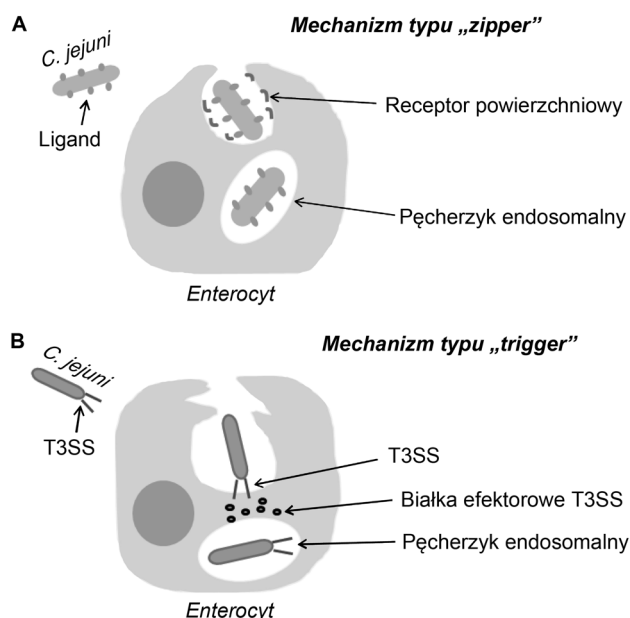
## 3. Patogeneza zakażeń *Campylobacter* spp.

Jedną z głównych różnic pomiędzy zakażeniem *C. jejuni* u ludzi a u kurcząt jest silniejsza inwazja komórek nabłonkowych jelita w organizmie człowieka, co sugeruje, że zarówno adhezja, jak i wnikanie bakterii tego gatunku do komórek nabłonka są niezbędne do wywołania choroby [2, 5, 15, 43, 58, 67].

Większość typowych bakterii enteropatogennych wykorzystuje jedną z dwóch strategii wnikania do komórek docelowych gospodarza. Są to tzw: mechanizm „zamka błyskawicznego” („zipper”) oraz mechanizm „spustowy” („trigger”) (Rys. 2). Na przykładzie gatunków *Listeria* spp. i *Yersinia* spp. wykazano, że mechanizm „zamka błyskawicznego” jest inicjowany przez bakteryjne białka powierzchniowe (zwykle adhezyny i inwazy), które wiążą się ze specyficznymi receptorami komórek gospodarza. Mechanizm „spustowy” jest zależny od systemów sekrecji III- i IV-typu (T3SSs i T4SSs), za pośrednictwem których bakteryjne białka (często przypominające składniki komórek gospodarza) zostają wstrzyknięte do komórek gospodarza w celu inicjacji wychwytu komórek bakteryjnych, jak opisano na przykładzie gatunków *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. Wykazano, że *C. jejuni* wykorzystuje oba te mechanizmy. Po wniknięciu do komórek nabłonkowych jelita gospodarza *C. jejuni* znajduje się w specyficznym przedziale w cytoplazmie, który różni się od lizosomów, co chroni bakterie przed zniszczeniem przez mechanizmy typowe dla szlaku endocytarnego [11].

### 3.1. Czynniki wirulencji

Do najważniejszych czynników wirulencji *Campylobacter* spp. należą: ruchliwość, adhezja do błony śluzowej jelita, zdolność inwazji komórek gospodarza



Rys. 2. Mechanizm wnikania *Campylobacter jejuni* do komórek gospodarza

A) mechanizm zamka błyskawicznego typu „zipper” zależny od adhezji komórek bakteryjnych do enterocytów; B) mechanizm spustowy typu „trigger” z udziałem białek efektorowych wstrzykiwanych do enterocytów za pośrednictwem systemu wydzielniczego typu 3 (T3SS).

i wytwarzania toksyn [3, 25, 43, 57]. Umieszczone biegunowo wici warunkują przemieszczanie się patogenów do okrężnicy, na co wpływ ma także oporność *Campylobacter* spp. na działanie kwasu żołądkowego i soli żółciowych [11, 62, 64].

Inwazja skutkuje rozwojem reakcji zapalnej, prawdopodobnie w wyniku produkcji cytotoksyn, co przyczynia się do zmniejszenia chłonności jelita [15, 34, 44].

Wici *Campylobacter* spp. zbudowane są z białek flageliny: FlaA i FlaB kodowanych przez geny *flaA* i *flaB* [15]. Mutacje w genie *flaA* zmniejszają ruchliwość *C. coli*, natomiast zmiany w genie *flaB* mają znaczenie dla ograniczenia ruchliwości *C. coli* ale nie *C. jejuni* [43, 62]. Produkt genu *flaA* determinuje również adhezję do komórek jelita oraz ich inwazję, a także osłabienie odpowiedzi immunologicznej gospodarza [37, 57, 49]. Kluczowy dla regulacji ekspresji białek wici *Campylobacter* spp. jest dwuskładnikowy system składający się z sensora FlgS i regulatora odpowiedzi FlgR [62]. Mikroorganizmy te regulują swoją motorykę za pomocą złożonego systemu chemotaktycznego, który pozwala im przemieszczać się w kierunku atraktantów. Wici są także narzędziem wydzielania pozakomórkowego cząsteczek efektorowych związanych z infekcją, o czym świadczy zatrzymywanie ich wydzielania po inaktywacji genów wici [11]. W adhezji i inwazji komórek gospodarza przez *Campylobacter* spp. biorą udział także autotransporterowa lipoproteina Cap (*Campylobacter* autotransporting lipoprotein) A, białko inwazyjne Cia (*Campylobacter* invasion antigen) B, którego wydziela-

nie jest zależne od białek flagelinowych oraz soli kwasów żółciowych i białka CiaI wydzielanego przez system transportowy wici [26, 57].

Wykazano, że mutacja w genie *CapA* skutkowałą osłabieniem przylegania *Campylobacter* spp., a także wnikania bakterii do komórek nabłonka przewodu pokarmowego, zarówno człowieka jak i kurcząt, choć brak genu *capA* u wielu izolatów *Campylobacter* spp. wskazuje, że rola białek CapA w kolonizacji nabłonka nie jest jednoznaczna [12, 19, 20, 26, 27, 49, 57].

Białko CadF (*Campylobacter* adhesin to fibronectin) oraz FlpA (Fibronectin-like protein A) determinują wiązanie *Campylobacter* spp. z komponentami zewnątrzkomórkowej macierzy, a białka PEB (nazwa glikoprotein od liter nazwisk ich pierwszych odkrywców Pei, Ellison, Blaser) 1–4 zostały opisane jako adhezyny, ale także komponenty wiążące aminokwasy i powodujące ich rozkład [2, 11, 21, 22].

Najlepiej scharakteryzowaną toksyną wytwarzaną przez szczepy *Campylobacter* spp. jest toksyna CDT (cytolethal distending toxin) o aktywności DNAzy I, która powoduje zatrzymanie komórek eukariotycznych w fazie G2 cyklu komórkowego, zapobiegając ich wejściu w fazę mitozy, co prowadzi do obumarcia komórek. Toksyna składa się z trzech podjednostek kodowanych przez geny *cdtA*, *cdtB* i *cdtC*, ale aktywność toksyczną wykazuje białko CdtB, a rola podjednostek CdtA i CdtC polega prawdopodobnie na transporcie podjednostki CdtB do komórki gospodarza [62].

#### 4. Obwodowe konsekwencje zakażeń *Campylobacter* spp. u ludzi

Po zakażeniu *Campylobacter* spp. u ludzi, typowo, w miejscu wniknięcia patogenu powstaje odczyn zapalny [5, 20, 34, 37, 55, 66, 67], którego rolą jest zlokalizowanie patogenu, zneutralizowanie go oraz naprawienie skutków zniszczenia miejsca, w którym toczył się proces zapalny. W miejscu zasiedlonym przez bakterie gromadzą się liczne komórki fagocytyczne (neutrofile, monocyty, makrofagi), a po 3 dniach także limfocyty T pomocnicze, w odpowiedzi na substancje chemotaktyczne bakterii oraz komórek odpornościowych organizmu, m.in.: chemokiny, cytokiny prozapalne, białka dopełniacza oraz inne mediatory reakcji zapalnej [12, 35, 52, 66]. W tym czasie zachodzi bardzo aktywna fagocytoza, stymulowane są dodatkowo inne komórki (mastocyty, eozynofile, płytki krwi), układ krzepnięcia krwi, co prowadzi do gromadzenia się biologicznie czynnych substancji i wzrostu przepuszczalności naczyń krwionośnych. Jeśli proces ten ma charakter ostry to stopniowo, po 2 tygodniach drobnoustroje oraz uszkodzenia zostają wyeliminowane. Jednakże w przypadku zakażenia *C. jejuni* bardzo często reakcja zapalna

przybiera formę przewlekłą, podczas której w miejscu wniknięcia zarazka i jego bytowania pojawiają się efektorowe komórki odporności nabytej jak: limfocyty T cytotoksyczne i limfocyty B [35, 54]. Dochodzi do produkcji swoistych przeciwciał skierowanych przeciw antygenom bakterii, także tym podobnym do antygenów organizmu ludzkiego i w efekcie do niszczenia komórek własnych gospodarza. Zakażenie *C. jejuni* manifestuje się wysoką gorączką (do 40°C), ogólnym osłabieniem, pojawiają się bóle podbrzusza, mdłości, stan zapalny jelita powiązany z biegunką łagodną lub ostrą (z obecnością śluzu lub krwi w stolcu). Stan chorobowy z tendencją do samowyleczenia trwa zazwyczaj kilka dni, ale u osób z niewydolnym układem odpornościowym, może dojść do ogólnoustrojowej infekcji, posocznicy [37, 64, 74].

Jeśli zakażenie *C. jejuni* rozwija się u osób równoległe z innymi chorobami przewodu pokarmowego takimi jak: ED (Esophageal Diseases – choroby przełyku), IBD (Inflammatory Bowel Disease – nieswoiste zapalenie jelit), choroba Crohna, wtedy dochodzi do bardzo poważnych zmian w błonie śluzowej przełyku czy jelit, co prowadzi do groźnych powikłań [37, 39, 71, 74].

Jedną z najważniejszych konsekwencji zakażenia *C. jejuni* u ludzi jest Zespół Guillaina-Barrégo (GBS) inaczej ostra, demielinizacyjna polineuropatia nerwów obwodowych o podłożu autoimmunizacyjnym, będąca przyczyną ostrego porażenia wiotkiego występującego z częstością 0,6–4 przypadków na 100 000 ludzi rocznie [9, 16, 51, 74]. Po raz pierwszy, w 1859 r., Jean-Baptiste Octave Landry opisał przypadek odległego uczucia „mrowienia” oraz rosnącego osłabienia, które wystąpiły u pacjenta z objawami gorączki, złego samopoczucia i bólu, który w ciągu trzech tygodni został sparaliżowany i zmarł z powodu niewydolności oddechowej. 60 lat później, Georges Guillain, Jean-Alexandre Barré i Andre Strohl zgłosili dwa przypadki albumino-cytologicznej dysocjacji w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz odróżnili ten zespół od paraliżu wywołanego poliomyelitis. Pełna nazwa syndromu Zespół Landry-Guillain-Barré-Strohl jest używana rzadko, zazwyczaj stosuje się krótszą wersję Zespół Guillaina-Barrégo (GBS). Kliniczne warianty GBS różnią się: typem zaangażowanych w zmiany chorobowe włókien nerwowych (włókna ruchowe, czuciowe, ruchowe i czuciowe, czaszkowe lub autonomiczne), dominującym sposobem uszkodzenia włókien (zmiany demielinizujące lub aksonalne) oraz występowaniem lub brakiem zaburzeń świadomości. Jednym z wariantów GBS jest Zespół Millera-Fishera (MFS) charakteryzujący się oftalmoplegią, ataksją i arefleksją bez objawów osłabienia. U większości pacjentów z MFS stwierdza się w płynie mózgowo-rdzeniowym podwyższone stężenie białek oraz autoprzeciwciała. Najczęściej występującym wariantem GBS jest ostra zapalna polineuropatia

demielinizacyjna (Acute Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy – AIDP). Działanie efektorowych mechanizmów odpornościowych jest w tym przypadku skierowane przeciwko osłonce mielinowej nerwów obwodowych [42, 65, 72, 78].

Pierwszy szczegółowy opis aksonalnego wariantu GBS, ostrej ruchowej neuropatii aksonalnej (Acute Motor Axonal Neuropathy – AMAN) został opisany w 1993 r., w północnych Chinach. Wkrótce pojawiły się również doniesienia na temat ostrej ruchowo-czuciowej neuropatii aksonalnej (Acute Sensory Motor Axonal Neuropathy – ASMAN). Najczęściej te warianty są powiązane z wcześniejszym zakażeniem *C. jejuni* [16, 39, 42, 73, 75].

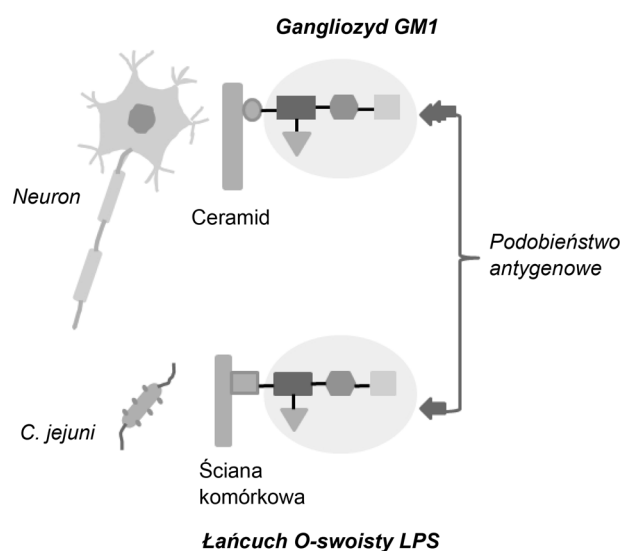
#### 4.1. Rola zakażenia *C. jejuni* w inicjowaniu demielinizacji nerwów obwodowych

U około dwóch trzecich pacjentów z GBS wykazano poprzedzające zakażenie *C. jejuni*, *Mycoplasma pneumoniae*, wirusami cytomegalii lub Epstein-Barra. Jednak spośród różnych czynników zakaźnych, tylko *C. jejuni* ma status czynnika etiologicznego GBS. Około 25–40% pacjentów z GBS przeżyło zakażenie *C. jejuni* od 1 do 3 tygodni przed wystąpieniem objawów. Kluczową rolę w patogenezie GBS odgrywa mimikra molekularna i reakcja krzyżowa przeciwciał przeciwko *C. jejuni* reagujących z gangliozydami komórek nerwowych gospodarza [42, 61, 72, 78]. W badaniach serologicznych i testach transformacji blastycznej limfocytów potwierdzono, że zakażenie *C. jejuni* jest najczęstszym czynnikiem inicjującym rozwój tej choroby, odpowiednio 26% i 77,5% wyników dodatnich. Jednak, mimo że zakażenie *C. jejuni* jest dosyć powszechne, do rozwoju GBS w jego konsekwencji dochodzi u jednego na 1000 pacjentów, co sugeruje, że czynniki genetyczne gospodarza również determinują podatność na rozwój tej choroby [51].

#### 4.2. Mimikra antygenowa pomiędzy gangliozydami gospodarza i *C. jejuni*

Mimikra molekularna jest definiowana jako podwójne rozpoznawanie przez receptory pojedynczych limfocytów T (TCR – T cell receptor) lub limfocytów B (BCR – B cell receptor) komponentów mikroorganizmu oraz antygenów gospodarza. Jest to mechanizm, przez który przeciwciała krzyżoworeagujące lub limfocyty T mogą wywoływać chorobę autoimmunizacyjną [41, 54, 61, 69, 76, 78]. W GBS mechanizmy efektorowe układu odpornościowego gospodarza, zainicjowane przez czynniki zakaźne, atakują w układzie nerwowym osłonkę mielinową i komórki Schwanna – AIPD lub komponenty błony komórkowej aksonów – AMAN i ASMAN. Dzieje się tak, ponieważ w ścianie komórkowej *C. jejuni* występuje lipopolisacharyd (LPS), którego





Rys. 3. Mimikra antygenowa pomiędzy ludzkim gangliozydem GM1 i lipooligosacharydem *Campylobacter jejuni*

struktura przypomina glikokoniugaty, a dokładnie gangliozydy występujące w błonach komórek nerwowych gospodarza (Rys. 3). Wykazano, że surowice królików, immunizowanych wcześniej lipooligosacharydami (LOS) *C. jejuni*, przypominającymi pod względem strukturalnym gangliozydy, zawierały wysokie miano przeciwciał przeciwko LOS, które krzyżowo reagowały z gangliozydami komórek ludzkich [1, 13, 72].

W badaniach serologicznych potwierdzono reaktywność autoprzeciwciał występujących w surowicach pacjentów z GBS z komponentami *C. jejuni* [39, 41, 42, 54, 61, 69, 75, 76, 78]. U królików immunizowanych mieszaniną lipooligosacharydów przypominających ludzki gangliozyd i adiuwantów rozwinęła się słabość kończyn oraz paraliż wskutek osadzenia się przeciwciał anty-GM1 we włóknach nerwów obwodowych i aktywacji układu dopełniacza. W badaniach przeprowadzonych w Bangladeszu wykazano, że 69% pacjentów z GBS posiadało udokumentowane klinicznie poprzedzające zakażenie *C. jejuni* [54].

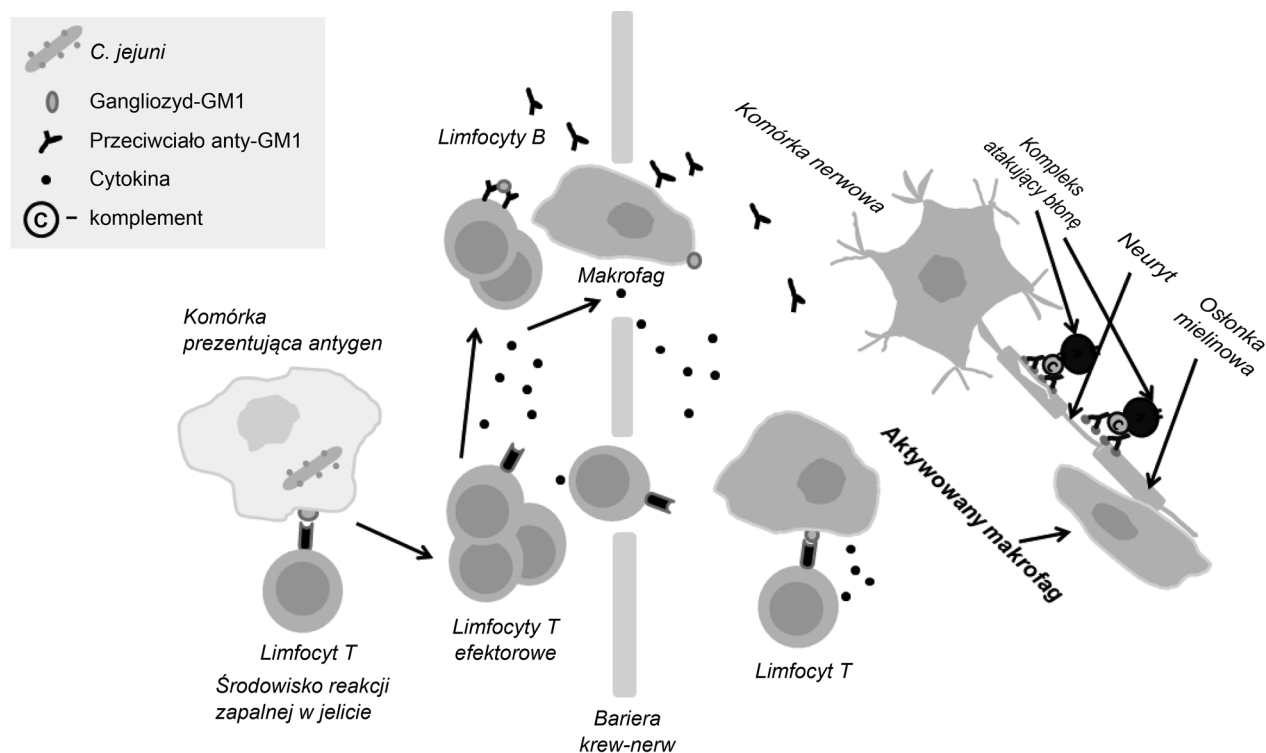
Z zespołem Guillaina-Barrégo wiązano sialotransferazę *C. jejuni*, która bierze udział w biosyntezie lipooligosacharydów przypominających gangliozydy. Gen kodujący ten enzym jest obecnie jedynym markerem bakteryjnym współzależnym z GBS [69]. Przeciwciała przeciwko gangliozydom po raz pierwszy wykryto u 19% pacjentów z GBS w badaniu przeprowadzonym przez Ilyasa i wsp. [30, 31]. Szeroki zakres gangliozydów, przeciwko którym zostały wytworzone przeciwciała u pacjentów z GBS obejmuje: GM1, sialoGM1, GM1b, GD1a, GD1b, GD3, GT1a, GT1b, GQ1b, LM1, GalC. Typ naśladowanego gangliozydu prawdopodobnie określa swoistość przeciwciał oraz wariant GBS. Szczepy izolowane od pacjentów z motorycznym i aksonalnym wariantem GBS często charakteryzują się GM1-

i GD1a-podobnymi lipooligosacharydami, strukturalnie przypominającymi ludzkie gangliozydy [15].

Hipoteza mimikry w patogenezie GBS jest niekiedy podważana ze względu na występowanie w surowicach osób zakażonych i niezakażonych naturalnych przeciwciał rozpoznających glikany. Wykazano jednak, że przeciwciała IgM przeciwko GM1 występujące w surowicy zdrowych osób, po oczyszczeniu metodą chromatografii powinowactwa i zbadane pod względem wiązania LPS różnych bakterii, reagowały jedynie z lipopolisacharydem szczepu *C. jejuni* wyizolowanego od pacjenta z biegunką [13]. Prawdopodobnie naturalnie występujące IgM o takiej swoistości są wytwarzane u ludzi po urodzeniu podczas odpowiedzi odpornościowej na antygeny wspólne różnych szczepów bakterii [13]. Nie wyklucza się, że występowanie przeciwciał przeciwgangliozydowych w surowicach osób z GBS może być wynikiem poprzedzającej infekcji lub wtórnej odpowiedzi immunologicznej gospodarza na uszkodzenie nerwu [51, 71, 74]. Niektóre przeciwciała anty-GM1 mogą być mono- lub wielospecyficzne. Co więcej, podobne epitopy gangliozydów mogą występować zarówno w mielinie, jak i błonach komórkowych aksonów, w różnej koncentracji i konfiguracji, co może prowadzić do preferencyjnego wiązania się przeciwciał u poszczególnych osobników w zależności od warunków i może się to zmieniać podczas trwania choroby. Na przykład, GM1 w aksolemie przewężeń Ranviera może być zasłonięty w czasie wczesnego rozwoju choroby, ale później może być ekspozycyjny na działanie przeciwciał na skutek demielinizacji parawęzłowej indukowanej przez przeciwciała anty-GM1 lub inne. W taki sposób wariant AIPD może przekształcić się w AMAN lub AIPD z wtórnym uszkodzeniem aksonów. Moran i wsp. [48] wykazali, że IgG anty-GM1, indukowane lipooligosacharydem *C. jejuni* wiążą się do węzłów Ranviera w nerwach ludzkich, zakłócając działanie kanałów sodowych i potasowych oraz przewodnictwo nerwowe [51, 71] (Rys. 4).

#### 4.3. Udział cytokin w rozwoju GBS

Poprzedzające zakażenie *C. jejuni* oraz mimikra molekularna pomiędzy LPS tych bakterii a gangliozydami komórek nerwowych gospodarza prowadzi do krzyżowej reakcji odpornościowej humoralnych i komórkowych czynników efektorowych gospodarza z receptorami mielinowymi. Istotną rolę w rozwoju wielu chorób zapalnych oraz autoimmunizacyjnych odgrywają cytokiny wytwarzane przez komórki odpornościowe gospodarza, śródbłonek naczyń, a także komórki nabłonkowe przewodu pokarmowego. Mediatorzy te wydzielane w nadmiarze stymulują rozwój procesów odpornościowych przeciwko patogenom, ale sprzyjają także rozwojowi patologicznej reakcji



Rys. 4. Rozwój i rola efektorowej odpowiedzi adaptacyjnej w patogenezie Zespołu Guillaína-Barrégo

zapalnej [34, 55, 66, 73]. W odpowiedzi cytokinową na komponenty czynników zakaźnych zaangażowane są powierzchniowe receptory Toll-podobne – TLR (Toll-like receptors) komórek gospodarza, które stanowią rodzinę strukturalnie spokrewnionych receptorów, rozpoznających zachowawcze komponenty mikroorganizmów, tzw. wzorce molekularne związane z patogenami – PAMP (patogen associated molecular patterns) oraz endogenne ligandy powstające wskutek uszkodzenia komórek. Czynniki te są wczesnymi sygnałami alarmowymi dla komórek odpornościowych, stymulującymi wydzielanie cytokin prozapalnych, takich jak: interleukina IL (interleukin)-1, IL-6 czy czynnik martwicy nowotworu – TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alfa), które wspomagają rozwój reakcji zapalnej, aktywują komórki odporności wrodzonej, a także różnicowanie limfocytów T i aktywację limfocytów B. Cytokiny produkowane przez limfocyty T pomocnicze typu 1 – Th1: IL-2, IFN- $\gamma$  (interferon gamma), TNF- $\alpha$  i IL-12, odgrywają istotną rolę w procesie autoimmunizacji z udziałem odpowiedzi typu komórkowego, natomiast cytokiny limfocytów T typu 2 – Th2 (np. IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) sprzyjają rozwojowi autoimmunizacji z udziałem przeciwciał. W wariantcie AIDP Zespołu GB cytokiny mogą być wytwarzane przez komórki Schwanna i przenikające różne komórki jednojądrzaste, a w wariantcie AMAN przez makrofagi [52, 71]. Sugeruje się, że kaskadowa odpowiedź zapalna może powstawać wskutek specyficznego rozpoznania antygenów przez limfocyty T, a także aktywacji makrofagów

i wydzielanych przez nie cytokin. Cytokiny te mogą zaburzyć spójność bariery krew-mózg, w wyniku czego komórki układu odpornościowego po jej przekroczeniu mogą mieć bezpośredni dostęp do mielin i komórek Schwanna (Rys. 4). Wytworzony przez migrujące limfocyty T TNF- $\alpha$  wykazuje prawdopodobnie bezpośrednie działanie cytotoksyczne, powodując demielinizację komórek nerwowych. Przypuszczalnie hamuje także syntezę białek mielin oraz glikolipidów [51, 52]. Z kolei IFN- $\gamma$  produkowany przez limfocyty Th1 ma działanie prozapalne, które wyraża się aktywacją komórek śródbłonna, makrofagów oraz limfocytów T. IFN- $\gamma$  zwiększa ekspresję cząsteczek MHC (Major Histocompatibility Complex) klasy II na makrofagach, co nasila ich zdolność prezentowania antygenów. Silne prozapalne działanie INF- $\gamma$  i hamowanie funkcji limfocytów Th2 czyni tę cytokinę głównym mediatorem zaburzeń autoimmunizacyjnych. Inną ważną cytokiną pośredniczącą w przeciwwzakaźnej odpowiedzi zapalnej jest IL-23. U myszy pozbawionych receptora dla tej interleukiny wykazano rozwój stwardnienia rozsianego i choroby zapalnej jelit o znacznie łagodniejszych objawach [52]. IL-23 może pełnić ważną rolę we wczesnej fazie efektorowej demielinizacji nerwów obwodowych. Wykazano, że w połączeniu z IL-6 i transformującym czynnikiem wzrostu beta 1 – TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor  $\beta$ 1) pobudza naiwne limfocyty T CD4+ do różnicowania się w limfocyty Th17, wytwarzające IL-17, która nasila wydzielanie przez monocyty silnie prozapalnych cytokin (IL-1 $\beta$ , IL-6), dodatkowo potę-

gując w ten sposób kaskadę zapalną. IL-17 jest wiązana z patogenezą GBS ze względu na mechanizm działania podobny do TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i IL-1 $\beta$  [52].

#### 4.4. Strategie leczenia Zespołu Guillaina-Barrégo

Aż 30% przypadków GBS prowadzi do niewydolności oddechowej [6, 72, 73]. Biorąc to pod uwagę, najważniejsze w kuracji pacjentów z GBS jest leczenie podtrzymujące na oddziale intensywnej opieki medycznej w celu umożliwienia monitorowania funkcji układu oddechowego. U większości pacjentów o ciężkim przebiegu choroby dochodzi do rozwoju zakażeń płuc i dróg moczowych. Leczenie za pomocą wymiany osocza lub podawanej dożylnie immunoglobuliny IVIg (przefiltrowane immunoglobuliny krwi ludzkiej) jest wskazane dla pacjentów z postępującym osłabieniem ogólnym i czynności oddechowej. Wymiana osocza, która polega na usunięciu 3–6 litrów osocza w ciągu kilku godzin oraz zastąpieniu go albuminą lub, w niektórych przypadkach, świeżym, mrożonym osoczem umożliwia usuwanie czynników humoralnych takich jak autoprzeciwciała, kompleksy immunologiczne, komponenty układu dopełniacza, cytokiny i inne nieswoiste mediatory zapalne, w randomizowanych badaniach klinicznych okazała się skuteczna w leczeniu GBS. Ograniczeniem tej metody jest brak dobrego dostępu do żyły podobojczykowej, szyjnej wewnętrznej lub udowej, jak również potencjalne powikłania m.in.: odma, niedociśnienie tętnicze, sepsa, zatorowość płucna czy niedokrwistość [16, 51].

Korzystne działania preparatu IVIg w leczeniu zaburzeń nerwowo-mięśniowych w GBS obejmują zakłócenie funkcji cząsteczek kostymulatorowych zaangażowanych w aktywację limfocytów T, którym antygen jest prezentowany w kompleksie MHC/peptyd, osłabienie działania autoprzeciwciał, zahamowanie wydzielania cytokin oraz ekspresji cząsteczek adhezyjnych, receptorów dla fragmentu Fc immunoglobulin na makrofagach, a także aktywacji dopełniacza i formowania kompleksu atakującego błonę. Sialowane fragmenty Fc IgG są istotne dla inicjacji kaskady odpowiedzi przeciwzapalnej, osłabiając tym samym stan zapalny [16, 73].

W terapii pacjentów z GBS najważniejsze jest zredukowanie postępującej fazy choroby, objawiającej się paraliżem mięśni oraz niewydolnością oddechową. Takie rezultaty osiąga się poprzez długoterminowe podawanie wysokich dawek IVIg lub wymianę plazmy albo zastosowanie obu procedur (podanie preparatu IVIg, a następnie wymiana plazmy). Średnio u około 126 badanych pacjentów już w 27 dniu po zastosowaniu takiej procedury leczenia GBS, chorzy mogli swobodnie oddychać, a w 50 dniu od rozpoczęcia terapii odzyskiwali władzę w nogach i samodzielnie chodzili. Tylko u 16,6% chorych z GBS nawet po 48 tygodniach leczenia

nadal występował paraliż kończyn dolnych. Wykazano ponadto, iż zastosowanie wyłącznie kortykosteroidów o działaniu przeciwzapalnym, w ogóle nie przynosiło poprawy stanu zdrowia pacjentów, a podanie ich łącznie z preparatem IVIg nie powodowało skrócenia czasu leczenia [51]. Dodatkowo zaleca się chorym stosowanie probiotyków, które osłabiają przebieg choroby [40, 47, 59, 60]. W ostatnich latach zintensyfikowano również badania nad szczepionkami przeciwko *C. jejuni*. Stosuje się je na przykład u kurcząt razem z paszą. Nie niszczą one mikroflory jelit, a skutecznie ograniczają kolonizację nabłonka przez *C. jejuni* [24, 50].

#### 5. Podsumowanie

Bakterie *Campylobacter* spp. wywołują u ludzi głównie zakażenie przewodu pokarmowego. Dominującymi gatunkami są *C. jejuni* i *C. coli*. Źródłem tych bakterii najczęściej jest mięso kurcząt, które są ich naturalnym rezerwuarem, a także mięso i produkty pochodzące od zakażonych krów i owiec, skażona woda lub bezpośredni kontakt z zarażonymi kotami i psami. Objawy zakażenia *Campylobacter jejuni* przypominające objawy grypowe, często są lekceważone i w ogóle nie diagnozowane, a leczenie zakażeń trudne ze względu na oporność tych bakterii na liczne antybiotyki. U 30% ludzi, wcześniej zakażonych *C. jejuni*, rozwija się Zespół Guillaina-Barrégo. Jest to choroba autoimmunizacyjna, w której główną rolę odgrywiają przeciwciała skierowane przeciwko fragmentowi LPS *C. jejuni*, które w związku z mimikrą antygenową są również swoiste dla gangliozydu ludzkiego GM1, znajdującego się w otoczce mielinowej nerwów obwodowych. Przeciwciała te, indukowana reakcja zapalna i swoista odpowiedź komórkowa wraz z licznymi cytokinami i mediatorami zapalnymi niszczą osłonki mielinowe nerwów oraz komórki Schwanna, co skutkuje u chorych zaburzeniem przewodnictwa nerwowo-mięśniowego. U 20% chorych kończy się to upośledzeniem ruchu, powikłaniami oddychania wymagającymi długotrwałego leczenia opartego na plazmoforezach i przyjmowaniu preparatu globulinowego, natomiast u 8% ludzi choroba prowadzi do śmierci. W związku z powyższym ryzykiem podejmowane są działania profilaktyczne mające na celu ograniczenie kolonizacji kurcząt *C. jejuni*, głównego rezerwuaru tych bakterii, poprzez wprowadzenie skutecznej szczepionki.

#### Piśmiennictwo

1. Ang C.W., Jacobs B.C., Laman J.D.: The Guillain-Barre' syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol.* 25, 6–66 (2004)

2. Ashgar S.S., Oldfield N.J., Wooldridge K.G., Jones M.A., Irving G.J., Turner D.P., AlaAldeen D.A.: CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni* mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *J. Bacteriol.* **189**, 1856–1865 (2007)
3. Awad W.A., Hess C., Hess M.: Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens. *Toxins*, **9** (2017)
4. Avrain L., Vernozy-Rozand C., Kempf I.: Evidence for natural horizontal transfer of tetO gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 134–140 (2004)
5. Backert S., Boehm M., Wessler S., Tegtmeyer N i wsp.: Transmigration route of *Campylobacter jejuni* across polarized intestinal epithelia cells: paracellular, transcellular or both? *Cell Commun. Signal.* **11**, 72–87 (2013)
6. Bilińska M., Koszewicz M.: Zespół Millera-Fishera z dominującymi zaburzeniami połykania i mowy. *Adv. Clin. Exp. Med.* **13**, 515–519 (2004)
7. Bolinger H., Kathariou S.: The Current state of macrolide resistance in *Campylobacter* spp.: Trends and impacts of resistance mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, e0046-17 (2017)
8. Bronnec V., Turo H., Bouju A., Cruveiller S., Rodrigues R., Demnerova K., Tresse O., Haddad N., Zagorec M.: Adhesion, biofilm formation, and genomic features of *Campylobacter jejuni* Bf, an atypical strain able to grow under aerobic conditions. *Front. Microbiol.* **7**, 1002 (2016)
9. Bronowski C., James C.E., Winstanley C.: Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol. Lett.* **356**, 8–19 (2014)
10. Caldwell D.B., Wang Y., Lin J.: Development, stability, and molecular mechanisms of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3947–3954 (2008)
11. Ó Cróinín T., Backert S.: Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 25 (2012)
12. Chandrashekar K., Kassem I. I., Rajashekar G.: *Campylobacter jejuni* transducer like proteins: Chemotaxis and beyond. *Gut Microbes*, **8**, 323–334 (2017)
13. Chopra I.: Mode of action of the tetracyclines and the nature of bacterial resistance to them, in *The Tetracyclines (w) Handbook of Experimental. red.: Hlavka J.J., Boothe J.H., Springer, Berlin, Germany, 1985, s. 317392.*
14. Coker O., Akitoye I., Raphael D., Thomas N., Bolaji A., Kehinde O., Obi L.C.: Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 237–243 (2002)
15. Day C.J., Semchenko E.A., Korolik V.: Glycoconjugates play a key role in *Campylobacter jejuni* infection between host and pathogen. *Front. Cell. Infect.* **2**, 1–8 (2012)
16. Dimachkie M.M., Barohn R.J.: Guillain-Barré syndrome and variants. *Neurol. Clin.* **31**, 491–510 (2013)
17. Engberg J., Aarestrup F. M., Taylor D.E., Gerner-Smidt P., Nachamkin I.: Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: Resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 24–34 (2001)
18. Epps S.V.R., Harvey R.B., Hume M.E., Phillips T.D., Anderson R.C., Nisbet D.J.: Foodborne *Campylobacter*: Infections, Metabolism, Pathogenesis and Reservoirs. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **10**, 6292–6304 (2013)
19. Esson D., Grant A.J. i wsp.: Identyfikacja i początkowa charakterystyka białka zaangażowanego w kształt komórki *Campylobacter jejuni*. *Microbial Pathogenesis*, **104**, 202–211 (2017)
20. Faber E., Gripp E., Maurischat S., Kaspers B., Tedin K., Menz S., Zuraw A., Kershaw O., Yang I., Rautenschlein S., Josenhans C.: Novel immunomodulatory Flagellin-Like Protein FlaC in *Campylobacter jejuni* and other *Campylobacteriales*. *mSphere*, **1**, 1–24 (2015)
21. Flanagan R.C., Neal-McKinney J.M., Dhillon A.S., Miller W.G., Konkel M.E.: Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. *Infect. Immun.* **77**, 2399–2407 (2009)
22. Friis C., Wassenaar T.M., Javed M.A., Snipen L., Lagesen K., Hallin P.F., Newell D.G., Toszeghy M., Ridley A., Manning G., Ussery D.W.: Genomic characterization of *Campylobacter jejuni* strain M. *PLoS One*, **5**, e12253 (2010)
23. Gibreel A. and Taylor D.E.: Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Antimic. Chemother.* **58**, 243–255 (2006)
24. Guerry P., Monterino M.A. i wsp.: *Campylobacter* polysaccharide capsules: virulence and vaccines. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 1–11 (2012)
25. Han a Zifeng, Willer T., Li L., Pielsticker C., Rychlik I., Velge P., Kaspers B., Rautenschleina S.: Influence of the gut Microbiota composition on *Campylobacter jejuni* colonization in chickens. *Infect. Immun.* **85**, 11e00380 (2017)
26. Hermans D., van Deun K., Martel A., van Immerseel F., Messens W., Heyndrickx M., Haesebrouck F., Pasmans F.: Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Vet. Res.* **42**, 82 (2011)
27. Hofreuter D.: Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 137 (2014)
28. Horrocks S.M., Anderson R.C., Nisbet D.J., Ricke S.C.: Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe*, **15**, 18–25 (2009)
29. Ikeda N., Karlyshev A.V.: Putative mechanisms and biological role of coccoid form formation in *Campylobacter jejuni*. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **1**, 41–49 (2012)
30. Ilyas A.A., Mithen F.A., Chen Z.W., Cook S.D.: Search for antibodies to neutral glycolipids in sera of patients with Guillain-Barré syndrome. *J. Neurol. Sci.* **102**, 67–75 (1992)
31. Ilyas A.A., Mithen F.A., Dalakas M.C., Chen Z.W., Cook S.D.: Antibodies to acidic glycolipids in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Neurol. Sci.* **107**, 111–121 (1992)
32. Indikova I., Humphrey T.J., Hilbert F.: Survival with a helping hand: *Campylobacter* and microbiota. *Front. Microbiol.* **6**, 1266 (2015)
33. Iovine N. M.: Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, **4**, 230–240 (2013)
34. Janssen R., Krogfelt K.A., Cawthraw S.A., van pelt W., Wageenaar J.A., Owen R.J.: Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 505–518 (2008)
35. John D.A., Williams L.K., Kanamarlapudi V., Humphrey T.J., Wilkinson T.S.: The bacterial species *Campylobacter jejuni* induce diverse innate immune responses in human and avian intestinal epithelial cells. *Front. Microbiol.* **8**, 1840 (2017)
36. Johnson T.J., Shank J.M., Johnson J.G.: Current and potential treatments for reducing *Campylobacter* colonization in animal hosts and disease in humans. *Front. Microbiol.* **8**, 1–14 (2017)
37. Kaakoush N.O., Castaño-Rodríguez N., Mitchell H.M., Mana S.M.: Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 687–720 (2015)
38. Kaakoush N.O., Mitchell H. M.: *Campylobacter concisus* – new player in intestinal disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 1–12 (2012)

39. Kimoto K., Koga M., Hirata K., Takahashi M., Li J., Gilbert M., Yuki N.: Relationship of bacterial strains to clinical syndromes of *Campylobacter* – associated neuropathies. *Neurology*, **67**, 1837–1843 (2006)
40. Kobierecka P.A., Jagusztyn-Krynicka E.K. i wsp.: *In vitro* characteristics of *Lactobacillus* spp. strains isolated from the chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. *Microbiol. Open*, **6**, 1–15 (2017)
41. Koga M., Takahashi M., Masuda M., Hirata K., Yuki N.: *Campylobacter* gene polymorphism as a determinant of clinical features of Guillain-Barre syndrome. *Neurology*, **65**, 1376–1381 (2005)
42. Koga M., Yuki N., Takahashi M., Saito K., Hirata K.: Close association of IgA anti-ganglioside antibodies with antecedent *Campylobacter jejuni* infection in Guillain-Barre and Fisher's syndromes. *J. Neuroimmunol.* **81**, 138–143 (1998)
43. Kurtkiewicz A.: *Kampylobakteriozy u ludzi i zwierząt. Życie Weterynaryjne*, **83**, 285–288 (2008)
44. Mahajan S., Rodgers F.G.: Isolation, characterization, and host-cell-binding properties of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1314–1320 (1990)
45. Melo R.T., Mendonça E.P., Monteiro G.P., Siqueira M.C.: Intrinsic and extrinsic aspects on *Campylobacter jejuni* biofilms. *Front. Microbiol.* **8**, 1–15 (2017)
46. Miller C.E., Rock J.D., Ridley K.A., Williams P.H., Ketley J.M.: Utilization of lactoferrin-bound and transferrin-bound iron by *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **190**, 1900–1911 (2008)
47. Mohan V.: The role of probiotics in the inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization and virulence attenuation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 1503–1513 (2015)
48. Moran A.P., Annuk H., Prendergast M.M.: Antibodies induced by ganglioside-mimicking *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides recognise epitopes at the nodes of Ranvier. *J. Neuroimmunol.* **165**, 179–185 (2005)
49. Nachamkin, I., Szymanski, M.C., Blaser, J.M.: *Campylobacter. 3-cia ed.*; ASM Press: Washington DC, USA (2008)
50. Nothaft H., Szymański C.M. i wsp.: Engineering the *Campylobacter jejuni* N-glycan to create an effective chicken vaccine. *Scientific Reports*, **6**, 26511 (2016)
51. Nyati K.K., Nyati R.: Role of *Campylobacter jejuni* Infection in the Pathogenesis of Guillain-Barré Syndrome: An Update. *Biomed. Res. Int.* 852195 (2013)
52. Nyati K.K., Prasad K.N.: Role of cytokines and Toll-Like receptors in the immunopathogenesis of Guillain-Barré syndrome. *Mediators Inflamm.* 758639, DOI:10.1155/2014/758639 (2014)
53. Palyada K., Threadgill D. and Stintzi A.: Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **186**, 4714–4729 (2004)
54. Phongsisay V.: The immunobiology of *Campylobacter jejuni*: innate immunity and autoimmune diseases. *Immunobiol.* **221**, 535–543 (2015)
55. Prendergast M., Moran A.P.: Lipooligosaccharides in the development of Guillain-Barre's syndrome and Miller Fisher syndrome forms of acute inflammatory peripheral. *Neuropathies J. Endotoxin Res.* **6**, 341–359 (2000)
56. Ridley K.A., Rock J.D., Li Y., Ketley J.M.: Hem utilization in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **188**, 7862–7875 (2006)
57. Rokosz-Chudziak N., Rastawicki W.: Wybrane mechanizmy chorobotwórczości pałeczek *Campylobacter jejuni*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **66**, 47–58 (2014)
58. Sait-Cyr M.J., Guyard-Nicodeme M., Messaoudi S., Chemaly M., Cappelier J.M., Dousset X., Haddad N.: Recent advanced in screening of anti-*Campylobacter* activity in probiotics for use in poultry. *Front. Microbiol.* **7**, 1–22 (2016)
59. Saxena A.: Probiotics as a potential alternative for relieving peripheral neuropathies: a case for Guillain-Barre's syndrome. *Front. Microbiol.* **6**, 1497 (2015)
60. Shu X.M., Cai F.C., Zhang X.P.: Carbohydrate mimicry of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide is critical for the induction of anti-GM1 antibody and neuropathy. *Muscle Nerve*, **33**, 225–231 (2006)
61. Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P.: *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* **2**, 200 (2011)
62. Sofka D., Pfeifer A., Paulsen P., Hilbert F.: Changes with in the intestinal flora of broilers by colonisation with *Campylobacter jejuni*. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **128**, 104–110 (2015)
63. Stahl M., Vallance B.A.: Insights into *Campylobacter jejuni* colonization of the mammalian intestinal tract using a novel mouse model of infection. *Gut Microbe*, **6**, 143–148 (2015)
64. Szymanski C.M. and Gaynor E.C.: How a sugary bug gets through the day. Recent developments in understanding fundamental processes impacting *Campylobacter jejuni* pathogenesis. *Gut Microbe*, **3**, 135–144 (2012)
65. Wang Y., Sun S., Zhu J., Cui L., Zhang H.L.: Biomarkers of Guillain-Barre's syndrome: Some recent progress, more still to be explored. *Mediators Inflamm.* 5640098 (2015)
66. Watson A.E., Sandu P., Gundogdu O., Mills D.C., Inglis N.F., Manson E., Imrie L., Bajaj-Elliott M., Wren B.W., Smith David G.E., Dorrella N.: *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles play an important role in bacterial interactions with human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **80**, 4089–4098 (2012)
67. Wiczorek K., Osek J. Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*. *Biomed. Res. Int.* 340605, DOI: 10.1155/2013/340605 (2013)
68. Xiang S.L., Zhong M., Cai F.C., Deng B., Zhang X.P.: The sialic acid residue is a crucial component of *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide ganglioside mimicry in the induction of Guillain-Barre's syndrome. *J. Neuroimmunol.* **174**, 126–132 (2006)
69. Xu F., Zeng X., Haigh R.D., Ketley J.M., Lin J.: Identification and characterization of a new ferric enterobactin receptor CfrB in *Campylobacter*. *J. Bacteriol.* **192**, 4425–4435 (2010)
70. Yu R.K., Usuki S., Ariga T. Ganglioside molecular mimicry and its pathological roles in Guillain-Barre' syndrome and related diseases. *Infect. Immun.* **74**, 6517–6527 (2006)
71. Yuki N. Guillain-Barre syndrome and anti-ganglioside antibodies a clinician scientist's journey. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B. Phys Biol. Sci.* **88**, 299–326 (2012)
72. Yuki N.: Pathogenesis of Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2**, 99–105 (1999)
73. Yuki N, Hartung H.: Guillain-Barré Syndrome. *New Engl. J. Med.* **336**, 294–304 (2012)
74. Yuki N., Koga M.: Bacterial infections in Guillain-Barre and Fisher syndromes. *Curr. Opin. Neurol.* **19**, 451–457 (1995)
75. Yuki N., Odaka M.: Ganglioside mimicry as cause of Guillain-Barre's syndrome. *Curr. Opin. Neurol.* **18**, 557–561 (2005)
76. Zang T., Dong J., Lu Q., Luo Q., Wen G., Liu G., Shao H.: Genotypic diversity, antimicrobial resistance and biofilm-forming abilities of *Campylobacter* isolated from chicken in Central China. *Gut Pathogens*, **9**, 1–10 (2017)
77. Zhang X.P., Gilbert M., Yuki N., Cao F., Li J., Liu H., Lii Q., Meng F., Zhang J.: Association of anti GT1a antibodies with an outbreak of Guillain-Barre's syndrome and analysis of ganglioside mimicry in an associated *Campylobacter jejuni* strain. *PLoS One*, **10**, e0131730 (2015)

## AKTUALNE WYZWANIA WETERYNARYJNEJ DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ DOTYCZĄCEJ OZNACZANIA LEKOWRAŻLIWOŚCI GRONKOWCÓW

Magdalena Kizerwetter-Świda\*, Dorota Chrobak-Chmiel, Magdalena Rzewuska

Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedkliniknych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano w maju 2018 r.

**Streszczenie:** Gronkowce należą do bakterii często izolowanych z materiału klinicznego pobieranego od zwierząt. W weterynarii z próbek klinicznych oprócz *Staphylococcus aureus* izolowane są także inne gatunki gronkowców koagulazo-dodatnich. Ponadto, coraz częściej rozpoznawane są także gronkowce koagulazo-ujemne. Taksonomia rodzaju *Staphylococcus* ulegała ostatnio aktualizacji, wyodrębniono kilka nowych gatunków, które mogą również występować u zwierząt. Powoduje to pewne trudności w precyzyjnej identyfikacji gronkowców. Dokładna identyfikacja gatunków z rodzaju *Staphylococcus* jest niezwykle istotna, ponieważ, zgodnie z zaleceniami EUCAST i CLSI, interpretacja wyników badań lekowności *S. aureus* i gronkowców koagulazo-ujemnych jest różna. Ponadto oporność na metycylinę wśród szczepów *S. aureus* wykrywa się przy pomocy krążków z cefoksytyną, natomiast w przypadku *Staphylococcus pseudintermedius* – z użyciem oksacyliny. Ważnym problemem weterynaryjnych laboratoriów mikrobiologicznych jest ograniczona liczba ujednoczonych wytycznych dotyczących metodologii badań oraz wytycznych określających interpretację wyników oznaczania wrażliwości na antybiotyki. Wytyczne takie powinny dotyczyć różnych gatunków bakterii, w tym także gronkowców, izolowanych od różnych gatunków zwierząt. Aktualne wytyczne CLSI z roku 2015 zawierają takie zalecenia, choć w organicznym zakresie. Rekomendacje opracowane przez EUCAST są przeznaczone dla mikroorganizmów izolowanych od ludzi i nie powinny być stosowane przez laboratoria weterynaryjne. Ponadto dostępne zalecenia nie uwzględniają nowych gatunków gronkowców. Istnieje pilna potrzeba harmonizacji metod stosowanych w weterynaryjnych laboratoriach mikrobiologicznych oraz opracowania wytycznych dotyczących interpretacji wyników oznaczania lekowności dla różnych bakterii, w tym różnych gatunków gronkowców izolowanych od poszczególnych gatunków zwierząt.

1. Wstęp. 2. Trudności w identyfikacji gronkowców izolowanych od zwierząt. 3. Oznaczanie lekowności gronkowców – metody tradycyjne. 4. Alternatywne metody określania lekowności gronkowców. 5. Wykrywanie oporności gronkowców na metycylinę. 6. Interpretacja wyników badania lekowności patogenów weterynaryjnych. 7. Przeciwdziałanie narastaniu oporności drobnoustrojów na antybiotyki. 8. Podsumowanie

### Current challenges of veterinary microbiological diagnostics concerning the susceptibility of staphylococci to antibiotics

**Abstract:** Staphylococci are pathogenic bacteria often isolated from clinical material obtained from animals. Unlike in human medicine, in veterinary sciences various species of coagulase-positive staphylococci have been isolated from clinical specimens. In addition to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius*, other species are also often identified. Recently, the taxonomy of staphylococci has been updated, therefore, it is now important to recognize also the new species. Currently, coagulase-negative staphylococci are considered an important group of opportunistic pathogens. The accurate identification of species within the genus *Staphylococcus* is important because, according to the EUCAST and CLSI recommendations, the interpretation of the results of susceptibility testing for *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci is different. Furthermore, the resistance to methicillin in *S. aureus* strains is detected using a cefoxitin disk, whereas in *S. pseudintermedius* – using an oxacillin disk. An important problem for veterinary microbiological laboratories is a limited number of unified guidelines on methodology and guidelines specifying the interpretation of the results of antibiotic susceptibility testing. The lack of available recommendations for some antibiotics testing results in veterinary laboratories often using the guidelines established for human pathogens. There is an urgent need to harmonize the methods and develop guidelines for the interpretation of results of susceptibility testing for different bacteria, including various species of staphylococci isolated from an individual animal host.

1. Introduction. 2. Problems with the identification of staphylococci isolated from animals. 3. Determination of susceptibility of staphylococci – traditional methods. 4. Alternative methods for determining the susceptibility of staphylococci. 5. Detection of staphylococcal resistance to methicillin. 6. Interpretation of the results of the susceptibility testing of veterinary pathogens. 7. Prevention of the antimicrobial resistance. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** mikrobiologia weterynaryjna, oporność na antybiotyki, *Staphylococcus* spp., wykrywanie oporności na metycylinę  
**Key words:** antimicrobial resistance, methicillin resistance testing, *Staphylococcus* spp., veterinary microbiology

### 1. Wstęp

Stały rozwój diagnostyki mikrobiologicznej skutkuje nowymi wyzwaniami dla laboratoriów diagnostycznych. Weterynaryjna diagnostyka mikrobiologiczna polega na badaniu materiału klinicznego pochodzącego od różnych gatunków zwierząt, co znacznie zwiększa

liczbę gatunków drobnoustrojów patogennych, które należy rozpoznawać. Spośród gronkowców koagulazo-dodatnich (Coagulase-Positive Staphylococci, CPS) izolowanych z materiałów klinicznych pobranych od ludzi największe znaczenie ma *Staphylococcus aureus* [11]. U zwierząt znacznie częściej występują i są istotne klinicznie także pozostałe gatunki CPS [21, 33, 47].

\* Autor korespondencyjny: Dr Magdalena Kizerwetter-Świda, Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedkliniknych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, tel.: 22 5936028; e-mail: magdalena\_kizerwetter\_swida@sggw.pl

Ponadto, w mikrobiologii klinicznej coraz większe znaczenie mają gronkowce koagulazo-ujemne (Coagulase-Negative Staphylococci, CNS) izolowane zarówno od ludzi, jak i od zwierząt [7, 53]. Wobec ostatnich zmian w taksonomii oraz aktualnej wiedzy dotyczącej chorobotwórczości gronkowców, weterynaryjne laboratoria diagnostyczne powinny precyzyjnie rozpoznawać gatunki tych bakterii, ponieważ w wielu wypadkach warunkuje to prawidłową interpretację wyników oznaczania lekowrażliwości, w tym sposób wykrywania oporności na metycylinę.

## 2. Trudności w identyfikacji gronkowców izolowanych od zwierząt

Podstawowym celem weterynaryjnej diagnostyki mikrobiologicznej jest identyfikacja czynnika zakaźnego. Prawidłowe i szybkie rozpoznanie drobnoustrojów wyizolowanych z materiału klinicznego umożliwia przeprowadzenie wiarygodnego badania ich lekowrażliwości, co z kolei decyduje o wyborze skutecznej antybiotykoterapii [12, 35]. Tradycyjne procedury identyfikacji mikroorganizmów, w tym gronkowców, oparte są w głównej mierze na metodach hodowlanych, w których oceniane są cechy fenotypowe bakterii [15]. Systemy identyfikacji gronkowców oparte na badaniu ich aktywności biochemicznej są opracowywane głównie na podstawie wyników uzyskiwanych dla szczepów wyizolowanych od ludzi. Z tego względu ich przydatność do identyfikacji izolatów pochodzących od zwierząt jest ograniczona. Na przykład, wiadomo, że *Staphylococcus pseudintermedius* może być często błędnie rozpoznawany jako *S. aureus* [48, 56]. Podobnie fenotypowa identyfikacja *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius* [9] oraz gronkowców z grupy CNS może być trudna [38, 57].

Pomimo stałego udoskonalania metod diagnostycznych stosowanych w mikrobiologii prawidłowe rozpoznanie gatunków gronkowców blisko ze sobą spokrewnionych, o zbliżonych cechach fenotypowych, nie jest proste. Znakomitym przykładem są trzy gatunki: *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* oraz *S. delphini*, należące do grupy SIG (*Staphylococcus intermedius* Group – SIG) [32, 33]. Cechują się one zbliżonymi właściwościami fenotypowymi, a podobieństwo sekwencji genu 16S rRNA wynosi u nich ponad 99% [9, 32, 51]. Także w przypadku nowych gatunków gronkowców opisanych w ciągu ostatniej dekady, jak np.: istotnego w weterynarii *Staphylococcus agnetis*, precyzyjna identyfikacja stanowi obecnie wyzwanie dla laboratorium diagnostycznego [2, 54]. Szczegółowe badania gronkowców oparte na analizie molekularnej pozwalają na identyfikację poszczególnych gatunków oraz na ustalenia pokrewieństwa szczepów [30, 45, 51]. Choć rutynowo do identyfikacji

tych bakterii coraz częściej wykorzystywane są techniki molekularne, to wiele z metod opisanych w literaturze nie nadaje się do codziennego zastosowania w laboratoriach diagnostycznych [56]. Precyzyjną identyfikację umożliwia również spektrometria masowa MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), coraz częściej stosowana także w laboratoriach weterynaryjnych [4, 17].

Ostatnie lata przyniosły pewne zmiany w taksonomii bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. szczegółowe badania z użyciem metod biologii molekularnej pozwoliły na wyodrębnienie kilku nowych gatunków, wyizolowanych od ludzi, jak również od zwierząt oraz ze środowiska. Nowe gatunki gronkowców koagulazo-dodatnich, które mogą występować u zwierząt to *Staphylococcus argentus*, *Staphylococcus schweitzeri* [54] oraz koagulazo-zmienny *S. agnetis* [53]. Do grupy gronkowców koagulazo-ujemnych dołączyły gatunki *Staphylococcus rostri* wyizolowany od świń [42], *Staphylococcus devriesei* uzyskany z mleka krów [49] oraz *Staphylococcus microti* [37] i *Staphylococcus stepanovicii* [25] pochodzące od gryzoni. Ich znaczenie chorobotwórcze dla zwierząt nie jest obecnie znane, z wyjątkiem *S. agnetis*, gatunku opisanego w roku 2012. Początkowo wyizolowany był on z przypadków *mastitis* u bydła, obecnie wiadomo, że może być także czynnikiem etiologicznym *osteomyelitis*, zapalenia wsierdzia oraz posocznicy u broilerów kurzych [1, 39]. Identyfikacja *S. agnetis* oraz innych nowo opisanych gatunków gronkowców raczej nie jest rutynowo wykonywana w laboratoriach mikrobiologicznych [2]. Laboratoria przy ośrodkach naukowych lub akademickich, prowadzących badania dotyczące nowych gatunków, mogą oferować możliwość ich identyfikacji.

Prawidłowe rozpoznanie gatunków w obrębie rodzaju *Staphylococcus* jest niezwykle istotne, ponieważ zgodnie z rekomendacjami European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) oraz Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) interpretacja wyników oznaczania lekowrażliwości dla *S. aureus* oraz gronkowców koagulazo-ujemnych jest różna [10, 19]. Wszelkie badania diagnostyczne wymagają przestrzegania określonych procedur, jak również interpretacji uzyskanych wyników zgodnie z ujednoczonymi zaleceniami. W weterynaryjnej diagnostyce mikrobiologicznej często brakuje szczegółowych wytycznych odnośnie sposobu identyfikacji niektórych gatunków gronkowców [23].

## 3. Oznaczanie lekowrażliwości gronkowców – metody tradycyjne

Do oznaczania lekowrażliwości bakterii najczęściej stosowane są metody krążkowo-dyfuzyjna, seryjnych rozcieńczeń lub metoda paskowo-dyfuzyjna przy

użyciu pasków gradientowych [15, 35]. Wyznaczenie minimalnego stężenia danej substancji hamującego (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) wzrost drobnoustrojów przy pomocy metody rozcieńczeń antybiotyku w podłożu płynnym jest uznawane za tzw. złoty standard w oznaczaniu lekowrażliwości [19]. Znaczne usprawnienie wykonania oznaczenia i obniżenie kosztów pojedynczego badania możliwe jest dzięki zastosowaniu płytek z gotowymi rozcieńczeniami antybiotyków oraz automatycznemu odczytowi posiewów. Dla gronkowców są to np.: Sensititre Gram Positive MIC Plate (Thermo Scientific) oraz Microlatest MIC STAPHY (Erba Mannheim).

Oznaczając lekowrażliwość przy pomocy metody krążkowo-dyfuzyjnej ustala się wielkość średnic stref zahamowania wzrostu badanych szczepów bakteryjnych wokół krążków z antybiotykami. Wyniki interpretuje się porównując uzyskane wartości stref (mierzonych w milimetrach) z rekomendowanymi jako wartości graniczne (breakpoint). W metodzie tej szczepy klasyfikowane są do kategorii klinicznie odporne, wrażliwe lub średniowrażliwe. Mankamentem tych metod jest stosunkowo długi czas oczekiwania na wynik, związany z koniecznością wyizolowania szczepów, przygotowania czystych kultur, a następnie wykonania właściwego oznaczenia wrażliwości na antybiotyki. Uzyskanie wiarygodnych wyników przy zastosowaniu obu powyższych metod wymaga zachowania określonych standardów jakości wykonania, takich jak odpowiednia gęstość inokulum, rodzaj stosowanego podłoża, warunki inkubacji, które wskazane są w powszechnie stosowanych wytycznych EUCAST czy CLSI [40]. W laboratoriach diagnostycznych do wyznaczania wartości MIC często stosuje się metodę paskowo-dyfuzyjną, która jest mniej pracochłonna od metody rozcieńczeń. Wytyczne CLSI oraz EUCAST nie uwzględniają jednak wyników uzyskanych przy pomocy tej metody. Wiadomo również, że wartość MIC wyznaczana przy pomocy pasków gradientowych dla szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę (Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) może być zawyżona o 0,5 do 1,5 log<sub>2</sub> w porównaniu do wartości określanej przy pomocy rozcieńczeń [44].

#### 4. Alternatywne metody określania lekowrażliwości gronkowców

Obecnie w diagnostyce mikrobiologicznej wyraźnie zaznacza się tendencja do skracania czasu oczekiwania na wynik badania. W przypadku oznaczania lekowrażliwości bakterii możliwe jest to przez wykonanie oznaczenia bezpośrednio z próbek klinicznych, z pominięciem etapu izolacji. Postępowanie takie bywa jednak zawodne np. w przypadku zakażeń o mieszanej etiologii. W medycynie ludzkiej określanie leko-

wrażliwości drobnoustrojów bezpośrednio z próbek klinicznych jest szczególnie istotne w przypadku pacjentów w stanie krytycznym. Skrócenie czasu oczekiwania na wynik badania lekowrażliwości wymaga zastosowania metod alternatywnych, bazujących na technice PCR lub MALDI-TOF SM. Badania te można przeprowadzić bezpośrednio z użyciem pobranego materiału klinicznego lub po wstępnym namnożeniu drobnoustrojów [4, 6, 16].

Metody oparte na standardowej technice PCR lub RealTime PCR umożliwiają wykrycie specyficznych genów determinujących oporność mikroorganizmów na określone antybiotyki. Opisano wiele zastosowań tych metod dla różnych drobnoustrojów, w tym również dla gronkowców i różnych antybiotyków. W praktyce laboratoryjnej najczęściej wykorzystywane jest wykrywanie obecności szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę na podstawie obecności genu *mecA* w badanych próbkach [40]. Dostępne są zautomatyzowane systemy wykorzystujące technikę RealTime PCR, jak BD GeneOhm MRSA (Becton Dickinson) oraz GeneXpert (Cepheid). Szybkie potwierdzenie obecności MRSA we krwi pacjentów jest szczególnie istotne na oddziałach intensywnej terapii dla niezwłocznego podjęcia skutecznego leczenia [61].

Początkowo MALDI-TOF MS wykorzystywano jedynie do identyfikacji drobnoustrojów. Obecnie zakres zastosowań tej techniki obejmuje także wykrywanie bakterii opornych na antybiotyki, pod warunkiem, że widma białkowe szczepów opornych i wrażliwych są różne [4]. Potwierdzono skuteczność spektrometrii mas w wykrywaniu gronkowców opornych na metycylinę [41]. Aktualnie metody te nie znajdują jeszcze zastosowania w rutynowej diagnostyce weterynaryjnej.

Najbardziej innowacyjną i efektywną metodą sekwencjonowania jest sekwencjonowanie nowej generacji (Next Generation Sequencing, NSG) umożliwiające wykrycie obecności wszystkich znanych genów oporności podczas pojedynczej analizy [52]. Upowszechnienie NGS pozwoliło na szybki rozwój sekwencjonowania całych genomów (Whole Genome Sequencing, WGS). Występowanie określonych genów u badanego szczepu bakterii wskazuje na profil jego oporności na antybiotyki. Wysoką zgodność przewidywania profilu oporności na podstawie genotypu badanego szczepu w porównaniu do jego właściwości fenotypowych wykazano dla *S. aureus* [22] oraz wielu innych drobnoustrojów, w tym również *Staphylococcus epidermidis* [34].

Wadą zastosowania sekwencjonowania nowej generacji do oznaczania lekowrażliwości badanych szczepów jest możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich. W przypadku obecności niefunkcjonalnych pseudogenów lub represji genów kodujących pompy typu efflux, uzyskuje się wyniki fałszywie dodatnie wskazujące na oporność. Obecnie panuje pogląd, że w najbliższej



przyszłości sekwencjonowanie WGS nie stanie się jednak podstawowym narzędziem diagnostycznym w wykrywaniu oporności wśród gronkowców oraz innych bakterii. Choć sekwencjonowanie całych genomów patogenów izolowanych z materiału klinicznego jest technicznie możliwe, to w porównaniu do rutynowego badania lekowrażliwości, nadal pozostaje kosztowne. Co najważniejsze, zgodnie z aktualną opinią EUCAST obecnie zbyt mało danych potwierdza możliwość wykorzystania wyników WGS do przewidywania lekooporności drobnoustrojów oraz wyboru skutecznej terapii [18]. W rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej sekwencjonowanie nowej generacji nie jest jeszcze stosowane.

### 5. Wykrywanie oporności gronkowców na metycylinę

Prawidłowe rozpoznanie gatunku gronkowca jest niezwykle istotne, ponieważ ma decydujący wpływ na dobór antybiotyku użytego w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej do wykrywania oporności na metycylinę. Krążek z oksacyliną jest zalecany do oznaczania oporności na metycylinę u szczepów *S. pseudintermedius*, patogenu izolowanego głównie od psów, gdyż wykazano jego większą skuteczność w wykrywaniu tego mechanizmu oporności, w porównaniu do krążka z cefoksytiną, który jest zalecany dla *S. aureus* [8, 10, 19]. Chociaż, u niektórych szczepów *S. pseudintermedius* opornych na metycylinę (Methicillin-resistant *S. pseudintermedius*, MRSP) należących do typu sekwencyjnego 258 stwierdzono niskie wartości MIC oksacyliny (0,5–4 µg/ml), co może powodować uzyskanie wyników wątpliwych w metodzie krążkowo-dyfuzyjnej z oksacyliną [14, 20, 60]. W takich przypadkach, o potwierdzeniu oporności na metycylinę decyduje obecność genu *mecA* warunkującego ten typ oporności. Co więcej, niektóre izolaty MRSP cechuje heterogenna ekspresja genu *mecA*, kiedy wokół krążka z oksacyliną występuje strefa zahamowania wzrostu, a wokół krążka z cefoksytiną pojawia się strefa zahamowania wzrostu o średnicy pozwalającej na zakwalifikowanie tego szczepu jako metycylino-wrażliwego [46].

Rekomendacje CLSI oraz EUCAST odnośnie wykrywania oporności na metycylinę uwzględniają jedynie *S. aureus*, *S. pseudintermedius* oraz CNS, z wyszczególnieniem *S. lugdunensis* i *S. epidermidis* [10, 19]. Brakuje zaleceń dotyczących innych gatunków gronkowców koagulazo-dodatnich, takich jak *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. intermedius*, jak również koagulazo-zmiennych *Staphylococcus hyicus* oraz *S. agnetis*. Oporność na metycylinę wśród szczepów *S. schleiferi* subsp. *coagulans* może występować nawet u 40% izolatów [36]. Wyniki badań przedstawione przez Huse i wsp. (2018) wskazują, że wyniki uzyskane z uży-

ciem metody krążkowo-dyfuzyjnej z oksacyliną oraz wyznaczenie wartości MIC dla oksacyliny interpretowane według kryteriów zalecanych dla *S. pseudintermedius* są także skuteczne w identyfikacji metycylino-opornych szczepów *S. schleiferi* [27]. Gen *mecA* może występować również u gronkowców zaliczanych do CNS izolowanych zarówno od zwierząt hodowlanych [7, 54], jak i towarzyszących [13]. Oporność na metycylinę szczególnie często występuje u *Staphylococcus haemolyticus* (61%) oraz *S. epidermidis* (55%) [13].

### 6. Interpretacja wyników badania lekowrażliwości patogenów weterynaryjnych

Nieodzownym elementem diagnostyki mikrobiologicznej jest ocena lekowrażliwości wyizolowanych patogenów. W tej kwestii mikrobiologia weterynaryjna napotyka na pewne trudności, ponieważ w przypadku gronkowców, jak również innych drobnoustrojów izolowanych od zwierząt, wytyczne odnośnie interpretacji wyników są niepełne lub nieopracowane [23]. Powstało wiele ogólnych standardów i zaleceń międzynarodowych dotyczących sposobu wykonania badań, które można stosować badając materiał pochodzący od zwierząt [12, 28, 59]. Jednak interpretacja wyników badania lekowrażliwości stanowi nadal problem, ponieważ brakuje rekomendacji dla wielu patogenów izolowanych od zwierząt. Wyniki uzyskane metodą krążkowo-dyfuzyjną lub oznaczania wartości MIC interpretuje się najczęściej zgodnie z rekomendacjami opracowanymi przez EUCAST lub CLSI, jako aktualnie obowiązujące [10, 19]. Działający w naszym kraju Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) opracowuje rekomendacje do interpretacji wyników oznaczania lekowrażliwości drobnoustrojów na podstawie zaleceń EUCAST, dotyczą one drobnoustrojów występujących u ludzi i nie zawierają odrębnych klinicznych wartości granicznych dla patogenów weterynaryjnych. Wartości graniczne dla szczepów izolowanych od ludzi nie są odpowiednie i nie powinny być stosowane dla izolatów pochodzących od różnych gatunków zwierząt. Wartości te uwzględniają dawkowanie oraz parametry PK/PD antybiotyków stosowanych u ludzi. Jako pewną alternatywę dla badań szczepów izolowanych od zwierząt eksperci z EUCAST zalecają stosowanie epidemiologicznych wartości granicznych (epidemiological cut-off, ECOFF). Jednak wartości te wyznaczono również dla patogenów ludzkich, zatem postępowanie takie mimo zaleceń ekspertów nie jest właściwe. Ponadto, w rekomendacjach przeznaczonych dla medycyny ludzkiej nie uwzględnia się antybiotyków stosowanych jedynie u zwierząt, takich jak: ceftiofur, cefowecyna, cefquinom czy florfenikol. Do tej pory jedynie rekomendacje CLSI z roku 2015 podają

kliniczne wartości graniczne dla głównych patogenów weterynaryjnych oraz dla wybranych antybiotyków [10]. Brakuje w nich jednak wielu danych, przykładowo dla gronkowców izolowanych od zwierząt nie podano wartości granicznych dla chloramfenikolu, rifampicyny, trimetoprimu z sulfametoksazolem oraz tikarcyliny z kwasem klawulanowym [10].

W ramach EUCAST w roku 2015 utworzono podkomitet weterynaryjny (Vet-CAST), którego działalność ma na celu ujednoczenie metod badania oraz interpretacji wyników oceny wrażliwości na antybiotyki, dla bakterii izolowanych od zwierząt lub bakterii o potencjale zoonotycznym w Europie. Podobnie, w obrębie Europejskiego Towarzystwa Mikrobiologii Klinicznej i Chorób Zakaźnych (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) utworzono w 2015 roku Grupę Badawczą Mikrobiologii Weterynaryjnej (European Study Group for Veterinary Microbiology, ESGVM), której działanie ma na celu harmonizację metod identyfikacji oraz badania wrażliwości patogenów weterynaryjnych. Prace nad przygotowaniem rekomendacji dla patogenów weterynaryjnych w Europie nadal trwają. Wiarygodne wartości graniczne powinny być wkrótce ustalone dla różnych drobnoustrojów izolowanych od poszczególnych gatunków zwierząt. Z uwagi na zjawisko rozprzestrzeniania się wśród zwierząt różnych gatunków patogenów wielolekoopornych, istnieje pilna potrzeba opracowania takich danych, aby interpretacja wyników antybiogramów była prawidłowa.

## 7. Przeciwdziałanie narastaniu oporności drobnoustrojów na antybiotyki

Aktualnie, jednym z głównych wyzwań mikrobiologii, w tym również weterynaryjnej jest stale narastająca oporność drobnoustrojów na antybiotyki. Programy polityki antybiotykowej (antimicrobial stewardship programmes) są jednym z wielu działań podejmowanych w celu przeciwdziałania temu zjawisku. Stosowane są one w wielu szpitalach medycyny ludzkiej, uwzględniają szczegółowe zasady współpracy lekarzy klinicyistów z zespołem ds. antybiotykoterapii w obrębie konkretnych placówek [26]. Programy takie obecnie jeszcze rzadko stosowane są w lecznicach i klinikach weterynaryjnych, w których zwierzęta mogą przebywać na leczeniu stacjonarnym [24]. Ponadto, także w weterynarii należy dążyć do racjonalizacji antybiotykoterapii. Działania mające na celu przeciwdziałanie narastaniu oporności drobnoustrojów, w tym także gronkowców, na antybiotyki muszą obejmować zarówno obszar medycyny ludzkiej, jak i weterynarii, aby były w pełni skuteczne powinny być postrzegane jako problem globalny [3].

Znaczne kontrowersje związane są ze stosowaniem w weterynarii antybiotyków zaliczonych przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organization, WHO) do krytycznie istotnych dla zdrowia publicznego (Critically Important Antimicrobials, CIA). Obecnie w weterynarii coraz częściej izolowane są drobnoustroje wielolekooporne. Obok wielu Gram-ujemnych pałeczek, są to także odporne szczepy gronkowców. Mechanizm oporności związany z obecnością genu *mecA* najczęściej stwierdzany jest wśród szczepów *S. pseudintermedius* oraz *S. aureus* [29], które na ogół wykazują również wielolekooporność [31]. Wobec braku opcji terapeutycznych lekarze weterynarii mogą zatem sięgać po linezolid lub inne środki przeciwdrobnoustrojowe, zaliczane do antybiotyków krytycznie istotnych dla zdrowia publicznego. Panuje pogląd, że antybiotyki z grupy CIA powinny być zarezerwowane do użycia wyłącznie w medycynie ludzkiej, do leczenia zakażeń wywoływanych przez drobnoustroje wielolekooporne [21]. W Polsce jak dotąd problem ten nie został uregulowany krajowymi rekomendacjami dla lekarzy weterynarii. W racjonalnym stosowaniu antybiotyków oraz przeciwdziałaniu narastaniu oporności istotną rolę odrywają także weterynaryjne laboratoria mikrobiologiczne. W pewnym zakresie mają one wpływ na promowanie środków przeciwdrobnoustrojowych z grupy CIA do leczenia zwierząt, o ile są uwzględniane w badaniu lekowrażliwości. Jednak ostateczna decyzja o ich stosowaniu pozostaje w gestii lekarza weterynarii. Zgodnie z ogólnymi rekomendacjami opracowane przez ekspertów z Międzynarodowego Stowarzyszenia Chorób Zakaźnych Zwierząt Towarzyszących (International Society for Companion Animal Infectious Diseases, ISCAID), wankomycyna, kabapenemy oraz linezolid (zaliczane do CIA) nie powinny być stosowane w weterynarii. W wyjątkowych przypadkach dopuszczalne jest ich użycie, o ile spełnionych zostanie kilka warunków. Należy potwierdzić etiologię zakażenia wynikiem hodowli bakteriologicznej oraz udokumentować brak innych opcji terapeutycznych dla wyizolowanego szczepu. Leki z grupy CIA można stosować u zwierząt jedynie przy realnej szansie na powodzenie leczenia, ponadto zalecana jest konsultacja ze specjalistą w dziedzinie chorób zakaźnych zwierząt oraz antybiotykoterapii, która powinna ocenić zasadność terapii oraz sprecyzować dawkowanie oraz czas trwania leczenia [58]. Krajowe rekomendacje odnośnie racjonalnej antybiotykoterapii u zwierząt towarzyszących człowiekowi opracowane w Danii oraz Szwecji, dotyczące możliwości leczenia zakażeń wywoływanych przez szczepy MRSP również nie zalecają stosowania CIA. Dopuszczalne jest ich użycie jedynie w wyjątkowych okolicznościach i po spełnieniu wymienionych powyżej warunków [5, 50].

Prawne ograniczenia stosowania antybiotyków dotyczą obecnie tylko zwierząt hodowlanych. Zgodnie z roz-

porządzeniem Unii Europejskiej nr 1831/2003 stosowanie antybiotyków jako stymulatorów wzrostu u zwierząt hodowlanych jest zabronione od roku 2006 [43]. Niektóre kraje europejskie wprowadzają dalsze ograniczenia obowiązujące na ich terytoriach. W Danii i Holandii dotyczą one stosowania u zwierząt hodowlanych fluorochinolonów oraz cefalosporyn trzeciej i czwartej generacji. Można przypuszczać, że szereg działań podejmowanych w skali globalnej w celu racjonalnego stosowania antybiotyków doprowadzi w przyszłości do ograniczeń lub zakazu stosowania pewnych klas antybiotyków także u zwierząt towarzyszących człowiekowi.

## 8. Podsumowanie

Weterynaryjne laboratorium diagnostyczne odgrywa kluczową rolę w rozpoznawaniu czynników wywołujących choroby zakaźne. Wprowadzenie nowoczesnych metod diagnostyki opartych na analizie materiału genetycznego lub profilu białek znacznie skraca czas potrzebny do wykrycia bakterii oraz ułatwia prawidłowe rozpoznanie patogenów, co jest szczególnie ważne w przypadku izolatów od zwierząt, których identyfikacja przy użyciu tradycyjnych metod biochemicznych w wielu przypadkach jest trudna lub nawet niemożliwa. Mimo ciągłego rozwoju metod stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej, laboratoria weterynaryjne, na ogół nadal bazują na tradycyjnych metodach hodowlanych stosowanych do identyfikacji izolatów oraz do badania lekowrażliwości.

Obecnie zasadniczym wyzwaniem dla weterynaryjnej diagnostyki mikrobiologicznej jest brak ujednoliconych metod określania lekowrażliwości drobnoustrojów izolowanych od zwierząt oraz brak wartości granicznych specyficznych dla poszczególnych antybiotyków, gatunków drobnoustrojów pochodzących od różnych gatunków zwierząt. Nieodzownym elementem skutecznego zwalczania chorób zakaźnych jest także wdrożenie racjonalnej antybiotykoterapii w lecznicach oraz klinikach weterynaryjnych. Konieczny jest ciągły proces szkoleń podnoszący kwalifikacje personelu zatrudnionego w laboratoriach weterynaryjnych. Zalecenia dotyczące metodyki badań oraz interpretacji wyników, odnoszące się do weterynaryjnej diagnostyki mikrobiologicznej są pilnie potrzebne i w najbliższym czasie prawdopodobnie zostaną opracowane przez Vet-CAST oraz ESGVM.

## Piśmiennictwo

- Adkins P.R.F., Middleton J.R., Calcutt M.J., Stewart G.C., Fox L.K.: Species Identification and Strain Typing of *Staphylococcus agnetis* and *Staphylococcus hyicus* Isolates from Bovine Milk by Use of a Novel Multiplex PCR Assay and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 1778–1788 (2017)
- Al-Rubaye A.A., Couger M.B., Ojha S., Pummill J.F., Koon J.A., Wideman R.F. Jr, Rhoads D.D.: Genome Analysis of *Staphylococcus agnetis*, an Agent of Lameness in Broiler Chickens. *PLoS One*, **25**, e0143336 (2015)
- American Veterinary Medical Association (AVMA): Judicious therapeutic use of antimicrobials, <https://www.avma.org/KB/Policies/Pages/Judicious-Therapeutic-Use-of-Antimicrobials.aspx> (14.02.2018)
- Angeletti S.: Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J. Microbiol. Methods*. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.09.003 (2017)
- Antibiotic Use Guidelines for Companion Animal Practice. [https://www.ddd.dk/sektioner/familiedyr/antibiotikavejledning/Documents/AntibioticGuidelines%20-%20v1.4\\_jun15.pdf](https://www.ddd.dk/sektioner/familiedyr/antibiotikavejledning/Documents/AntibioticGuidelines%20-%20v1.4_jun15.pdf) (27.03.2018)
- Barreiro J.R., Gonçalves J.L., Braga P.A., Dibbern A.G., Eberlin M.N., Veiga Dos Santos M.: Non-culture-based identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* **100**, 2928–2934 (2017)
- Becker K., Heilmann C., Peters G.: Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 870–926 (2014)
- Bemis D.A., Jones R.D., Videla R., Kania S.A.: Evaluation of cefoxitin disk diffusion breakpoint for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* **24**, 964–967 (2012)
- Bond R., Loeffler A.: What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J. Small Anim. Pract.* **53**, 147–54 (2012)
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3<sup>rd</sup> ed. Wayne, PA: CLSI Supplement; VET01S (2015).
- Coates R., Moran J., Horsburgh M.J.: Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiol.* **9**, 75–91 (2014)
- Cornaglia G., Courcol R., Herrmann J.-L., Kahlmeter G., Peigue-Lafeuille H., Vila J.: European Manual of Clinical Microbiology. European Society of Clinical Microbiology and Societe Francaise de Microbiologie, 2012
- Couto N., Monchique C., Belas A., Marques C., Gama L.T., Pomba C.: Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated from companion animals over a 16 year period. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 1479–1487 (2016)
- Damborg P., Moodley A., Aalbæk B., Ventrella G., Dos Santos T.P., Guardabassi L.: High genotypic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine infections in Denmark. *BMC Vet. Res.* **12**: 131. DOI: 10.1186/s12917-016-0756-y (2016)
- Dargatz D.A., Erdman M.M., Harris B.: A survey of methods used for antimicrobial susceptibility testing in veterinary diagnostic laboratories in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* **29**, 669–675 (2017)
- Elbehiry A., Al-Dubaib M., Marzouk E., Osman S., Edrees H.: Performance of MALDI biotyper compared with Vitek™ 2 compact system for fast identification and discrimination of *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis. *Microbiologyopen*, **5**, 1061–1070 (2016)
- El-Bouri K., Johnston S., Rees E., Thomas I., Bome-Manathoko N., Jones C., Reid M., Ben-Ismael B., Davies A.R., Harris L.G., Mack D.: Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications. *Br. J. Biomed. Sci.* **69**, 47–55 (2012)

18. Ellington M.J., Woodford N. i wsp.: The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin. Microbiol. Infect.* **23**, 2–22 (2017)
19. Europejski Komitet ds. Oznaczenia Lekowrażliwości, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST, <http://www.eucast.org> (14.02.2018)
20. Feng Y., Tian W., Lin D., Luo Q., Zhou Y., Yang T., Deng Y., Liu Y.H., Liu J.H.: Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in pets from South China. *Vet. Microbiol.* **160**, 517–524 (2012)
21. Frank L.A., Loeffler A.: Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options. *Vet. Dermatol.* **23**, 283–291 (2012)
22. Gordon N.C., Golubchik T. i wsp.: Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1182–1191 (2014)
23. Guardabassi L., Damborg P., Stamm I., Kopp P.A., Broens E.M., Toutain P.L.: ESCMID Study Group for Veterinary Microbiology. Diagnostic microbiology in veterinary dermatology: present and future. *Vet. Dermatol.* **28**, 146–e30 (2017)
24. Guardabassi L., Prescott J.F.: Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* **45**, 361–376 (2015)
25. Hauschild T., Stepanović S., Zakrzewska-Czerwińska J.: *Staphylococcus stepanovicii* sp. nov., a novel novobiocin-resistant oxidase-positive staphylococcal species isolated from wild small mammals. *Syst. Appl. Microbiol.* **33**, 183–187 (2010)
26. Hryniewicz W., Ozorowski T.: Szpitalna Polityka Antybiotykowa Propozycje dla polskich do szpitali. Narodowy Program Ochrony Antybiotyków, Warszawa 2011, <http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/szpitalna/Szp-polit-antyb-MZ.pdf> (14.02.2018)
27. Huse H.K., Miller S.A., Chandrasekaran S., Hindler J.A., Lawhon S.D., Bemis D.A., Westblade L.F., Humphries R.M.: Evaluation of Oxacillin and Cefoxitin Disk Diffusion and MIC Breakpoints Established by the Clinical and Laboratory Standards Institute for Detection of *mecA*-Mediated Oxacillin Resistance in *Staphylococcus schleiferi*. *J. Clin. Microbiol.* **56**, e01653–17 (2018)
28. Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Carroll K.C., Funke G., Marie Louise Landry M.L., Richter S.S., Warnock D.W.: Manual of Clinical Microbiology. 11th edition. American Society for Microbiology, 2015
29. Kadlec K., Schwarz S.: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet. Dermatol.* **23**, 276–282 (2012)
30. Kizerwetter-Świda M., Chrobak-Chmiel D., Rzewuska M., Antosiewicz A., Dolka B., Ledwoń A., Czujkowska A., Biniek M.: Genetic characterization of coagulase-positive staphylococci isolated from healthy pigeons. *Pol. J. Vet. Sci.* **18**, 627–634 (2015)
31. Kizerwetter-Świda M., Chrobak-Chmiel D., Rzewuska M., Biniek M.: Resistance of canine methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains to pradofloxacin. *J. Vet. Diagn. Invest.* **28**, 514–518 (2016)
32. Kizerwetter-Świda M., Chrobak-Chmiel D., Rzewuska M., Biniek M.: *Staphylococcus pseudintermedius* – trudno rozpoznawalny patogen. *Post. Mikrobiol.* **54**, 103–114 (2015)
33. Kmiecik W., Szewczyk E.M.: Gatunki koagulazododatnie rodzaju *Staphylococcus* – taksonomia, chorobotwórczość *Post. Mikrobiol.* **52**, 233–244 (2017)
34. Lazaris A., Coleman D.C., Kearns A.M., Pichon B., Kinnevey P.M., Earls M.R., Boyle B., O'Connell B., Brennan G.I., Shore A.C.: Novel multiresistance *cfr* plasmids in linezolid-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) from a hospital outbreak: co-location of *cfr* and *optrA* in VRE. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 3252–3257 (2017)
35. Matuschek E., Brown D. F., Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, O255–O256 (2014)
36. Morris D.O., Rook K.A., Shofer F.S., Rankin S.C.: Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–2004). *Vet. Dermatol.* **17**, 332–227 (2006)
37. Nováková D., Pantůček R., Hubálek Z., Falsen E., Busse H.J., Schumann P., Sedláček I.: *Staphylococcus microti* sp. nov., isolated from the common vole (*Microtus arvalis*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 566–573 (2010)
38. Park J.Y., Fox L.K., Seo K.S., McGuire M.A., Park Y.H., Rurangirwa F.R., Sischo W.M., Bohach G.A.: Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. *Vet. Microbiol.* **147**, 142–148 (2011)
39. Poulsen L.L., Thøfner I., Bisgaard M., Olsen R.H., Christensen J.P., Christensen H.: *Staphylococcus agnetis*, a potential pathogen in broiler breeders. *Vet. Microbiol.* **212**, 1–6 (2017)
40. Pulido M.R., García-Quintanilla M., Martín-Peña R., Cisneros J.M., McConnell M.J.: Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2710–2717 (2013)
41. Rhoads D.D., Wang H., Karichu J., Richter S.S.: The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **86**, 257–261 (2016)
42. Riesen A., Perreten V.: *Staphylococcus rostri* sp. nov., a haemolytic bacterium isolated from the noses of healthy pigs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2042–2047 (2010)
43. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 1831/2003 z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.
44. Sader H.S., Jones R.N.: Evaluation of vancomycin and daptomycin potency trends (MIC creep) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in nine U.S. medical centers from 2002 to 2006. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4127–4132 (2009)
45. Sasaki T., Tsubakishita S., Tanaka Y., Sakusabe A., Ohtsuka M., Hirotsuki S., Kawakami T., Fukata T., Hiramatsu K.: Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 765–769 (2010)
46. Savini V., Di Giuseppe N., Fazii P., D'Amario C., D'Antonio D., Carretto E.: *Staphylococcus pseudintermedius* heterogeneously expresses the *mecA* gene. *Vet. Microbiol.* **165**, 489–490 (2013)
47. Savini V., Passeri C., Mancini G., Iuliani O., Marrollo R., Argentieri A.V., Fazii P., D'Antonio D., Carretto E.: Coagulase-positive staphylococci: my pet's two faces. *Res Microbiol.* **164**, 371–374 (2013)
48. Silva M.B., Ferreira F.A., Garcia L.N., Silva-Carvalho M.C., Botelho L.A., Figueiredo A.M., Vieira-da-Motta O.: An evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from canine infections. *J. Vet. Diagn. Invest.* **27**, 231–235 (2015)
49. Supré K., De Vlieghe S., Cleenwerck I., Engelbeen K., Van Trappen S., Piepers S., Sampimon O.C., Zadoks R.N., De Vos P., Haesebrouck F.: *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2739–2744 (2010)
50. Swedish strategy to combat antibiotic resistance. <http://www.government.se/contentassets/168838e186de455>

- ca7fe868bee92d209/swedish-strategy-to-combat-antibiotic-resistance.pdf (27.03.2018)
51. Szczuka E., Makowska N., Kaznowski A.: Molekularne metody identyfikacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. *Post. Mikrobiol.* **52**, 211–218 (2013)
  52. Tagini F., Greub G.: Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* DOI: 10.1007/s10096-017-3024-6 (2017)
  53. Taponen S., Nykäsenoja S., Pohjanvirta T., Pitkälä A., Pyörälä S.: Species distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitic milk. *Acta Vet Scand.* DOI: 10.1186/s13028-016-0193-8 (2016)
  54. Taponen S., Supré K., Piessens V., Van Coillie E., De Vliegher S., Koort J.M.: *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 61–65 (2012)
  55. Tong S.Y., Giffard P.M. i wsp.: Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus*-related complex: the non-pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non-human primate-associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 15–22 (2015)
  56. van Duijkeren E., Törneke K. i wsp.: Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2705–2714 (2011)
  57. Vanderhaeghen W., Piepers S., Leroy F., Van Coillie E., Haesebrouck F., De Vliegher S.: Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. *Vet. J.* **203**, 44–51 (2015)
  58. Weese J.S., Sykes J.E. i wsp.: Antimicrobial use guidelines for treatment of urinary tract disease in dogs and cats: antimicrobial guidelines working group of the international society for companion animal infectious diseases. *Vet. Med. Int.* DOI: 10.4061/2011/263768 (2011)
  59. World Organization of Animal Health (OIE). Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online> (14.02.2018)
  60. Wu M.T., Burnham C.A., Westblade L.F., Dien Bard J., Lawhon S.D., Wallace M.A., Stanley T., Burd E., Hindler J., Humphries R.M.: Evaluation of Oxacillin and Cefoxitin Disk and MIC Breakpoints for Prediction of Methicillin Resistance in Human and Veterinary Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 535–542 (2016)
  61. Yossepowitch O., Dan M., Kutchinsky A., Gottesman T., Schwartz-Harari O.: A cost-saving algorithm for rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* and susceptibility to oxacillin directly from positive blood culture bottles by combined testing with BinaxNOW® *S. aureus* and Xpert MRSA/SA Assay. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.* **78**, 352–355 (2014)

## TASOWANIE GENOMOWE JAKO ALTERNATYWNA METODA ULEPSZANIA WŁAŚCIWOŚCI TECHNOLOGICZNYCH DROŻDZY GORZELNICZYCH

Aleksandra Wawro\*

Zakład Innowacyjnych Biomateriałów i Nanotechnologii,  
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Wpłynęło w maju, zaakceptowano w lipcu 2018 r.

**Streszczenie:** Nowoczesne technologie produkcji bioetanolu wymagają drożdży gorzelniczych charakteryzujących się termotolerancją, osmotolerancją i zwiększonej odporności na metabolity wtórne. Do tej pory nie zaobserwowano w naturze żadnych szczepów łączących wszystkie wyżej wymienione cechy. Od wielu lat prowadzone są intensywne badania nad poprawą właściwości technologicznych szczepów przemysłowych. Opracowano szereg metod umożliwiających genetyczną poprawę drożdży gorzelniczych. Jedną z najbardziej obiecujących i skutecznych metod jest tasowanie genomowe, umożliwiające tworzenie hybryd, których genom jest wynikiem połączenia dużych fragmentów DNA pochodzących ze szczepów o wyraźnych różnych cechach fenotypowych. Tasowanie genomowe stwarza wielką szansę na to, że nowy szczep będzie posiadał cenne geny funkcjonalne, łącznie z ich kompletnymi operonami, co zwiększa szansę na długoterminowe utrzymanie korzystnych cech technologicznych przez uzyskane hybrydy drożdży gorzelniczych.

1. Wstęp. 2. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. 2.1. Genom drożdży. 2.2. Udział drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w procesie produkcji bioetanolu. 3. Kierunki ulepszania genetycznego. 4. Metody ulepszania genetycznego. 5. Tasowanie genomowe. 5.1. Doskonalenie cech drożdży *Saccharomyces cerevisiae* metodą tasowania genomowego. 6. Podsumowanie

### Genome shuffling as an alternative method of improving the properties of distillery yeast

**Abstract:** Modern technologies of bioethanol production require distillation yeast characterized by thermotolerance, osmotolerance and increased resistance to secondary metabolites. To date, no strains have been observed in nature which possess all of the above-mentioned characteristics. For many years, intensive research has been carried out to improve the technological properties of industrial strains. A number of methods have been developed to allow genetic improvement of distillery yeasts. One of the most promising and effective methods is genome shuffling, allowing the creation of hybrids whose genome is a combination of large DNA fragments derived from strains with distinct phenotypic traits. Genome shuffling creates a chance that the new strain will have valuable functional genes, including their full operons. This, in turn, increases the chance of a long-term maintenance of beneficial technological features by the obtained hybrids.

1. Introduction. 2. Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 2.1. Yeast genome. 2.2. Role of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in the bioethanol production. 3. Pathways of genetic improvement. 4. Methods of genetic improvement. 5. Genome shuffling. 5.1. Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains by genome shuffling method. 6. Conclusion

**Słowa kluczowe:** tasowanie genomowe, drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, produkcja bioetanolu

**Key words:** genome shuffling, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, bioethanol production

## 1. Wstęp

Współczesne technologie produkcji bioetanolu oparte są na jednoetapowym procesie fermentacji etanolowej, połączonym z procesem hydrolizy roślinnych polisacharydów (-SSF), który jest dużo wydajniejszy, ze względu na uproszczoną linię technologiczną oraz skrócenie łącznego czasu hydrolizy i fermentacji [31]. Ze względu na to, że w procesie SSF mikroorganizmy i enzymy umieszczane są w jednym bioreaktorze, drożdże gorzelnicze mają możliwość dużo szybszego przekształcania glukozy w etanol, a ciągle usuwanie cukrów z podłoża zmniejsza hamowanie aktywności enzymów [12, 50]. Mimo wielu zalet, technologia SSF posiada wady, związane z różnicami między optymalnymi temperaturami dla działania celulaz i wzrostu komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Optimum

temperaturowe dla enzymów wynosi 50–60°C, podczas gdy zakres temperatur, przy których wzrastają drożdże gorzelnicze mieści się w granicach od 30 do 37°C [6, 11, 42]. Prowadzenie hydrolizy w temperaturach właściwych dla drożdży spowalnia jej przebieg, zmniejszając tempo wytwarzania etanolu [56]. Dla wydajnej konwersji biomasy do etanolu ważne jest, by drożdże *S. cerevisiae* były odporne na pogarszające się warunki środowiska zewnętrznego, w których wzrastają i metabolizują [14, 22, 26]. Podczas produkcji bioetanolu poważną przeszkodą dla drożdży jest stosowanie brzołek fermentacyjnych o wysokiej gęstości, czego konsekwencją jest zwiększone ciśnienie osmotyczne. Inną operacją jednostkową, wykorzystywaną w przemyśle gorzelniczym, jest wysokotemperaturowa obróbka hydrotermiczna, ułatwiająca działanie enzymów celulo-lytycznych i hemicelulo-lytycznych, a przebiegająca czę-

\* Autor korespondencyjny: Aleksandra Wawro, Zakład Innowacyjnych Biomateriałów i Nanotechnologii, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, ul. Wojska Polskiego 71B, 60-630 Poznań; tel. 618455-814; e-mail: aleksandra.wawro@iwnirz.pl

sto w temperaturze powyżej 200°C. W takich warunkach tworzy się wiele różnych toksyn jak kwas octowy, furfural i hydroksyfurfural, które wpływają negatywnie na fizjologię drożdży [22].

Od lat trwają poszukiwania szczepów drożdży o zwiększonej tolerancji na czynniki stresowe. Najtrudniejszym elementem przy konstrukcji takich szczepów jest połączenie w jednym mikroorganizmie jednocześnie kilku korzystnych cech. Dotychczas stosowane metody nie gwarantowały pozyskanie szczepów długotrwale zachowujących pozytywne cechy. W ostatnich latach pojawiły się nowe techniki modyfikacji genetycznej drożdży, umożliwiające uzyskanie szczepów łączącego kilka unikalnych, przydatnych przemysłowo właściwości technologicznych.

## 2. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*

Drożdże to jednokomórkowce, których kształt uzależniony jest od rodzaju drożdży, a także stanu fizjologicznego komórek. Istotne oddziaływanie na ich kształt mają również radykalne warunki środowiskowe. Natomiast wielkość komórek zależy od gatunku, stopnia rozwoju oraz warunków hodowli [8].

Ściana komórkowa drożdży stanowi średnio 10–25% s.s. całej masy komórkowej, udział ten zależy przede wszystkim od warunków wzrostu. Głównymi składnikami ściany komórkowej wszystkich grzybów są polisacharydy i glikoproteiny. W obecności środowiska hipertonicznego komórka zaczyna się bardzo gwałtownie kurczyć i dochodzi wtedy do utraty nawet 60% pierwotnej objętości [24]. Z kolei w środowisku hypoosmotycznym, gdy woda przenika do wnętrza komórki, dochodzi do jej pęcznienia, co może spowodować rozerwanie błony komórkowej i śmierć samej komórki [8, 34]. Drożdże w większości są organizmami mezofilnymi i najlepiej wzrastają w temperaturze 20–28°C, choć są też gatunki psychrofilne (4–15°C) oraz termofilne (powyżej 30°C) [8]. Komórki drożdży rosną prawidłowo w obecności wody, gdyż od wody zależne są przemiany metaboliczne i transport składników odżywczych. Istotne jest także stężenie cukrów i soli rozpuszczonych w wodzie, które w dużej ilości powodują obniżenie aktywności wody ( $a_w$ ). Optymalna aktywność wody odpowiada optymalnemu ciśnieniu osmotycznemu, wtedy szybkość wzrostu i aktywność życiowa drożdży jest największa [8, 29, 43]. *Saccharomyces cerevisiae* klasyfikowane są do drożdży, których optimum temperaturowe mieści się w zakresie 30–35°C, a nieznaczne odchylenia od minimum i maksimum uzależnione są od poszczególnych szczepów [55]. Zbyt wysoka, jak również zbyt niska temperatura powoduje uszkodzenie cytoplazmatycznej błony komórkowej, co w efekcie prowadzi do zaburzenia jej przepuszczalności [44].

### 2.1. Genom drożdży

Genom drożdży *S. cerevisiae* był w historii genetyki pierwszym genomem eukariotycznym, który został zsekwencjonowany w całości. Dokładnie 24 kwietnia 1996 roku, dzięki współpracy 600 naukowców z Europy, Ameryki Północnej i Japonii, oficjalnie przedstawiono jego pełną sekwencję nukleotydową [15, 19, 32]. Grzyby jako najprostsze eukarionty mają genomy mniejsze, ale już kręgowce, mają genomy zdecydowanie większe. Jednakże zależność ta, nie jest do końca jasna, co opisuje tzw. paradoks wartości C (ilość DNA w haploidalnym genomie). W drugiej połowie XX w. przeprowadzono badania, które wykazały, że w genomach organizmów mniej złożonych, są dużo lepiej zagospodarowane przestrzenie, a geny znajdują się bardzo blisko siebie i stąd ich ilość jest większa [2]. Genom drożdży zawiera większą liczbę genów, a wśród nich tylko nieliczne geny są nieciągłe (poprzerywane odcinkami niekodującymi), posiada także niewiele powtarzających się sekwencji rozproszonych w genomie. Według doniesień naukowych prawie 23% genomu drożdży jest niemal identyczne jak genomu ludzkiego [9].

Plastyczność genomu drożdży jest bardzo ważnym warunkiem wpływającym na dynamiczną adaptację do zmian środowiskowych. Geny, a nawet całe operony, są przenoszone jako mobilne jednostki genetyczne przez wewnątrzkomórkowe i międzykomórkowe transfery. Następnie geny lub też operony ulegają rozległym procesom rekombinacji. W przypadku organizmów eukariotycznych powtarzające się sekwencje odgrywają jeszcze istotniejszą rolę. W genomie eukariotycznym aż 50% stanowią elementy ruchome, które mogą działać jako rekombinacyjne „hot-spots” (tzw. gorące miejsca, bardzo podatne na mutacje), do których sekwencje chętniej się przyłączają [38]. Dzięki temu możliwe jest zapewnienie skuteczności opisywanej w tym artykule metody tasowania genomowego.

### 2.2. Udział drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w procesie produkcji bioetanolu

Fermentacja glukozy do etanolu i dwutlenku węgla przez drożdże odbywa się na szlaku fruktozobisfosforanowym, w którym metabolizowana jest jedna cząsteczka glukozy, powstają dwie cząsteczki pirogronianu, przekształcane w następnym etapie do aldehydu octowego, ulegającego redukcji do etanolu. Dochodzi także do wydzielania ditlenku węgla. Powstające w wyniku glikolizy dwa mole ATP są wykorzystywane do procesów biosyntezy składników komórek drożdży, która obejmuje szereg bioreakcji wymagających energii [16, 44]. Stąd też, produkcja etanolu jest w istotny sposób połączona ze wzrostem komórek drożdży. Bez ciągłego wykorzystania cząsteczek ATP przez drożdże do

ich wzrostu, glikoliza zostaje natychmiast zatrzymana, ponieważ kumulacja wewnątrzkomórkowa cząsteczek ATP powoduje hamowanie działania fosfofruktokinazy (PFK), jednego z najważniejszych enzymów regulacyjnych procesu glikolizy [3].

Maksymalne stężenie etanolu jest zależne od odporności drożdży na powstały produkt, a wraz ze wzrostem stężenia etanolu szybkość fermentacji zawsze ulega znaczącemu spowolnieniu. Toksyczne działanie etanolu wpływa na procesy metaboliczne, a jego najsilniejsze działanie przypada na etap rozmnażania komórek drożdży. Odporność drożdży na etanol zależy przede wszystkim od składu chemicznego ich błony cytoplazmatycznej, co z kolei wynika z obecności lub braku tlenu w środowisku [10, 23].

Głównymi cechami drożdży gorzelniczych *S. cerevisiae* jest zdolność do przeprowadzenia szybkiej i dynamicznej fermentacji etanolowej, a także odporność na 10–15% stężenia etanolu oraz wysoka zdolność fermentowania cukrów z grupy heksoz (glukoza, maltoza, sacharoza, galaktoza). Drożdże najefektywniej fermentują w temperaturze 30–33°C przy stosunkowo niskim pH. Są odporne na działanie takich kwasów organicznych, jak kwas winowy, jabłkowy czy cytrynowy i innych kwasów nietlotnych. Natomiast kwasy lotne, takie jak octowy, są dla drożdży toksyczne [13, 27, 30, 39].

### 3. Kierunki ulepszania genetycznego

Istnieje bardzo wiele czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych środowiska zewnętrznego, które w istotny sposób wpływają na wzrost i metabolizm komórek drożdży *S. cerevisiae* [22, 47]. Do najważniejszych zmian środowiskowych, nazywanych często stresami środowiskowymi, które determinują działanie mikroorganizmów podczas procesu fermentacji etanolowej należą: podwyższenie temperatury procesu, związane z zastosowaniem technologii SSF (stres temperaturowy), zwiększenie ciśnienia osmotycznego, ze względu na wysoki poziom cukru (stres osmotyczny), zwiększenie stężenia etanolu, co jeszcze bardziej pogłębia stres osmotyczny i powoduje hamowanie wzrostu drożdży, zwiększenie stężenia toksycznych związków chemicznych, takich jak: furfural, hydroksyfurfural oraz kwas octowy, zwiększenie toksyczności powstającej w wyniku peroksydacji lipidów oraz produkcji rodników nadtlenkowych i związków aldehydowych (stres oksydacyjny) a także stres mechaniczny, wynikający z działania urządzeń stosowanych podczas procesu fermentacji, prowadzący do uszkodzeń komórek drożdży [22]. Względna odporność *S. cerevisiae* na pojawiające się stresy środowiskowe, jest powodem najczęstszego wyboru tego gatunku mikroorganizmów do procesów

fermentacyjnych [37]. Jednakże, konieczne jest poznanie mechanizmów odpowiedzi komórek drożdży gorzelniczych na stresy środowiskowe oraz podejmowanie próby maksymalnego zredukowania negatywnych skutków, co bezpośrednio łączy się z usprawnieniem przebiegu procesu produkcji bioetanolu.

Drożdże gorzelnicze wykazują dużą zdolność do rozkładu glukozy i w konsekwencji do wytwarzania bioetanolu, zarówno w przypadku surowców skrobiowych, jak i lignocelulozowych. Istotny problem stanowi jednak brak zdolności do biosyntezy enzymów niezbędnych do przekształcania polisacharydów. W przypadku polimerów skrobiowych bardzo ważne są enzymy amylolityczne, natomiast do hydrolizy biomasy lignocelulozowej kluczowe jest działanie enzymów celulolitycznych i hemicelulolitycznych. Obecnie szeroką perspektywę stanowią rekombinanty drożdży *S. cerevisiae*, które dzięki swoim nowo nabytym właściwościom, w sposób bezpośredni przekształcają skrobię i celulozę do glukozy [25, 60].

Drożdże gorzelnicze *S. cerevisiae* stosowane w procesie fermentacji etanolowej nie są zdolne do fermentacji pentoz [52]. Nie posiadają także wystarczającej aktywności celulolitycznej, hemicelulolitycznej i amylolitycznej [55]. Pierwsze próby opracowania metod inżynierii metabolizmu cukrów prostych u drożdży zostały podjęte w latach 70. dwudziestego wieku [17]. Zasadniczym celem jest wytworzenie zdolności szczepów produkujących etanol do rozkładu pentoz. Jednym z głównych kierunków w tym zakresie, jest metoda polegająca na wprowadzeniu do komórek drożdży genów metabolizmu ksylozy i arabinozy z innych organizmów. Pomimo tego, że drożdże *S. cerevisiae* nie mają zdolności metabolizmu ksylozy, to na podłożu z ksyłulozą w warunkach ograniczonego natleniania wytwarzają nieznaczne ilości etanolu. Ksyłuloza jest poddawana reakcjom utleniania i redukcji, a przedtem jest fosforylowana przez ksyłulokinazę (XKS1) do ksyłulozo-5-fosforanu. W następstwie, podczas reakcji szlaku pentozo-fosforanowego zostaje przekształcona do intermediatów glikolizy, co w ostateczności może prowadzić do wyprodukowania etanolu [40, 51].

### 4. Metody ulepszania genetycznego

W ostatnich kilkudziesięciu latach najczęściej stosowanymi metodami ulepszania genetycznego szczepów były metody klasyczne, jak mutagenizacja i fuzja protoplastów, a także metody inżynierii genetycznej wykorzystujące technologie rekombinacji DNA *in vitro* – klonowanie genów [18, 33, 58]. Klasyczne metody doskonalenia drobnoustrojów są znane od początku istnienia przemysłu biotechnologicznego, a jednak ich zakres możliwości modyfikacyjnych jest ograniczony.



Z kolei inżynieria genetyczna stwarza dużo większą szansę na uzyskanie szczepów o nowych właściwościach [36]. Odpowiedź komórek *S. cerevisiae* na stresy środowiskowe jest kontrolowana przez system wielogenowy, który rozmieszczony jest w genomie drożdży w wielu loci. Wiele z tych genów nie jest dostatecznie scharakteryzowana fenotypowo i mało jest danych na temat ich organizacji, stąd klasyczne metody inżynierii genetycznej są mało przydatne podczas oddziaływania na tolerancję komórkową. Dlatego też istotnym narzędziem doskonalenia przemysłowych szczepów mikroorganizmów stała się inżynieria kombinatoryczna i należąca do niej metoda tasowania genomowego. Technika ta pozwala na ukierunkowaną ewolucję całych organizmów poprzez rekurencyjne rekombinacje na poziomie genomu [7].

Wraz z rozwojem technik inżynierii biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej, coraz prostsze jest bezpośrednio wprowadzanie zmian do materiału genetycznego, a ocena efektów tych zmian nabiera znaczenia. Analizą efektów zmian genetycznych posługuje się inżynieria metaboliczna [18]. Została opisana jako „ukierunkowana poprawa tworzenia produktów lub właściwości komórkowych poprzez modyfikacje specyficznych reakcji biochemicznych lub wprowadzenie nowych, z wykorzystaniem technologii rekombinacji DNA” [49]. Inżynieria metaboliczna uwzględnia całe systemy komórkowe oraz wszelkie manipulacje genetyczne zmieniające ogólną wydajność bioprocessów, co odróżnia ją od prostych metod inżynierii genetycznej [5]. Inżynieria metaboliczna jest interdyscyplinarną dziedziną, która wykorzystuje zasady inżynierii reakcji chemicznych, informatyki, biochemii i biologii molekularnej w celu modyfikacji szlaków metabolicznych i uzyskania maksymalnego strumienia wybranego metabolitu [28]. Zastosowanie inżynierii metabolicznej dla poprawy fenotypów wynika z pojawienia się bardziej wszechstronnych narzędzi genetycznych, a także ze wzbogaconej wiedzy o komórce mikroorganizmów. Mimo niezwykłych rezultatów, jakie zostały osiągnięte poprzez zastosowanie inżynierii metabolicznej, braki dotyczące szczegółowej wiedzy na temat relacji genotyp-fenotyp ograniczają wykorzystywanie tej metody [21]. Za to coraz częściej pojawiają się doniesienia naukowe sugerujące łączenie inżynierii metabolicznej z tasowaniem genomowym. Podejście tasowania genomowego ma potencjał do ułatwienia działań inżynierii metabolicznej i stanowi jej alternatywę, prowadząc do szybkiego uzyskania pożądanego fenotypu i generowania ulepszonych szczepów przemysłowych [21, 48, 53]. Technika ta może być zintegrowana z inżynierią metaboliczną w celu promowania zdolności ewolucyjnych złożonego fenotypu. Metody, takie jak tasowanie genomowe powinny być włączone jako integralne części narzędzi nowoczesnej inżynierii metabolicznej [21].

## 5. Tasowanie genomowe

Tasowanie genomowe (genome shuffling) należy do narzędzi inżynierii kombinatorycznej. Po raz pierwszy metoda ta została zaprezentowana w 2002 roku przez zespół Willema P.C. Stemmera. Badacze ci, koncentrowali się przede wszystkim na poprawie szczepów poprzez tasowanie DNA oraz ewolucję ukierunkowaną. Technika tasowania DNA to metoda *in vitro* homologicznej rekombinacji puli wybranych genów zmutowanych przez losową fragmentację i ponowną łańcuchową reakcję polimerazy. Dzięki tasowaniu DNA, udało się uzyskać ukierunkowaną ewolucję kilku genów, dlatego też jako podobną strategię zaproponowano właśnie tasowanie genomowe [21]. Proces ten łączy w sobie zaletę krzyżowania wielu rodziców, umożliwionego przez tasowanie DNA, a także rekombinacji całych genomów, związanej z konwencjonalnymi hodowlami lub też fuzją protoplastów [1]. Dzięki tasowaniu możliwa jest jednoczesna zmiana genetyczna w różnych pozycjach całego genomu, oparta na plastyczności genomu, bez konieczności zdobywania danych na temat jego sekwencji [21, 38]. Ze względu na jednoczesne zmiany w różnych pozycjach genomu, tasowanie umożliwia zgromadzenie pozytywnych mutacji oraz eliminację tych zbędnych, a zatem daje możliwość pozyskania mikroorganizmów najlepiej dopasowanych do wybranych warunków hodowli [54].

Tasowanie genomowe bazuje na wytwarzaniu genetycznej oraz fenotypowej różnorodności w populacji w następstwie badań przesiewowych oraz selekcji ulepszonych fenotypów [21]. Podczas gdy klasyczne metody ulepszania mikroorganizmów pomagają jedynie wybrać mutanty do następnych rund, tasowanie genomowe wykorzystuje znacznie większą proporcję różnorodności obecnej w danej populacji [48]. Dotychczas stosowane metody ulepszania mikroorganizmów nie gwarantowały pozyskania szczepów, które długotrwale zachowywałyby pożądaną cechę. Tasowanie pozwala na łączenie całych genomów, co stwarza szansę na to, że nowy szczep będzie posiadał cenne geny funkcjonalne łącznie z ich kompletnymi operonami, zawierającymi obok genów funkcjonalnych także geny regulujące ich ekspresję. Daje to możliwość długotrwałego utrzymania pożądanego fenotypu przez powstałe hybrydy. Naukowcy z grupy W.C.P. Stemmera, dokonali porównania efektów ulepszania szczepów dokonywanych metodami klasycznymi i metodą tasowania genomowego. Autorzy stwierdzili, że 20 rund klasycznych metod poprawy szczepu, przy wykorzystaniu ok. miliona testów, wykonywanych przez okres 20 lat, pozwoliło na uzyskanie 6-krotnie większej produkcji naturalnych wtórnych metabolitów przez szczepy. Natomiast w przypadku tasowania, już dwie rundy były wystarczające do osiągnięcia podobnych

wyników, w ciągu jednego roku i przy użyciu tylko 24 tys. testów [61].

Technika tasowania jest szczególnie odpowiednia dla poprawy wielu cech fenotypowych, które są trudne do zmodyfikowania poprzez metody tradycyjne, ze względu na brak informacji na temat zestawu genów, które muszą zostać zmodyfikowane, by móc wywołać korzystny wpływ zmian [4]. W porównaniu z innymi technikami inżynierii genetycznej, tasowanie genomowe jest dużo wygodniejsze i łatwiejsze do realizowania. Zastosowanie tej metody nie wymaga drogich urządzeń i materiałów, stąd też jej koszt nie jest wysoki. Ponadto, z uwagi na relatywnie prostą i precyzyjną możliwość wykonania, tasowanie może być upowszechnione w wielu laboratoriach badawczych [21].

Tasowanie genomowe to technika oparta na fuzji protoplastów stosowanej do modyfikacji cech fenotypowych już od późnych lat 70. dwudziestego wieku. Protoplasty pochodzące z różnych szczepów z sukcesem są łączone, co wskazuje na bardzo szerokie zastosowanie techniki w inżynierii komórki [21, 38]. Pomimo tego, że metoda tasowania genomowego pochodzi od fuzji protoplastów, to w istotny sposób różni się od niej. Jak już wspomniano, konwencjonalna fuzja odbywa się pomiędzy dwiema komórkami o różnych cechach genetycznych i w konsekwencji można uzyskać silne rekombinanty z cechami pochodzącym od obu rodziców. Efekt rekombinacji wynika z połączenia tylko dwojga rodziców z jednego pokolenia. Tasowanie genomowe umożliwia kombinację pomiędzy wieloma rodzicami z każdego pokolenia, a także kilka powtarzających się rund fuzji genomu. Możliwe jest także łączenie genomów pochodzących od organizmów należących do odległych grup taksonomicznych i przyłączenie do genomu danej komórki fragmentów wyizolowanego DNA. Takie podejście zdecydowanie zwiększa różnorodność genetyczną potomstwa i znacząco podwyższa szansę na uzyskanie wysokiej wydajności szczepu.

Efektywność tasowania genomowego jest wyższa niż konwencjonalnych metod, takich jak mutagenizacja czy fuzja protoplastów, gdyż technika ta przyspiesza proces poprawy właściwości szczepów poprzez rekursywną fuzję protoplastów pomiędzy szczepami wielu rodziców. Jeżeli zaangażowana jest większa liczba szczepów rodzicielskich, wtedy można uzyskać proporcjonalnie więcej hybryd. Konieczne jest wskazanie, że kluczową zaletą tasowania jest wzmocnienie różnorodności genetycznej populacji potomstwa. Ważny jest też fakt, że metoda tasowania genomowego nie ogranicza się tylko do mikroorganizmów, które mają „klarowne” podłoże genetyczne. Mimo że, konwencjonalna technologia rekombinacji genu pozwala na kombinacje między wieloma rodzicami, to odnosi się tylko do fragmentów DNA, a nie do całych genomów. Wprawdzie fenotyp komórkowy jest przejawem globalnego poziomu eks-

presji genu, zapotrzebowania metabolicznego czy stresów komórki, to jednak profil komórkowy zależy od ekspresji dużej liczby genów, które są słabo poznane i bardzo szeroko rozmieszczone w genomie. Tasowanie jako strategia inżynierii całych genomów, mająca możliwości wykorzystywania mikroorganizmów bez znajomości podłoża genetycznego, jest dużo bardziej skuteczna [21, 41]. Biorąc pod uwagę, że tasowanie genomowe opiera się na naturalnej rekombinacji homologicznej, otrzymana zmutowana populacja, nie jest uważana za organizmy zmodyfikowane genetycznie. Ulepszone tą metodą szczepy mogą być stosowane m.in. do produkcji bioetanolu [21, 38, 46, 59].

Biblioteka szczepów rodzicielskich jest konstruowana na bazie skriningu szczepów wyjściowych (dzikich) lub mutantów w oparciu o różnice fenotypowe. Tworzenie biblioteki ma też na celu generowanie większej liczby genotypów. Pożądane szczepy w kolejnym etapie ulegają rekursywnej fuzji protoplastów. Główną ideą selekcji szczepów rodzicielskich jest właśnie wytworzenie różnorodności fenotypowej oraz genotypowej. Brak doboru odpowiedniej selekcji powoduje, że nie zostaje uzyskany pożądany fenotyp. Do pierwszego etapu tasowania powinny być stosowane zarówno szczepy dzikie z wysoką wydajnością, jak i populacje o zwiększonej różnorodności. Konstrukcja biblioteki szczepów rodzicielskich bazuje na klasycznym podejściu, takim jak mutagenizacja, która jest wiodącą metodą aktywowania zróżnicowanej populacji [21]. W tym procesie szczep dziki poddawany jest jednej lub kilku rundom mutagenizacji, przy udziale mutagenu. Tasowanie genomowe wykorzystuje różnorodność wśród populacji już istniejących i pozwala na tzw. krzyżowanie wsteczne (potomka z rodzicem), aby wyeliminować nieistotne lub szkodliwe zmiany genów, które mogą gromadzić się w trakcie przebiegu losowej mutagenizacji [41]. Selekcja szczepów rodzicielskich jest skoncentrowana na docelowym fenotypie, takim jak produktywność metabolitów czy odporność na czynniki środowiska zewnętrznego. Często zdarza się, że szczepy o zwiększonej produktywności czy większej tolerancji na warunki środowiska, charakteryzują się osłabionym wzrostem [21]. Następnym etapem tasowania genomowego jest fuzja protoplastów, która umożliwia homologiczną rekombinację genomów [41]. Konwencjonalna fuzja protoplastów jest bardzo efektywną metodą, powodującą wysoką częstotliwość transferu genu i wydajność rekombinacji. Jednak odnosi się to tylko do sytuacji, gdy mamy dwoje rodziców, bo gdy fuzja odbywa się między wieloma rodzicami, jej wydajność jest niska. Problem ten rozwiązuje tasowanie genomowe zawierające metodę rekursywnej fuzji protoplastów pomiędzy wieloma różnymi szczepami rodzicielskimi w każdym pokoleniu, która zapewnia wymianę informacji w obrębie populacji. Już po dwóch

rundach fuzji można uzyskać szczep charakteryzujący się kilkoma ulepszonymi cechami fenotypowymi [21]. Wysoka wydajność rekurencyjnej fuzji protoplastów jest istotą sukcesu tasowania genomowego [57]. Ostatnim etapem tasowania genomowego jest wybór pożądanego fenotypu z wykorzystaniem metody skryningu. Jest to jeden z ważniejszych kroków całej procedury tasowania. Klasyczne metody skryningu bazują na charakterystyce fizykochemicznej i biochemicznej, a także na markerach genetycznych [11]. Coraz bardziej ekspansywny jest także rozwój wysokowydajnej procedury skryningu dla zwiększenia sukcesu uzyskania ulepszanego fenotypu. Decydujące zmiany w procedurze badań przesiewowych, a także technologie analityczne takie jak HPLC czy spektroskopia mas, dają szansę na przetestowanie obszernych bibliotek szczepów i sukces w izolacji połączonych fenotypów [21].

### 5.1. Doskonalenie cech drożdży *Saccharomyces cerevisiae* metodą tasowania genomowego

Doniesienia naukowe wskazują na poprawę cech fenotypowych szczepów drożdży gorzelnicznych *S. cerevisiae*, uzyskanych metodą tasowania genomowego. W swoich publikacjach wielu naukowców opisuje, że już po dwóch rundach tasowania udało im się pozyskać szczepy z pożądanymi właściwościami technologicznymi. Steensels i wsp. zoobserwowali, że metoda tasowania genomowego jest bardzo szybka, z uwagi na to, że dwie rundy pozwalają na uzyskanie efektu, którego osiągnięcie jeszcze kilka lat temu, wymagało co najmniej dwóch dekad badań i ogromnego nakładu finansowego [48]. Zheng i wsp. po dwóch rundach tasowania genomowego pozyskali szczep drożdży *S. cerevisiae* odznaczający się o 21,6% większą aktywnością fermentacyjną. Wykazali, że w jednym ulepszonym szczepie znajduje się kilka połączonych technologicznie cech, w tym odporność na obecność toksycznego metabolitu jakim jest kwas octowy [62]. Gong i wsp. po przeprowadzeniu tasowania genomowego, wyizolowali ponad 200 ulepszonych szczepów *S. cerevisiae*, które po wstępnej selekcji ograniczyli do 21 szczepów, produkujących większą ilość etanolu niż szczepy rodzicielskie, a spośród nich wybrali dwa wykazały termotolerancję w temp. 43°C [20]. Podobne prace badawcze prowadził Orosco i wsp. Autorzy Ci zastosowali tasowanie genomowe, aby zwiększyć odporności drożdży *S. cerevisiae* na podwyższoną temperaturę i zawartość etanolu. Po przeprowadzeniu kilku rund tasowania, uzyskali szczep, który w temp. 42°C i przy 18% stężeniu etanolu charakteryzował się o ponad 10% wyższą aktywnością fermentacyjną niż przemysłowy szczep wyjściowy [35]. Z kolei Shi i współ. wykonali trzy rundy tasowania i otrzymali bardzo cenny szczep drożdży *S. cerevisiae*, który potrafił w temp. 45°C i przy

20% stężeniu etanolu wyprodukować 10% (w/v) etanolu [45]. Jak dowodzą przytoczone powyżej wyniki badań, możliwe jest uzyskanie nowych hybryd drożdży gorzelnicznych, posiadających istotne z punktu widzenia przemysłu gorzelniczego cechy. Jednakże do osiągnięcia pełnego sukcesu tej metody, konieczna jest weryfikacja cech użytkowych nowego, ulepszanego szczepu drożdży, wymagająca podjęcia badań nad stabilnością zarówno fenotypu jak i genotypu.

## 6. Podsumowanie

Tasowanie genomowe to jedna z nowych technik, która wykorzystuje już istniejącą różnorodność w znacznie większym stopniu. Coraz szersze są zatem perspektywy uzyskania połączonych szczepów drożdży gorzelnicznych o zwiększonej odporności na stresy środowiskowe. Istotne jest także to, że większość metod ulepszania właściwości szczepu nie wyklucza się wzajemnie, lecz można je łączyć, żeby stworzyć jeszcze większe zmienności, a także zminimalizować wady poszczególnych technik. Można to zaobserwować choćby przy połączeniu losowej mutagenizacji z wielokrotnymi rundami tasowania genomowego, co jest bardzo przyszłościowym rozwiązaniem, w odniesieniu do rekombinacji zarówno oczekiwanych mutacji, jak i do zlikwidowania szkodliwych mutacji. Tasowanie genomowe to technika szybka, wygodna i ma ogromny potencjał pozyskiwania połączonych cech fenotypowych. Stąd też, metoda ta znajduje coraz to szersze zastosowanie w innowacyjnych badaniach nad cechami technologicznymi drożdży *S. cerevisiae* stosowanych w produkcji bioetanolu.

## Piśmiennictwo

1. Adrio J.L., Demain A.L.: Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 187–214 (2006)
2. Babik W.: Ewolucja genomów i powstawanie nowych genów. *Kosmos, Problemy Nauk Biologicznych*, **58**, 385–393 (2009)
3. Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young A.: Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* **26**, 89–105 (2008)
4. Bajwa P.K., Pinel D., Martin V.J.J., Trevors J.T., Lee H.: Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling. *J. Microbiol. Methods*. **81**, 179–186 (2010)
5. Bekker V., Dodd A., Brady D., Rumbold K.: Tools for metabolic engineering in *Streptomyces*. *Bioengineered*. **5**, 293–299 (2014)
6. Białas W., Wojciechowska D., Szymanowska D., Grajek W.: Optymalizacja procesu jednoczesnej hydrolizy i fermentacji natywnej skrobi metodą powierzchni odpowiedzi. *Biotechnologia*, **4**, 183–199 (2009)
7. Biot-Pelletier D., Martin V.J.J.: Evolutionary engineering by genome shuffling. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3877–3887 (2014)

8. Bonin S.: Tradycyjne metody modyfikacji drożdży (w) Zastosowanie wybranych drobnoustrojów w biotechnologii żywności, red. M. Gniewosz, E. Lipińska, Wydawnictwo SGGW (wyd. 1), Warszawa, 2013, s. 282–301
9. Brown T.A.: Genomy. PWN Wyd. Naukowe, Warszawa, 2001, s. 472
10. Chmiel A.: Biotechnologia podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. Wyd. Naukowe PWN (wyd. 2), Warszawa, 1994, s. 364
11. Choudhary J., Singh S., Nain L.: Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Biotechnol.* **21**, 82–92 (2016)
12. Costa D.A., de Souza C.J.A., Costa P.S., Rodrigues M.Q.R.B., dos Santos A.F., Lopes M.R., Genier H.L.A., Silveira W.B., Fietto L.G. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 3829–3840 (2014)
13. Demain i Báez-Vásquez Demain A.L., Báez-Vásquez M.A.: Biofuels of the Present and the Future (w) New and Future Developments in Catalysis: Catalytic Biomass Conversion, red. S.L. Suib, Elsevier, 2013, s. 325–370
14. Edgardo A., Parra C., Rodriguez M., Jaime B.: Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme Microb. Technol.* **43**, 120–123 (2008)
15. Engel S.R., Cherry J.M. wsp.: The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. *G3-Genes Genom. Genet.* **4**, 389–398 (2014)
16. Evans G.G., Furlong J.: Environmental Biotechnology: Theory and Application. John Wiley & Sons (wyd. 2), 2011, s. 11–48
17. Fernandes i Murray Fernandes S., Murray P.: Metabolic engineering for improved microbial pentose fermentation. *Bioeng Bugs.* **1**, 424–428 (2010)
18. Fiedurek J.: Biologiczne podstawy procesów mikrobiologicznych (w) Podstawy biotechnologii przemysłowej, red. W. Bednarski, J. Fiedurek, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 23007, s. 57–85
19. Goffeau A., Oliver S.G. i wsp.: Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 563–567 (1996)
20. Gong G., Ma L., Chen X.: Isolation and improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for producing the distilled liquor. *J. Chem. Pharm. Res.* **6**, 283–288 (2014)
21. Gong J., Zheng H., Wu Z., Chen T., Zhao X.: Genome shuffling: Progress and applications for phenotype improvement. *Biotechnol. Adv.* **27**, 996–1005 (2009)
22. Grajek W., Szymanowska D.: Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji etanolowej. *Biotechnologia*, **3**, 46–63 (2008)
23. Henderson C.M., Block D.E.: Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2966–2972 (2014)
24. Klis F.M., Boorsma A., De Groot P.W.J.: Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **23**, 185–202 (2006)
25. Kroumov A.D., Modenes A.N., de Araujo Tait M.C.: Development of new unstructured model for simultaneous saccharification and fermentation of starch to ethanol by recombinant strain. *Biochem. Eng. Journal.* **28**, 243–255 (2006)
26. Kumari R., Pramanik K.: Improvement of multiple stress tolerance in yeast strain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production. *Biosci. Bioeng.* **114**, 622–629 (2012)
27. Kunicka A., Rajkowska K.: Charakterystyka mikroorganizmów. Drożdże (w) Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania (tom I), red. Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2010, s. 353
28. Ledakowicz S.: Od inżynierii metabolicznej przez biologię systemów do inżynierii biologicznej. *Inż. Ap. Chem.* **48**, 17–20 (2009)
29. Levin D.E.: Regulation of Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*. **189**, 1145–1175 (2011)
30. Lipińska E. Drożdże gorzelnicze i biosynteza etanolu (w) Zastosowanie wybranych drobnoustrojów w biotechnologii żywności, red. M. Gniewosz, E. Lipińska, Wydawnictwo SGGW (wyd. 1), Warszawa, 2013, s. 155–166
31. Liu Z.-H., Qin L., Zhu J.-Q., Li B.-Z. and Yuan Y.-J.: Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. *Biotechnol. Biofuels.* **7**, 167 (2014)
32. Mackiewicz P., Zakrzewska-Czerwińska J., Cebrat S.: Genomika – dziedzina wiedzy XXI wieku. *Biotechnologia*, **3**, 7–21 (2005)
33. Nicholl Nicholl D.S.T.: An introduction to genetic engineering, Cambridge University Press (wyd. 3), s. 327 (2008)
34. Orlean P.: Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Wall Genetics*. **192**, 775–818 (2012)
35. Oroscio F.L., Estrada S.M., Simbahan J.F., Alcantara V.A., Pajares I.G.: Genome shuffling for improved thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* 2013. *Philippine Science Letters*, **10**, 22–28 (2017)
36. Parekh i in. Parekh S., Vinci V.A., Strobel R.J.: Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 287–301 (2000)
37. Pereira F.B., Romania A., Ruiz H.A., Teixeira J.A., Domingues L.: Industrial robust yeast isolates with great potential for fermentation of lignocellulosic biomass. *Biores. Technol.* **161**, 192–199 (2014)
38. Petri R., Schmidt-Dannert C.: Dealing with complexity: evolutionary engineering and genome shuffling. *Curr. Opinion Biotechnol.* **15**, 298–304 (2004)
39. Podgórska I., Solarz E.: Wykorzystanie drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w zabezpieczaniu procesów fermentacyjnych. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, **3**, doi:10.15199/64.2016.3.6 (2016)
40. Richard P., Verho R., Putkonen M., Londesborough J., Penttilä M.: Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway. *FEMS Yeast Res.* **3**, 185–189 (2003)
41. Rubin-Pitel S.B., Chao C.M.-H., Chen W., Zhao H.: Directed Evolution Tools in Bioproduct and Bioprocess Development (w) Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, red. Yang S.-T., Elsevier, 2007, s. 49–72
42. Ruiz H.A., Silva D.P., Ruzene D.S., Lima L.F., Vicente A.A., Teixeira J.A.: Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain – Effect of process conditions. *Fuel*, **95**, 528–536 (2012)
43. Satyanarayana T., Kunze G.: Yeast biotechnology: diversity and applications, Springer Netherlands, 2009
44. Schlegel H.G.: Mikrobiologia ogólna, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2003
45. Shi D.J., Wang C.L., Wang K.M.: Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 139–47 (2009)
46. Snoek T., Picca Nicolino M., Van den Bremt S., Mertens S., Saels V., Verplaetse A., Steensels J., Verstrepen K.J.: Large-scale robot-assisted genome shuffling yields industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with increased ethanol tolerance. *Biotechnol. Biofuels.* **26**, 8–32 (2015)
47. Spencer J., Phister T.G., Smart K.A., Greetham D.: Tolerance of pentose utilising yeast to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *BMC Research Notes*, **7**, 151 (2014)

48. Steenles J., Snoek T., Meersman E., Picca Nicolino M., Voordeckers K., Verstrepen K.J.: Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 47–995 (2014)
49. Stephanopoulos G.N., Aristidou A.A., Nielsen J.: *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*, San Diego, Academic Press, 1998, s. 725
50. Strąk E., Balcerek M.: Wybrane technologie wykorzystywane w przemyśle gorzelniczym, *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* **14**, 33–44 (2015)
51. Sybirny i in. Sybirny W., Puchalski Cz., Sybirny A.: Metaboliczna inżynieria drobnoustrojów do konstruowania wydajnych producentów bioetanolu z lignocelulozy. *Biotechnologia*, **4**, 38–54 (2007)
52. Świątek M., Lewandowska M., Bednarski W.: Doskonalenie procesów biotechnologicznych stosowanych w produkcji etanolu II generacji z surowców lignocelulozowych. *Postępy Nauk Rolniczych*, **1**, 121–131 (2011)
53. Tao i in. Tao X., Zheng D., Liu T., Wang P., Zhao W., Zhu M., Jiang X., Zhao Y., Wu X.: A Novel strategy to construct yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity fermentation. *Plos One*, **7**, 1–10 (2012)
54. Walczak P., Kunicka A., Kręgiel D., Drewicz E.: Ulepszanie i przechowywanie mikroorganizmów (w) *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*, red. Z. Libudzisz, K. Kowal, Z. Żakowska (tom I), Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2010, s. 353
55. Wallace V.: Improving stress tolerance in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic biomass department of chemistry, Lund University, praca doktorska, 2014
56. Wallace-Salinas V., Gorwa-Grauslund M.F.: Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnol. Biofuels.* **6**, 151 (2013)
57. Wang M., Zhang W., Xu W., Shen Y., Du L.: Optimization of genome shuffling for high-yield production of the antitumor deacetylmycoepoxydiene in an endophytic fungus of mangrove plants. *Microbiol. Biotechnol. Appl.* 1–8 (2016)
58. Węgleński P., Golik P.: Inżyniera genetyczna (w) *Genetyka molekularna*, red. P. Węgleński. Wydawnictwo PWN, Warszawa, 2008, s. 109–134
59. Yamada R., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A.: Novel strategy for yeast construction using delta-integration and cell fusion to efficiently produce ethanol from raw starch. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1491–1498 (2010)
60. Yamada R., Taniguchi N., Tanaka T., Ogino Ch. Fukuda H., Kondo A.: Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression. *Biotechnol. Biofuels.* **4**, doi: 10.1186/1754-6834-4-8 (2011)
61. Zhang Y.X., Perry K. Vinci V.A., Powell K., Stemmer W.P.C., del Cardayre S.B.: Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*, **415**, 644–646 (2002)
62. Zheng D.Q., Wu X.Ch., Wang P-M., Chi X-Q., Tao X-L., Li P. Jiang X-H., Zhao Y-H.: Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 415–422 (2011)





## INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

Poniżej w punktach, w formie skrótowej przedstawiono omawiane sprawy na wirtualnych zebraniach Prezydium ZG PTM oraz spotkaniach z udziałem członków Prezydium.

1. PTM otrzymało dofinansowanie z MNiSW na Działalność Upowszechniającą Naukę związaną z modernizacją w latach 2018–2019 czasopism PTM: *Polish Journal of Microbiology* i *Postępy Mikrobiologii* na kwotę 65 200 zł. Otrzymane środki będą przeznaczone zgodnie z zadaniami określonymi w zaakceptowanym przez MNiSW wniosku na:
  - a) zakup puli numerów DOI dla publikowanych artykułów *PJM*
  - b) zakup puli numerów DOI dla publikowanych artykułów *PM*
  - c) wdrożenie nowoczesnej platformy publikacji czasopisma *PJM*
  - d) profesjonalne tłumaczenie artykułów z języka polskiego na angielski dla *PM*
2. Podpisano umowę z firmą z Lublina na tłumaczenie na język angielski prawie 500 stron maszynopisów prac składanych do *Postępy Mikrobiologii* do zeszytów 3 i 4 w 2018 r.
3. Złożono wniosek do Biblioteki Narodowej i otrzymano numer ISSN dla wydawanej tylko on-line wersji *Postępy Mikrobiologii*. Docelowo chcemy, aby wersja on-line w dużej mierze zawierała publikacje w języku angielskim. Powinna wtedy poprawić się cytowalność publikacji kwartalnika oraz wzrosnąć jego Impact Factor.
4. W toku są prace związane z tworzeniem angielskiej strony czasopisma *Postępy Mikrobiologii*.
5. Przekazano pełnomocnictwo radcom prawnym do reprezentowania ZG PTM w obszarze uaktualnienia danych w KRS dotyczących czasopism PTM – *Polish Journal of Microbiology* oraz *Postępy Mikrobiologii*.
6. Zakończyły się działania związane z wprowadzeniem nowego Statutu PTM. Został on wpisany do Krajowego Rejestru Sądowego. Nowy Statut PTM z dnia 23.09.2017 r. jest dostępny na stronie internetowej PTM.
7. W oparciu o nowy Statut PTM z dnia 23.09.2017 r. została uporządkowana lista członków PTM. W dniu 21.06.2018 r. wysłaliśmy zawiadomienie o zamiarze skreślenia z listy członków PTM (drogą listowną – 22 osoby, drogą elektroniczną – 73 osoby) do członków zalegających z opłatą za składki członkowskie. Ostatecznie Uchwałą nr 29–2018 zostało ponad 80 osób usuniętych z grona członków PTM za niepłacenie składek członkowskich.
8. Dnia 16 lipca 2018 r. odbyło się internetowe głosowanie 5 Uchwał Prezydium ZG PTM. Uchwałą nr 28–2018 przyjęto 12 nowych członków zwyczajnych PTM.
9. W dniach 7–8 września w Warszawie odbyło się spotkanie „45 FEMS” zorganizowane po raz pierwszy w naszym kraju przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów. Na nasze zaproszenie przyjechali przedstawiciele 35 europejskich towarzystw mikrobiologicznych reprezentujących: Armeńskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Stowarzyszenie na rzecz Mikrobiologii Ogólnej i Stosowanej; Austriackie Towarzystwo Molekularnych Nauk Przyrodniczych i Biotechnologii; Białoruskie Pozarządowe Towarzystwo Mikrobiologów; Belgijskie Towarzystwo Mikrobiologiczne, Brytyjskie Towarzystwo Mykologiczne; Brytyjskie Towarzystwo Fykologiczne; Bułgarskie Towarzystwo Mikrobiologiczne (Unia Naukowców w Bułgarii); Chorwackie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Duńskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Estońskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Fińskie Towarzystwo Biochemiczne, Biofizyczne i Mikrobiologiczne; Francuskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Niemieckie Towarzystwo Higieny i Mikrobiologii; Międzynarodowe Stowarzyszenie Biodeterioracji i Biodegradacji; Międzyregionalne Rosyjskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Włoskie Towarzystwo Mikrobiologii Klinicznej; Włoskie Stowarzyszenie Przemysłu Rolno-Spożywczego i Mikrobiologii Środowiskowej; Włoskie Towarzystwo Mikrobiologii Ogólnej i Biotechnologii Mikrobiologicznej; Łotewskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Litewskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Towarzystwo Mikrobiologiczne (dawniej Society for

General Microbiology); Norweskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Portugalskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Holenderskie Królewskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Serbskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Słoweńskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Towarzystwo Mikrobiologii Stosowanej; Towarzystwo Wirusologiczne (z Niemiec); Towarzystwo Mikrobiologów Ukrainy; Towarzystwo Mikrobiokosmosu; Hiszpańskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Szwajcarskie Towarzystwo Mikrobiologiczne; Tureckie Towarzystwo Mikrobiologiczne.

Na spotkanie przyjechał również cały zarząd FEMS – Prezydent FEMS: prof. Bauke Oudega z Holandii oraz 7 dyrektorów FEMS wraz z 12 pracownikami FEMS.

Obrady odbywały się w hotelu Sofitel Victoria w Warszawie i wspierane były przez dwójkę wolontariuszy – członków PTM, dr Annę Pietruczuk-Padzik i mgr Karolinę Stępień z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Logistycznie FEMS Council przygotowywany był i nadzorowany przez firmę Global Congress Sp. z o.o., a w trakcie obrad pomoc zapewniały 2 Panie z tej firmy. Uczestnicy FEMS Council powitani zostali na „Welcome reception” i pożegnani kolacją w restauracji AleGloria na Placu Trzech Krzyży. W wolnym czasie uczestnicy mieli zorganizowany spacer po Starówce Warszawy z przewodnikami.

Koszty obrad „45 FEMS Council” pokrywane były przez zarząd FEMS, natomiast imprezy towarzyszące finansowane były w ½ przez zarząd FEMS, natomiast ¼ przez PTM i ¼ przez firmę Global Congress Sp. z o.o. Materiały promujące Warszawę i 3 przewodników udostępniła nieodpłatnie firma Warsaw Convention Bureau z Urzędu m. st. Warszawy, za co bardzo dziękujemy.

Otrzymałem szereg e-maili z podziękowaniami za bardzo udane spotkanie w Warszawie, za świetną organizację, dobre hotele i jedzenie, a także za możliwość zobaczenia Warszawy. Wielu uczestników FEMS Council było po raz pierwszy nie tylko w Warszawie, ale także w Polsce.

10. W połowie września został złożony do MNiSW wniosek na Działalność Upowszechniającą Naukę związaną z planowaną konferencją: MAKRO-kierunki w MIKRO-biologii – Konferencja z okazji 70-lecia Oddziału Warszawskiego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Konferencja odbywać się będzie 27 września 2019 r. na terenie Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Przewodniczącym Komitetu Organizacyjnego jest Pan dr Tomasz Jagielski Przewodniczący Oddziału Warszawskiego PTM.
11. Przypominamy, uchwałą Prezydium ZG PTM z dnia 30.08.2017:  
**„Wprowadza się możliwość ponownego przystąpienia do PTM osobom skreślonym z listy członków zwyczajnych z powodu niepłacenia składek członkowskich, po rocznym okresie karencji, od 01.10.2018 r.”**  
Uchwała dotyczy osób, które z powodu długoletnich zaległości w opłacaniu składek zostały usunięte z grona członków PTM po Nadzwyczajnym Walnym Zebraniu Delegatów PTM, które odbyło się we wrześniu ub. r. w Krakowie.
12. Osoby, które zostały skreślone po 1.10.2017 r. mogą przystąpić ponownie do PTM zgodnie ze Statutem PTM z dnia 23.09.2016 r., paragraf 16.
13. Prezydium ZG PTM wraz z Komisją Konkursową przygotowało materiały (w tym Regulamin Konkursu) związane z konkursem o Nagrodę Naukową PTM im. prof. Edmunda Mikulaszka. W Uchwale nr 32–2018 Prezydium ZG PTM podjęło decyzję w sprawie przyjęcia Regulaminu i materiałów towarzyszących, dotyczących Nagrody Naukowej PTM im. Prof. Edmunda Mikulaszka.

**Nagroda w 2018 r. dotyczy członków PTM, autorów publikacji, które ukazały się drukiem w latach 2016–2017. Wszystkie informacje o konkursie znajdują się poniżej oraz na stronie internetowej PTM.**

**Termin składania wniosków: 31.10.2018 r.**

**Ogłoszenie wyników konkursu: 15.12.2018 r.**



## MATERIAŁY ZWIĄZANE Z KONKURSEM O NAGRODĘ NAUKOWĄ PTM IM. PROF. EDMUNDA MIKULASZKA

### Nagroda Naukowa Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów im. prof. Edmunda Mikulaszka

Pan Profesor Edmund Mikulaszek był wybitnym mikrobiologiem polskim. Urodził się 21 września 1895 roku we Lwowie. Studiował medycynę na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Jana Kazimierza we Lwowie, gdzie uzyskał dyplom doktora wszech nauk lekarskich, a następnie stopień naukowy docenta mikrobiologii i serologii. Był m.in. kierownikiem Katedry Mikrobiologii Lwowskiego Instytutu Weterynaryjnego, filii Państwowego Zakładu Higieny we Lwowie i Sanitarно-Epidemiologicznego Laboratorium Frontu. Po wojnie zorganizował i objął kierownictwo Zakładu Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warszawskiego, a następnie Akademii Medycznej w Warszawie. Przewodniczył m.in. Komitetowi Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk, Radzie Naukowej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii oraz podkomisji surowic i szczepionek Komisji Farmakopei Polskiej. Ogłosił ok. 200 prac z dziedziny mikrobiologii, immunologii i immunochemii, większość w czasopismach zagranicznych. Wielokrotnie reprezentował naukę polską na kongresach i konferencjach międzynarodowych, wyszkolił wielu samodzielnych pracowników naukowych. W okresie międzywojennym za udział w wojnie w 1920 roku został odznaczony medalem i Złotym Krzyżem Zasługi, za udział w II wojnie – Krzyżem Grunwaldu III klasy, po wojnie – Krzyżem Oficerskim i Komandorskim z Gwiazdą Orderu Odrodzenia Polski. Nad wyraz skromny, prawy, sumienny, życzliwy ludziom, o dużej kulturze osobistej, bez reszty oddany nauce, darzony powszechnym szacunkiem środowiska. Zmarł po ciężkiej chorobie 26 sierpnia 1978 roku, w wieku 83 lat, pochowany został z asystą wojskową na Powązkach (*Med Dośw Mikrobiol* 1993, 45, 529–531).

Przez spadkobierców Profesora została ufundowana Nagroda Jego Imienia przyznawana przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów.

Nagroda jest przyznawana co dwa lata za prace doświadczalne z zakresu szeroko pojętej mikrobiologii, wykonane przez młodych pracowników nauki, członków PTM, którzy w chwili wnioskowania o nagrodę nie przekroczyli 35 roku życia i nie byli w tym okresie samodzielnymi pracownikami naukowymi. Współautorami prac mogą być profesorowie lub doktorzy habilitowani bez prawa wyróżnienia nagrodą pieniężną, natomiast z prawem do wyróżnienia okolicznościowym dyplomem. Prace powinny być wykonane w pracowniach na terenie kraju. Współautorami prac przedstawionych do Nagrody nie mogą być autorzy zagraniczni.

Prace do Nagrody są zgłaszane przez autora bezpośrednio zainteresowanego.

Przewidziane są nagrody pieniężne w wysokości:

I stopnia – 5.000 zł

II stopnia – 3.000 zł

III stopnia – 2.000 zł

Komisja konkursowa składa się z 7 osób: przewodniczącego, 2 redaktorów naczelnych czasopism PTM – *Postępy Mikrobiologii* i *Polish Journal of Microbiology* oraz 4 członków.

Nagrody im. prof. Mikulaszka będą wręczane na najbliższym Zjeździe PTM, a Laureat Nagrody zobowiązany jest do prezentacji nagrodzonej pracy na tym Zjeździe. Zarząd Główny PTM może podjąć decyzję o innej formie wręczenia nagrody.

Szczegółowe informacje dotyczące zasad Konkursu przedstawia Regulamin Nagrody Naukowej PTM im. prof. Edmunda Mikulaszka zamieszczony na stronie internetowej PTM: [www.microbiology.pl](http://www.microbiology.pl)

Skład Komisji w edycji Konkursu w 2018 r.:

- prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba – Przewodnicząca Komisji
- prof. dr hab. Elżbieta Anna Trafny – Redaktor Naczelny *Polish Journal of Microbiology*
- prof. dr hab. Jacek Bielecki – Redaktor Naczelny *Postępy Mikrobiologii*
- prof. dr hab. Małgorzata Bulanda – Członek Komisji
- prof. dr hab. Wiesław Kaca – Członek Komisji
- dr hab. prof. nadzw. UŁ Beata Anna Sadowska – Członek Komisji
- dr hab. prof. nadzw. PG Beata Krawczyk – Członek Komisji

**REGULAMIN**  
**Nagrody Naukowej im. prof. Edmunda Mikulaszka ustanowionej**  
**przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów**

1. Nagroda jest przyznawana, co dwa lata za prace doświadczalne z zakresu szeroko pojętej mikrobiologii, wykonane przez młodych pracowników nauki, będących w roku ukazania się publikacji oraz aktualnie członkami PTM, którzy w chwili wnioskowania o nagrodę nie przekroczyli 35 roku życia i nie byli w tym okresie samodzielnie pracownikami naukowymi.
2. Nagrodę przyznaje się za pracę doświadczalną lub cykl prac doświadczalnych ściśle ze sobą tematycznie powiązanych, opublikowanych w okresie dwóch lat poprzedzających rok przyznawania nagród.
3. Prace powinny być wykonane w pracowniach na terenie kraju i mieć afiliację polskiej instytucji naukowej, współautorami nie mogą być autorzy zagraniczni.
4. Autor wnioskujący o nagrodę (wzór – Zał. 1) powinien mieć decydujący wkład w wykonanie i przygotowanie prac:
  - a) w przypadku kiedy jest jeden wnioskodawca – przy 2 współautorach co najmniej 60%, przy trzech i więcej współautorach, co najmniej 40%. Ponadto powinien być pierwszym autorem – w pojedynczej publikacji zgłaszanej do nagrody lub w większości publikacji zgłaszanego cyklu (wzór – Zał. 2).
  - b) w przypadku kiedy jest dwóch wnioskodawców – kiedy są dwoma współautorami tej samej publikacji, a ich wkład wynosi po 50%; kiedy jest 3 autorów to wkład każdego z wnioskodawców wynosi co najmniej 40%. Ponadto w przypadku pracy z 3 autorami jeden z wnioskodawców powinien być pierwszym autorem (wzór – Zał. 2).
5. Współautorami prac mogą być profesorowie lub doktorzy habilitowani bez prawa wyróżnienia nagrodą pieniężną, natomiast z prawem do wyróżnienia okolicznościowym dyplomem. Wkład autora wnioskującego winien być potwierdzony oświadczeniami współautorów (wzór – Zał. 2).
6. Zarząd Główny PTM podejmuje Uchwałę o kolejnej edycji Konkursu o Nagrodę Naukową im. prof. Edmunda Mikulaszka i ogłasza na stronie internetowej PTM miejsce oraz termin zgłaszania prac do Konkursu.
7. Prace do Nagrody są zgłaszane przez autora bezpośrednio zainteresowanego drogą e-mailową do Przewodniczącej Komisji Konkursowej Pani Prof. dr hab. Stefanii Giedrys-Kalemba – e-mail: kalemba@mp.pl oraz do biura PTM – e-mail: ptm.zmf@wum.edu.pl
8. Warunkiem przyjęcia pracy/cyklu prac do Nagrody jest złożenie:
  - a) wniosku zawierającego dane dotyczące autora zgłoszonego do nagrody pieniężnej lub autorów (wzór – Zał. 1),
  - b) odbitek publikacji,
  - c) oświadczenia współautorów o wyrażeniu zgody na złożenie wniosku (wzór – Zał. 2).
9. Postępowanie kwalifikacyjne będzie przeprowadzone w ciągu 6 tygodni od upływu terminu zgłaszania prac. Etapy postępowania Komisji Konkursowej:
  - Przewodniczący Komisji Konkursowej dokonuje wstępnej oceny wniosków, sprawdza w biurze PTM okres przynależności kandydata do PTM, następnie wnioski spełniające warunki formalne przekazuje drogą e-mailową pozostałym członkom komisji celem wytypowania najlepszych prac.
  - Każdy z członków Komisji ustala według własnej oceny ranking nadesłanych wniosków. Ocena wniosków jest dokonywana na podstawie regulaminu pracy komisji oceniającej. Suma przyznanych przez wszystkich oceniających punktów decyduje ostatecznie o rankingu wniosków. W przypadku uzyskania jednakowej liczby punktów decyzję o przyznaniu Nagrody podejmuje przewodniczący Komisji Konkursowej.
  - Członek Komisji Konkursowej nie uczestniczy w ocenie pracy, w której on sam lub jego bezpośredni podwładni są współautorami. W takim przypadku sumę punktów przyznanych wnioskowi przez pozostałych członków Komisji powiększa się o średnią tych ocen.
10. Przewidziane są nagrody pieniężne w wysokości:
  - I stopnia – 5.000 zł
  - II stopnia – 3.000 zł
  - III stopnia – 2.000 złW przypadku podania kilku osób do nagrody, gratyfikacja finansowa będzie dzielona równo pomiędzy współautorów.
11. Ustalenia Komisji Konkursowej przekazywane są do Zarządu Głównego PTM, który podejmuje stosowną Uchwałę.
12. Nagrody Naukowe PTM im. prof. E. Mikulaszka są wręczane na najbliższym Zjeździe PTM, a Laureat Nagrody zobowiązany jest do prezentacji nagrodzonej pracy/cyklu prac na tym zjeździe. Zarząd Główny PTM może podjąć decyzję o innej formie wręczenia Nagrody.

13. Złożenie Wniosku o Nagrodę Naukową PTM im. prof. Edmunda Mikulaszka jest równoznaczne z wyrażeniem zgody na przetwarzanie danych w celu udziału w Konkursie o Nagrodę Naukową im. prof. Edmunda Mikulaszka.

Regulamin zatwierdzono Uchwałą nr 32–2018 Prezydium Zarządu Głównego PTM dnia 16.07.2018 r.

**Załącznik 1**  
**do REGULAMINU Nagrody Naukowej im. prof. Edmunda Mikulaszka**  
**ustanowionej przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów**

**Wniosek**  
**o Nagrodę Naukową PTM im. prof. Edmunda Mikulaszka**

Dane autora wnioskującego o nagrodę pieniężną [w przypadku kilku autorów (np. 2) należy wypełnić kilka wniosków (2) i załączyć kilka (2) oświadczeń osobno dla każdego z wnioskujących współautorów].

Imię i nazwisko autora/współautora\*: .....

Data urodzenia: .....

Tytuł zawodowy, stopień naukowy: .....

Nazwa i adres placówki, w której pracę wykonano: .....

Nazwa i adres instytucji zatrudniającej autora publikacji: .....

Adres zamieszkania, telefon kontaktowy, e-mail: .....

Zgłaszana praca/wykaz prac (IF, MNiSW w roku opublikowania): .....

Uzasadnienie wniosku: (od 50 do 200 słów) .....

Uwagi:

\* niepotrzebne skreslić

**Oświadczam, że w roku opublikowania pracy/prac byłem członkiem PTM i jestem nim obecnie.**

Data .....

.....

Podpis

**Obowiązek informacyjny**

Administratorem Pani/Pana danych osobowych podanych w związku z ubieganiem się o Nagrodę Naukową PTM im. prof. Edmunda Mikulaszka jest Polskie Towarzystwo Mikrobiologów z siedzibą w Warszawie, adres: ul. Stefana Banacha 1B, 02-097, Warszawa, KRS 0000006649 (dalej: PTM). Pani/Pana dane osobowe będą przetwarzane na podstawie: art. 6 ust. 1 lit. a Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r.; (RODO) tj. Pani/Pana zgody na przetwarzanie danych osobowych, pod którą rozumiane jest złożenie ww. wniosku jak również na podstawie art. 6 ust. 1 lit f RODO, tj. jest to niezbędne do celów wynikających z prawnie uzasadnionych interesów realizowanych przez administratora jakim jest obrona przed ewentualnymi roszczeniami.

Pani/Pana dane osobowe będą przetwarzane w celu rozpatrzenia wniosku i udziału w Konkursie o Nagrodę Naukową im. prof. Edmunda Mikulaszka. Podanie danych jest dobrowolne lecz ich niepodanie uniemożliwi udział w konkursie. Pani/Pana dane będą udostępniane uprawnionym na podstawie przepisów prawa organom państwowym. Pani/Pana dane będą również przekazane podmiotom przetwarzającym takim jak podmioty świadczące na naszą rzecz usługi IT.

Pani/Pana dane osobowe będą przetwarzane do dnia rozstrzygnięcia Konkursu o Nagrodę Naukową im. prof. Edmunda Mikulaszka, a następnie przez okres niezbędny do ustalenia, dochodzenia lub obrony roszczeń (tj. przez czas przedawnienia tych roszczeń). Przysługuje Pani/Panu prawo dostępu do swoich danych osobowych, żądania ich sprostowania lub usunięcia. Ponadto przysługuje Pani/Panu prawo do żądania ograniczenia przetwarzania, prawo sprzeciwu wobec ich przetwarzania oraz prawo do przenoszenia danych. W każdym momencie może Pani/Pan wycofać wyrażoną zgodę, w takim wypadku udział w konkursie będzie jednak niemożliwy. Przysługuje Pani/Panu również prawo wniesienia skargi do Prezesa Urzędu Ochrony Danych Osobowych.

**Załącznik 2**  
**do REGULAMINU Nagrody Naukowej im. prof. Edmunda Mikulaszka**  
**ustanowionej przez Polskie Towarzystwo Mikrobiologów**

**Oświadczenie**

Oświadczam, że autor .....  
miał decydujący wkład (Regulamin Nagrody) zgodnie z opisem indywidualnego wkładu ww. autora w jej/ich  
współautorstwo w wykonanie i przygotowanie niżej wymienionej pracy/prac:

1. (Autorzy, tytuł artykułu, nazwa czasopisma, rok, tom, strony.  
Opis indywidualnego wkładu oraz oszacowany % udziału w danej publikacji wnioskującego o nagrodę)
2. (Autorzy, tytuł artykułu, nazwa czasopisma, rok, tom, strony.  
Opis indywidualnego wkładu oraz oszacowany % udziału w danej publikacji wnioskującego o nagrodę)
3. (Autorzy, tytuł artykułu, nazwa czasopisma, rok, tom, strony.  
Opis indywidualnego wkładu oraz oszacowany % udziału w danej publikacji wnioskującego o nagrodę)

i wyrażam zgodę na zgłoszenie jej/ich do Nagrody PTM im. prof. Edmunda Mikulaszka.

Data .....

.....  
Podpis

Warszawa 18.09.2018 r.

SEKRETARZ  
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów  
*A. Laudy*  
dr n. farm. Agnieszka E. Laudy

PREZES  
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów  
*Stefan Tyski*  
prof. dr hab. Stefan Tyski

FEMS Central Office, Delftechpark 37a, 2628 XJ Delft, The Netherlands  
T: +31 (0) 15 302 0050 E: [fems@fems-microbiology.org](mailto:fems@fems-microbiology.org) W: [www.fems-microbiology.org](http://www.fems-microbiology.org)



20 September 2018

Dear Stefan,

**RE: FEMS Council 2018, Warsaw**

I would like to send formal thanks on behalf of FEMS for all of your efforts in organising the 2018 Council meeting. It was a great success as a consequence of your enthusiasm and hard work. The organization, venue, and accommodation, were flawless and contributed to an event that was as enjoyable as it was useful and productive. I received many positive comments about the meeting and the location from attendees. I hope that you enjoyed the event as much as we did. I particularly enjoyed the social programme, enabling me to see much of Warsaw on my first visit to the city. I would also like to pass on my thanks to the volunteers who contributed to the smooth running of everything.

I appreciated your presentation on the history and background of Poland and the Polish Society of Microbiologists, and it seems particularly poignant to have the Council meeting in Warsaw during the centenary of an independent Poland. Warsaw is a wonderful city and I look forward to returning one day.

Warm regards

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Bauke Oudega', written over a horizontal line.

Bauke Oudega

President, Federation of European Microbiological Societies

cc Catherine Cotton, CEO

**BUILDING  
COMMUNITIES**



## SPIS TREŚCI

P. Czechowicz, J. Nowicka – Aktywność przeciwdrobnoustrojowa lipopeptydów .....	213
E. Rosiak, K. Kajak-Siemaszko, M. Trzaskowska, D. Kołożyn-Krajewska – Prognozowanie w mikrobiologii żywności .....	229
K. Talaga-Ćwiertnia, M. Bulanda – Lekooporność rodzaju <i>Enterococcus</i> – aktualny problem wśród ludzi i zwierząt .....	244
R. Welc-Falęciak, M. Bednarska, M. Szatan, A. Pawełczyk – Patogeny przenoszone przez kleszcze u osób zakażonych wirusem niedoboru odporności (HIV-1) .....	251
M. Walencka, A. Matusiak, M. Chmiela – Rola zakażenia <i>Campylobacter jejuni</i> w rozwoju Zespołu Guillaina-Barrégo .....	260
M. Kizerwetter-Świda, D. Chrobak-Chmiel, M. Rzewuska – Aktualne wyzwania weterynaryjnej diagnostyki mikrobiologicznej dotyczącej oznaczania lekowrażliwości gronkowców	270
A. Wawro – Tasowanie genomowe jako alternatywna metoda ulepszania właściwości technologicz- nych drożdży gorzelniczych .....	278
KOMUNIKATY, INFORMACJE .....	287

## CONTENTS

P. Czechowicz, J. Nowicka – Antimicrobial activity of lipopeptides .....	213
E. Rosiak, K. Kajak-Siemaszko, M. Trzaskowska, D. Kołożyn-Krajewska – Predictive microbiology of food .....	229
K. Talaga-Ćwiertnia, M. Bulanda – Drug resistance in the genus <i>Enterococcus</i> – current problem in humans and animals .....	244
R. Welc-Falęciak, M. Bednarska, M. Szatan, A. Pawełczyk – Tick-Borne Pathogens in Individuals with Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Infection .....	251
M. Walencka, A. Matusiak, M. Chmiela – The role of <i>Campylobacter jejuni</i> infection in the development of Guillain-Barré Syndrome .....	260
M. Kizerwetter-Świda, D. Chrobak-Chmiel, M. Rzewuska – Current challenges of veterinary microbiological diagnostics concerning the susceptibility of staphylococci to antibiotics ....	270
A. Wawro – Genome shuffling as an alternative method of improving the properties of distillery yeast ...	278
NEW REPORTS, INFORMATION .....	287

