

Kwartalnik

Tom 59

Zeszyt 4•2020

PAŹDZIERNIK – GRUDZIEŃ

CODEN:

PMKMAV 59 (4)

2020

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy mikrobiologii

Advancements of Microbiology

Index Copernicus ICV = 101,48 (2017)

Impact Factor = 0,263 (2019)

Punktacja MNiSW = 20,00 (2019)

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

RADA REDAKCYJNA

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

REDAKCJA

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

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

JAROSŁAW A. PANKOWSKI (Sekretarz)
Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
e-mail: post.mikrobiol@biol.uw.edu.pl

ADRES REDAKCJI

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

REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPLAWSKA (Uniwersytet Warszawski), GABRIELA BUGLA-PŁOSKOŃSKA (Uniwersytet Wrocławski)
HENRYK KRUKOWSKI (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie), BOŻENA NEJMAN-FALEŃCZYK (Uniwersytet Gdański)
RENATA MATLAKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), EDYTA PODSIADŁY (Uniwersyteckie Centrum Kliniczne WUM)
ADRIANNA RACZKOWSKA (Uniwersytet Warszawski)
AGATA GORYLUK-SALMONOWICZ (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie)
AGNIESZKA KWIATEK (Uniwersytet Warszawski), AGNIESZKA SZCZEPANKOWSKA (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN)
PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków)

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

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

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

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 Płaczekiewicz i dr Agnieszka Kwiatek, Zakład Wirusologii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski.
Zdjęcie: dr Paweł Bącal, 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*

THE IMPORTANCE OF BIOAEROSOL IN FORENSIC INVESTIGATIONS

Karol Bulski

Department of Microbiology and Biomonitoring, Faculty of Agriculture and Economics,
University of Agriculture in Krakow

Submitted in May, accepted in August 2020

Abstract: The article discusses the importance of bioaerosol in terms of forensic microbiology and explains its usefulness in forensic investigations. Examples of investigative practice and crime investigations available in the literature are also presented, with special focus on the importance of biological aerosol analyses during evidence proceedings.

1. Introduction. 2. Biological aerosols. 3. Bioaerosols in forensic investigations. 4. Summary

ZNACZENIE BIOAEROZOLU W BADANIACH KRYMINALISTYCZNYCH

Streszczenie: W artykule omówiono znaczenie bioaerozolu pod kątem mikrobiologii sądowej oraz wyjaśniono jego przydatność w badaniach kryminalistycznych. Przedstawiono również dostępne w literaturze przykłady z praktyki śledczej i przeprowadzonych dochodzeń, ze szczególnym zwróceniem uwagi na przydatność analiz aerozoli biologicznych w postępowaniu dowodowym.

1. Wstęp. 2. Aerozole biologiczne. 3. Bioaerozole w badaniach kryminalistycznych. 4. Podsumowanie

Key words: air, bioaerosol, forensic science, fungi, pollen

Słowa kluczowe: powietrze, bioaerozol, nauki sądowe, grzyby, pyłki

1. Introduction

As defined, forensic science, or forensics, is the application of science to establish how historical events occurred and thereby provide impartial evidence that can be used in a court of law. This may be observed as the use of the scientific methods and processes in crime-solving, within the criminal justice system. Forensic sciences include medicine, biology, dermatology, chemistry, traseology, and computer science. Forensic science can be used to identify decedents or suspects, establish a connection to a crime or crime scene, or prove elements of a crime [7, 22, 50]. The first mention of the use of medicine and biology to solve the crime appeared in the 13th century [46]. Using science to investigate crimes and identify criminals began in the mid to late 1800s. People who had a significant impact on the development of forensic sciences include Ambroise Paré, Fortunato Fidelis, Edmond Locard, Francis Galton, Carl Wilhelm Scheele, Henry Goddard, Hans Gross, Francis Galton, James Watson, Alphonse Bertillon, Sir William Herschel, Sir Alec Jeffreys, Frances Glessner Lee, and many others. They had an impact on the development of forensic medicine, toxicology, chemistry, ballistics, anthropometry, crime scene photography, biology, fingerprinting as well as DNA analyses Now, in the 21st century, foren-

sic scientists have started using modern technologies in crime-solving (e.g. laser scanners, drones, photogrammetry). Thanks to the usage of new testing methods and modern techniques, many cases from many years ago have been solved [10, 19, 36, 41, 49, 50].

We still have to remember that forensic science is derived from biological, engineering, and social sciences, which often deal with issues distant from the world of crime but have been adapted for criminal investigations. There are many forensic sciences and each of them deals with researching a different segment of reality for the criminal trial.

Forensic science connects many sciences from different areas [18, 50]. One of the newer areas of forensic science is microbiology [9, 13, 30, 33, 48]. During an investigation, the main goal for scientists and investigators is to determine who committed the crime, so they have to focus on looking for evidence at the crime scene. Specialists of forensic microbiology may use biological proof to place people at crime scenes, investigate bioterrorism events, or determine the cause of and time of death [8, 11, 33]. Microorganisms isolated from the human body after death could be considered as etiological or a contributing factor to death. Also, the presence of isolated microbes at the crime scene may make it easier to determine the involvement of other people in committing a crime or transporting the

* Corresponding author: dr. Karol Bulski, Department of Microbiology and Biomonitoring, Faculty of Agriculture and Economics, University of Agriculture in Krakow, Mickiewicza 24/28 Av., 30-059 Krakow, Poland; e-mail: karol.bulski@urk.edu.pl

corpses to another location after committing homicide [8, 41]. Microorganisms that are present in soil, water, or plants can be released into the air as bioaerosols and can be transported over long distances [37]. Their presence at a crime scene may be evidence or a source of important crime information.

In this article, the author describes the importance and role of bioaerosol in forensic investigations, based on the available information from the literature (including examples from case studies).

2. Biological aerosols

Nowadays, one of the fast-evolving multidisciplinary science is aerobiology, related to the study of biological molecules in the air. It is an interdisciplinary science related to various fields of knowledge, including botany, palynology, mycology, phenology, meteorology, and allergology [1]. The air that we breathe consists not only of gases but also contains organic and inorganic particles. Particles of biological origin are present in the air in the form of bioaerosols. Their diameters range from 0.01 μm to 100 μm . The bioaerosol consists mainly of bacteria, fungal spores, viruses, pollen, products or fragments of fungi and bacterial cells (toxins), fragments of plants or insects (and other organic substances or biota) [15, 17, 28, 31]. Bioaerosols are present in enclosed spaces (e.g. inside buildings) and the external environment. Indoors, the presence of bioaerosol may be associated with the presence of humans, construction materials or room furnishings [4, 16]. The main sources of bioaerosol in the external environment are soil, natural and artificial water reservoirs, and living or dead organisms [17, 27, 40]. Also, the municipal waste facilities have a huge impact on the composition of the microbiome of the air (by emitting a specific biological aerosol which is typical for municipal landfills and sewage treatment plants) [5]. Bacteria or fungal spores are released into the atmosphere as a result of their removal from plant or soil surfaces, possibly through wind or thermal convection processes, and after spontaneous or rain forced emissions from natural water reservoirs [3, 37]. Microbes cannot grow during airborne transport but can survive in the air for some time. The survival time depends on the properties of the microorganisms and environmental conditions: access to nutrients and physical or chemical factors of environmental stress. The small components of biological aerosol retain their viability in the environment longer than larger microorganisms. Also, bacterial endospores can survive in the air for a long time. The most sensitive, vegetative forms die quickly. Due to the relatively small size of the cell, the most adapted forms of microorganisms are cocci and bacteria whose cells

are covered with a layer of mucus or produce yellow and red carotenoid dyes that protect them from harmful UV radiation [25, 32, 39]. For example, in the air the survival time of *Aspergillus* and *Penicillium* is over 12 years; *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis* die within 30–60 minutes [16].

Sampling bioaerosols aims to efficiently capture (as much as possible) all biological particles from the air and then gather them to enable their subsequent detection, i.e. without changing and/or damaging their structure and maintaining their ability to grow on an appropriate microbiological medium. The most commonly used bioaerosol sampling techniques are impaction, filtration, and electrostatic precipitation [28]. The central topics of bioaerosols studies focus on health hazards (especially worker's health), effects on the atmosphere and climate, or bioterrorism [8, 24–26, 35, 38, 42, 44, 45, 47]. In addition to the fact that bioaerosols can be harmful to humans, they are also significant in other ways.

3. Bioaerosols in forensic investigations

The fungal spores can be isolated from soils, sediments, vegetation, and plant litter. Fungi can also grow on stones, bricks, wooden objects, leather, plastics, rubber, or textiles. Some of the fungi species that produce dry spores and grow on the aerial parts of living plants will be easier caught up in wind currents and can be transmitted more widely through the air (in low concentrations). The spores of certain species that are present on leaves (e.g. *Alternaria* or *Cladosporium*), can be observed in large concentrations in the air, especially during the autumn season [29]. Fungal spores may thus provide trace evidence. Even fragments of lichens or mold can become detached in items that are involved in criminal investigation [2, 6, 55].

Specialists in biology and forensic science point out the importance of microbiology, palynology, and mycology in investigations of committed crimes [1]. One of the factors that affect the possibility of resolving a crime are traces – amounts of material that might be valuable in a court as evidence. The cases described by Hawksworth and Wiltshire [22], show that microorganisms present in the air may be useful for this purpose. According to the authors, a young woman's body was found dumped in plants called 'stinging nettles' (*Urtica dioica*). Forensic microbiologists found two species of fungi (*Periconia* sp., *Torula herbarium*) in the suspect's car that were also found on the nettles (nettles support the growth of several species of fungi, especially about seventeen species are only found in association with these plants). It turned out that the suspect unconsciously picked up fungal spores on his clothing from the nettles. Some of these spores were transferred directly into the sus-

pect's car after being released into the air from his clothes. Based on this evidence, the police identified a suspect involved in the death of the woman. In the other case, the suspect (waiting in the forest for the victim to arrive) contaminated his clothes with a fungal plant pathogen from cypress trees at the crime scene. The murderer hid in a forested area and shot the victim upon arrival. Once again, the fungal spores were found in the murderer's car, placing him at the crime scene. There are also other cases (including accusations of rape) in which the biological material (in the form of fungal spores of specific species) constituted evidence during the investigation [20–22].

Fungal spores present in the air (in the form of a biological aerosol) can likewise affect the colonization of exposed human bones (under favorable conditions and long-time exposure). Also, the spring cycle of fungi can help in determining the time of events. In one of the cases conducted in London, in 2004, it was possible to determine when the body of a young woman was placed in a shallow grave. It was possible due to the presence of black pustules on the underside of the leaves (present in the grave), while the leaf's tissue associated with them was red-purple. It was caused by one plant rust pathogen – *Phragmidium violaceum*. The spores of this fungus are produced and released (in conditions of sufficient humidity) during spring and autumn, after which they are transmitted in the air. Taking into account the color of the pustules, investigators made an estimate. The evidence indicated that the body had been deposited in the grave between late September and early November [52]. Many fungi are seasonal, but some of them (e.g. *Sarcoscypha* or *Flammulina*) have more limited occurrence and can provide important trace evidence during investigations [20]. The colonization of human corpses by some fungi commonly present in the atmospheric air (e.g. *Mucor*) may mean that the victim had been killed and stored for some time in another place and had lain at the deposition site for a short time [11, 14, 23, 33, 41, 43, 51].

For forensic purposes, it is more important to determine the degree of similarity of the samples taken than to identify 100% of all the pollen grains or spores revealed in the samples from the crime scene. Plant pollen is carried by vectors, mostly by wind (in the form of bioaerosol). So, pollen and spores are carried up and away from the parent plant. Pollen derived from wind-pollinated plants are common components in the airspora and are often over-represented. Crime scenes are often dominated by self-pollinated plants. In this case, the pollen falls to the ground around the plant and rarely gets into the air but it may be the most abundant on an item of footwear. In this situation, pollen from the air at the crime scene may form only a small proportion of the profile relevant to the criminal investigation.

Pollen and spores can be relatively easily determined, collected, protected, and tested. The diversity of pollen and spores means that samples taken at a distance of several meters from each other may have different characteristics, and this can be a very valuable clue for establishing evidence [2, 6, 20, 34, 54, 56].

The importance of pollen in crime investigations can be illustrated by a case from South Wales, where a murder victim was buried on a hillside dominated by *Picea sitchensis*. Analysis of the surface soil samples around the grave showed that spruce pollen hardly registered in the samples because only a few trees had reached sexual maturity. However, in the soil samples, the presence of pine pollen was noted, and the source of that pollen was a small, but matured pine, growing about 100 meters from the grave. Therefore, pine pollen could have been associated with potential suspects. We have to remember that time is an important factor in forensic sampling, because pollen and spores falling at any one time will be mixed with pollen previously accumulated on the surfaces. Pollen and spore occurring rarely, associated with a specific area and spread over short distances are of major importance. Also, it would be advantageous if a forensic palynologist visited the crime scene [52, 53].

Plant pollen is most often revealed on clothing, footwear (with mud or soil), or other objects (paintings, furniture, firearms, documents). During breathing, sporomorphs (in the form of bioaerosol) are absorbed into the human respiratory tract and then penetrate the nasopharynx and lungs. Pollen was also isolated from the content from the coronary tract, and – in the form of a biological aerosol – can stick on hair (especially on the head) and may stay there longer than on the body surface (it does not wash out and rinse so quickly). It confirms that plant pollen (as bioaerosol component) present in the environment may constitute evidence in criminal casework [55, 56].

Aerosol particles also include cellular material and proteins emitted by humans and can be considered biological information – particles that carry biochemical information specific to living organisms. For example, living organisms, including humans, constantly emit a great deal of dead skin cells into the environment. Nowadays, with the development of analytical techniques, these particles could be isolated and characterized in terms of biochemistry. It may seem that a lot of biological structures and metabolic pathways are common to all people resulting in apparently common biochemical profiles, but these pathways and structures exhibit extensive polymorphisms and divergent post-translational modifications that reflect individual genetics. It can have a big impact and significance for development of biochemical forensics or medical profiling. Also, the concentration, degradation and type of aerosol

may depend on human presence at a specified place and time, and maybe this information can be used during crime investigation and court proceedings [12, 13].

4. Summary

Forensic microbiology is a science that is constantly evolving. Microbiological analysis of the evidence of crimes can influence the determination of potential offenders. Bioaerosols may have a huge importance in tracking down crime suspects. As the cases (described in the literature) show, biological material – in the form of bioaerosol – can be important evidence at crime scenes and bioaerosol analysis would appear to be an important tool that can be used during crime investigations.

References

1. Bednarz A.: The use of bioaerosol in forensic studies and their relationship with other fields of research. *Alergoprofil*, **12**, 135–139 (2016) (in Polish)
2. Boi M.: The Importance of Palynology in Forensic Investigations. *Forensic Sci. Add. Res.* **3**, 1–2 (2018)
3. Bowers R.M., McCubbin I.B., Hallar A.G., Fierer N.: Seasonal variability in airborne bacterial communities at a high-elevation site. *Atmos. Environ.* **50**, 41–49 (2012)
4. Brągoszewska E., Biedroń I., Kozielska B., Pastuszka J.S.: Microbiological indoor air quality in an office building in Gliwice, Poland: analysis of the case study. *Air Qual. Atmos. Health* **11**, 729–740 (2018)
5. Breza-Boruta B.: Bioaerosols of the municipal waste landfill site as a source of microbiological air pollution and health hazard. *Ecol. Chem. Eng. A*. 10.2428/eecea.2012.19(08)083 (2012) (in Polish)
6. Bryant V.M., Jones G.D.: Forensic palynology: Current status of a rarely used technique in the United States of America. *Forensic Sci. Int.* **163**, 183–197 (2006)
7. Budowle B.: Quality assurance guidelines for laboratories performing microbial forensic work. *Science Supporting Online Material*. doi:10.1126/science.1090270. (2003)
8. Budowle B., Schutler S.E., Einseln A., Kelley L.C., Walsh A.C., Smith J.A.L., Marrone B.L., Robertson J., Campos J.: Building microbial forensics as a response to bioterrorism. *Science*, **301**, 1852–1853 (2003)
9. Budowle B., Schutler S., Morse S.: *Microbial Forensics*. Academic Press (2019)
10. Burkhard M.: *Handbook of Forensic Medicine*. Sussex: Wiley Blackwell (2014)
11. Carter D.O., Yellowlees D., Tibbett M.: Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Naturwissenschaften*, **94**, 12–24 (2007)
12. Castillo J.A., Staton S.J.R., Taylor T.J., Herckes P., Hayes M.A.: Exploring the Feasibility of Bioaerosol Analysis as a Novel Fingerprinting Technology. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 15–26 (2012)
13. Desikan P.: Our microbial signatures. *Indian J. Med. Microbiol.* **35**, 443–444 (2017)
14. Fernández-Rodríguez A., Cohen M.C., Lucena J., Van de Voorde W., Angelini A., Ziyade M., Saegeman V.: How to optimise the yield of forensic and clinical post-mortem microbiology with an adequate sampling: a proposal for standardisation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 1045–1057 (2015)
15. Gołofit-Szymczak M., Górny R.L.: Bioaerosols in office buildings. *Kosmos*, **66**, 491–502 (2017) (in Polish)
16. Górny R.L.: Particles of fungi and bacteria as components of rooms aerosol: properties, emission mechanisms, detection. Institute of Occupational Medicine and Environmental Health, Sosnowiec (2004) (in Polish)
17. Górny R.L. *Microbial Aerosols: Sources, Properties, Health Effects, Exposure Assessment – A Review. KONA Powder and Particle Journal*. doi:10.14356/kona.2020005 (2019)
18. Halicki K.: Polska i zagraniczna literatura oraz czasopisma z kryminalistyki, kryminologii, medycyny sądowej oraz opracowania dotyczące metod walki z przestępczością w okresie dwudziestolecia międzywojennego. *Problemy Kryminalistyki*, **278**, 69–83 (2012)
19. Hawkins S.: Using a Drone and Photogrammetry Software to Create Orthomosaic Images and 3D Models of Aircraft Accident Sites. *UK AAIB* (2016)
20. Hawksworth D.L.: Report on Identification of Fungal Spores in Palynological Preparations from Comparator Samples and Footwear. Report to Lincolnshire Police (2009)
21. Hawksworth D.L.: Report on Identification of Fungal Spores. Report to Wiltshire Constabulary (2009)
22. Hawksworth D.L., Wiltshire P.E.J.: Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. *Forensic Sci. Int.* **206**, 1–11 (2011).
23. Hitosugi M., Ishii K., Yaguchi T., Chigusa Y., Kurosu A., Kido M., Nahai T., Tokudome S.: Fungi can be a useful forensic tool. *Legal Med.* **8**, 240–242 (2006)
24. Jiayu C., Qiaoqiao R., Feilong C., Chen L., Jiguo W., Zhen-dong W., Lingyun C., Liu R., Guoxia Z.: Microbiology Community Structure in Bioaerosols and the Respiratory Diseases. *J. Environ. Sci. Publ. Health* **3**, 347–357 (2019)
25. Kaiser K., Wolski A.: Control of microbiological air purity. *Technika chłodnicza i klimatyzacyjna* **4**, 158–162 (2007) (in Polish)
26. Kim K.H., Kabir E., Jahan S.A.: Airborne bioaerosols and their impact on human health. *J. Environ. Sci.* **67**, 23–35 (2018)
27. Kozdrój J., Frączek K., Ropek D.: Assessment of bioaerosols in indoor air of glasshouses located in a botanical garden. *Build. Environ.* **166**, 1–9 (2019)
28. Kulkarni P., Baron P.A., Willeke K.: *Aerosol measurement: principles, techniques, and applications*. John Wiley and Sons, Inc., New York (2011)
29. Lacey J.: The aerobiology of conidial fungi. In: G.T. Cole, B. Kendrick (Eds.), *The Biology of Conidial Fungi*, Academic Press, New York, 373–416 (1981)
30. Lehman D.C.: Forensic Microbiology. *Clin. Microbiol. News.* **36**, 49–54 (2014)
31. Ławniczek-Wałczyk A., Górny R.L.: Endotoxins and β -glucans as markers of microbiological contamination – characteristics, detection and environmental exposure. *Ann. Agric. Environ. Med.* **17**, 193–208 (2010)
32. Menetrez M.Y., Foarde K.K., Dean T.R., Betancourt D.A.: The effectiveness of UV irradiation on vegetative bacteria and fungi surface contamination. *Chem. Engin. J.* **157**, 443–450 (2010)
33. Micozzi M.S.: *Postmortem Changes in Human and Animal Remains: A Systematic Approach*. Springfield (1991)
34. Mildenhall D.C.: Civil and criminal investigations. The use of spores and pollen. *SIAC J.* **4**, 35–52 (2008)
35. Paśmionka I.: Evaluation of microbiological quality of atmospheric air in a selected sewage treatment plant in Lesser Poland. *Aerobiol.* doi:10.1007/s10453-020-09627-x (2020)
36. Parker R.J.: *Forensic Analysis and DNA in Criminal Investigations: Including Cold Cases Solved*. RJ Parker Publishing (2015)

37. Polymenakou P.N.: Atmosphere: A Source of Pathogenic or Beneficial Microbes? *Atmosphere* **3**, 87–102 (2012)
38. Prażak Z., Kowalska M.: Biological factors in occupational environment of nurses and possibilities of reducing exposure. *Hyg. Publ. Hlth.* **52**, 111–118 (2017) (in Polish)
39. Puspita I.D., Kamagata Y., Tanaka M., Asano K., Nakatsu C.H.: Are uncultivated bacteria really uncultivable? *Microbes Environ.* **27**, 356–366 (2012)
40. Redford A.J., Fierer N.: Bacterial succession on the leaf surface: a novel system for studying successional dynamics. *Microb. Ecol.* **58**, 189–198 (2009)
41. Riedel S.: The value of postmortem microbiology cultures. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1028–1033 (2014)
42. Robertson S., Douglas P., Jarvis D., Marczylo E.: Bioaerosol exposure from composting facilities and health outcomes in workers and in the community: A systematic review update. *Inter. J. Hyg. Environ. Hlth.* **222**, 364–386 (2019)
43. Sidrim J.J.C., Moreira Filho R.E., Cordeiro R.A., Rocha M.F.G., Caetano E.P., Monteiro A.J., Brilhante R.S.N.: Fungal microbiota dynamics as a postmortem investigation tool: focus on *Aspergillus*, *Penicillium* and *Candida* species. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 1751–1756 (2010)
44. Simon X., Duquenne P.: Assessment of workers' exposure to bioaerosols in a French cheese factory. *Ann. Occup. Hyg.* **58**, 677–692 (2014)
45. Skórska Cz., Golec M., Mackiewicz B., Góra A., Dutkiewicz J.: Health effects of exposure to herb dust in valerian growing farmers. *Ann. Agric. Environ. Med.* **12**, 247–252 (2005)
46. Song Ci., McKnight B.E.: The washing away of wrongs: forensic medicine in thirteenth-century China. University of Michigan (1981)
47. Soroka P.M., Cyprowski M., Szadkowska-Stańczyk I.: Occupational exposure to mycotoxins in various branches of industry. *Med. Pr.* **59**, 333–345 (2008) (in Polish)
48. Spagnolo E.V., Stassi C., Mondello C., Zerbo S., Milone L., Argo A.: Forensic microbiology applications: A systematic review. *Legal Med.* **36**, 73–80 (2019)
49. Thompson K.M.: *Crime Films: Investigating the Scene*. Wallflower Press, London (2007)
50. Ubelaker D.H.: *The Global Practice of Forensic Science*. Wiley Blackwell (2014)
51. van de Voorde H., van Dijck P.J.: Determination of the time of death by fungal growth. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, **89**, 75–80 (1982)
52. Wiltshire P.E.J.: Estimate of Deposition Time for Skeletonised Remains Found in a Shallow Grave. Report to Thames Valley Police (2004)
53. Wiltshire P.E.J.: Report on Palynological Analyses of Exhibits and Control Samples for a Case of Cruelty Against Badgers. Report to the Royal Society for the Protection of Cruelty to Animals, Shrewsbury (2004)
54. Wiltshire P.E.J.: Palynological and Botanical Comparisons of the Crime Scene, Other Pertinent Places, and Exhibits. Report to the Metropolitan Police Service (2008).
55. Wiltshire P.E.J.: Forensic ecology, botany, and palynology: some aspects of their role in criminal investigation, in: K. Ritz, L. Dawson, D. Miller (Eds.), *Criminal and Environmental Soil Forensics*, Springer Science and Business Media, Dordrecht, 129–149 (2009)
56. Zachuta A.: Wybrane zagadnienia z kryminalistyki: ślady roślinnych pyłków i zarodników. *Kultura Bezpieczeństwa. Nauka-Praktyka-Refleksje*, **12**, 28–50 (2012)

BRUCELLOSIS: CURRENT STATUS OF THE DISEASE AND FUTURE PERSPECTIVES

Sulaiman Mohammed Abu Sulayman^{1,2}, Roop Singh Bora^{1,3},
Jamal S.M. Sabir¹, Mohamed Morsi M. Ahmed^{1,4*}

¹Department of Biology, Faculty of Science, King Abdul Aziz University, Jeddah, Saudi Arabia

²National Center of Agriculture and Animal Recourses, Ministry of Agriculture, Riyadh, Saudi Arabia

³Department of Biotechnology, College of Agriculture, Eternal University, Baru Sahib, HP, India

⁴Nucleic Acids Research Dept., Genetic Engineering, and Biotechnology Research Institute (GEBRI),
City for Scientific Research and Technological Applications, Alexandria, Egypt

Submitted in December 2019, accepted in May 2020

Abstract: Brucellosis is a transmissible bacterial zoonotic disease caused by Gram-negative coccobacillus bacteria of the genus *Brucella*. The disease severely hinders the livestock industry and human health. In several instances, infected animals act as carriers for the cross-species transmission of brucellosis. Social issues, poor husbandry practices, irregularities in the marketing and movement of domestic animals, and lack of coordination between veterinary and human health services are some of the key factors responsible for the transmission and prevalence of Brucellosis. Human contact with infected domestic animals is often the transmission route of Brucellosis infection. Therefore, human brucellosis could be eradicated globally by eradicating animal brucellosis. This review describes the current status of brucellosis and the risk factors of the disease in animals and the human population. In addition, there is a further discussion of the various issues related to the control and prevention of brucellosis in domestic animals and humans.

1. Introduction. 2. Historical background of Brucellosis. 3. Prevalence of brucellosis 4. Taxonomy 5. Epidemiology of Brucellosis 6. Risk factors for brucellosis 7. Transmission. 8. Clinical Symptoms. 9. Human brucellosis. 10. Diagnosis of brucellosis 11. Detection of *Brucella* organisms. 12. Serological tests. 13. Molecular diagnostic methods. 14. Control and prevention of brucellosis

Key words: *Brucella*; brucellosis; epidemiology; serological test, molecular diagnostic test

1. Introduction

Brucellosis is an infectious zoonotic disease of domestic animals, as well as humans, globally [1–3]. Various domestic animals such as camels, goats, sheep, cows as well as humans are affected by brucellosis. It is caused by the *Brucella* species such as *Brucella melitensis* in small ruminants, *Brucella abortus* in cattle, and *Brucella canis* in dogs [4–5] *Brucella* species are Gram-negative, small coccobacillus, slow-growing and intracellular bacteria that are capable of surviving and multiplying within macrophages, dendritic cells, placental trophoblasts, and epithelial cells. *Brucella* species can survive under extreme conditions of temperature, humidity, pH, and persist in frozen and aborted materials for longer durations [6].

Although several countries are affected by brucellosis, it is still a neglected disease and no official program for surveillance and eradication of animal brucellosis has been proposed [7]. In many developing countries of Africa, Asia, Central, and South America, clinical disease is recorded among different animals [8, 9]. The impact of brucellosis on human health is a major issue [10]. In humans, it causes fever, nausea, muscular pain,

abdominal pain, sweating, weakness, decreased appetite, weight loss, and liver inflammation [11]. This disease in domestic animals poses a threat to free animal movement and trade of animals and various animal products and causes huge economic losses. It also leads to economic burden due to decreased milk production, breeding failure, and abortion in the domestic animals infected with *Brucella* spp. [12].

The development of DNA markers and molecular biology techniques are important tools for genomics-based studies in animal biotechnology [13]. It has led to genetic improvement and markers now help in the selection of best quality breeds of animals. Over the last 20 years, DNA markers have resulted in tremendous genetic improvement in farm animals. Recent developments in molecular biology techniques have revealed genetic polymorphisms in DNA sequences, which have been used extensively as markers for assessing the genetic basis of the phenotypic variations in animals. The genetic markers indicative of changes at the DNA level are called molecular markers [14]. The PCR has become an important tool for molecular DNA studies, including the detection of DNA polymorphism (fingerprinting), analysis of genotyping, and genome

* Corresponding author: Mohamed Morsi M. Ahmed, Department of Biology, Faculty of Science, King Abdul Aziz University, Jeddah, Saudi Arabia; e-mail: mmmahmed6@yahoo.ca

mapping. Along with microbial techniques, 16S rRNA gene sequencing and RAPD methods are very essential in molecular diagnosis. Using an array of random single RAPD primers, it is possible to determine the polymorphism that can be used in DNA analysis [15].

Improvement of the livestock industry and the use of improved prevention measures to control brucellosis, require an understanding of the disease risk and the prevalence of infection in the human population and animal hosts. Epidemiological studies of brucellosis in humans as well as domestic animals globally is urgently needed to effectively control this disease [16–21]. The objective of this work are to describes the current status of brucellosis and the risk factors of the disease in animals and the human population. In addition, there is a further discussion of the various issues related to the control and prevention of brucellosis in domestic animals and humans.

2. Historical background of Brucellosis

The disease brucellosis has existed since time immemorial. The analysis of the skeleton of *Australopithecus africanus* from the late Pliocene era revealed the effect of brucellosis in human ancestors [15]. Furthermore, DNA analysis and pathological findings from human skeletal remains and buried cheese remains indicated the presence of brucellosis in some countries in the Middle East and Europe in 79 A. D. [15, 16]. The earliest record of this disease was in 1859, and it mentioned that animal abortions were most probably due to brucellosis [1]. However, in the 1880s, the causative agent of this disease, *Brucella melitensis*, was isolated and identified. The term brucellosis was named after Sir David Bruce who isolated and characterized the infectious agent from a soldier in Malta in 1886. This disease was responsible for inflicting severe mortality and morbidity in British military personnel in Malta and hence was also well-known as Malta or Mediterranean fever [6]. It was also known as Bang's disease after the isolation of the causative agent *Brucella abortus* in 1897 by Danish veterinarian Bernhard Bang. Due to the "wave-like" characteristic of the fever, which rises and falls over several weeks in patients, it is also known as "undulant fever". Other names for brucellosis include Gibraltar fever, Rock fever, Cyprus fever, and typhomalarial fever in humans and animals.

3. Prevalence of brucellosis

Although Brucellosis has been very well controlled in many developed countries, it is still a major concern in Asia including Middle Eastern countries, Africa, Mediterranean countries and South America. Human brucellosis has re-emerged in China since 1990, due to

the drastic growth of animal husbandry which increases the probability of human infection [3]. Brucellosis is still a major concern in the Indian subcontinent. India has one of the largest bovine populations in the world, which is responsible for the continued exposure of workers in milk industry to these animals and hence there are high incidences of brucellosis in humans [17]. A seroprevalence study in India indicated brucellosis seroprevalence ranging from 2% to 18% in suspected patients [17]. Several countries which were endemic such as Malta, France, Ireland, Israel have been successful in eradicating the disease. Studies in various countries, have indicated that *B. melitensis* is the main cause of human brucellosis, while infection with *B. abortus* is less frequent [22]. Domestic animals are a natural reservoir of *Brucella* spp. and animal-to-human transmission occurs through the consumption of infected meat and milk. Serological data for the prevalence of brucellosis in various provinces in Saudi Arabia is still not available [22, 23]. The incidence of the disease had been reported from the Northern, Southern, and Central regions of Saudi Arabia [24, 25]. A seroprevalence study by Ageely and colleagues in the Jazan province of Saudi Arabia revealed that the prevalence of human brucellosis was higher in patients ≥ 40 years old (20 %) as compared to the population < 40 years (12 %). Seroprevalence was higher in the rural population (39.3%) than in the urban population (4.6%), and significantly higher in the Saudi population (14.5%) compared to the non-Saudi population (3.0%). However, the prevalence was much higher in males (16.4%) than females (7.1%) [16]. *Brucella* spp. infection in humans is mainly through the consumption of raw milk and meat products derived from infected goats or camels. It has also been observed that laboratory workers, hospital staff, and veterinarians are more prone to brucellosis [23, 26, 27]. Brucellosis is caused by bacteria belonging to genus *Brucella* in humans and several other animals, including goat, cows, buffaloes, sheep, pigs, camels and reindeer [1, 28].

4. Taxonomy

Brucella spp. are Gram-negative cocci or small rods, non-motile, non-encapsulated, non-flagellated, non-spore forming aerobic microbes. It has the capability to invade, epithelial cells, macrophages, dendritic cells and placental trophoblasts [7].

Genus *Brucella* belongs to the alpha-2 subdivision of class *Proteobacteria* and 10 different species of *Brucella* based on the host specificity that has been reported. These species are *B. melitensis* (goats), *B. abortus* (cattle), *B. ovis* (sheep), *B. canis* (dogs), *B. neotomae* (desert woodrats), *B. suis* (swine), *B. pinnipedia* (seal), *B. microti* (voles), *B. cetacea* (cetacean), and

B. inopinata (unknown) [29]. Among the known 10 species of *Brucella* only *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. canis* and *B. suis*, have been found to cause infection in humans. *B. ovis* and *B. neotomae* are not pathogenic to humans. Most of the human infection cases globally are caused by *B. melitensis* [30]. *B. melitensis* and *B. suis* are more infectious and virulent in humans compared to *B. canis* or *B. abortus* [31]. *B. melitensis*, *B. suis* and *B. abortus* are known to have 3, 5, and 7 subtypes, respectively [32, 33]. Sequencing the genome of *Brucella* species revealed a sequence homology of more than 99% among the species [29, 34].

Most *Brucella* species possess smooth lipopolysaccharide (SLPS) in the outer cell wall, while *B. canis* and *B. ovis* have rough lipopolysaccharide (RLPS) and protein antigens [35]. SLPS contains an immunogenic O-polysaccharide, defined as a homopolymer of 4, 6-dideoxy-4-formamide- α -D mannose, which is connected by glycosidic linkages. *Brucella* species that possess smooth lipopolysaccharide, particularly *B. melitensis*, are known to undergo dramatic structural variations during growth, and more often change to rough form (R) and occasionally to mucoid form (M). During the change in morphology to rough form (R), bacterial colonies appear to be less transparent, with a more granular surface. During the change in morphology to mucoid form (M), the bacterial cells appear to have a gelatinous texture and their color changes from white to brown in reflected light. An intermediate form (I) has also been observed during the change in morphology from smooth (S) to rough form (R). It had been shown that changes in the bacterial cell morphology are associated with marked differences in virulence, pathogenicity and serological properties of *Brucella* spp. [36].

5. Epidemiology of Brucellosis

The epidemiology of brucellosis has dramatically changed over the past few years due to improvement in hygiene, socio-economic conditions and an increase in international travel. Incidence of human brucellosis has been reported for the first time from the regions of central Asia and in some countries. Particularly in Middle East countries, there is a drastic increase in the incidences of brucellosis in humans [30].

Brucellosis affects domestic as well as wild animals. It has been reported to occur worldwide wherever animals are raised [37]. Although some industrialized countries in Europe and America have been able to eradicate brucellosis in domestic animals through intensive control schemes, the disease is still a severe problem in several developing countries [38].

B. melitensis is the most pathogenic species and comprises three biovars. Biovars 1 and 3 have been

detected most often in domestic animals in the Middle-East, Mediterranean and Latin American countries [39, 40]. Brucellosis is considered a major barrier to the free trade of domestic animals and various animal products and is responsible for significant economic losses due to abortion in domestic animals [41].

6. Risk factors for brucellosis

Various factors such as environmental factors and the host biology can affect the occurrence and prevalence of brucellosis. Some of these factors include the age of the animals, herd size, sanitary conditions of animal farms and climatic conditions [24, 42]. It has also been observed that sexually mature animals are more prone to the infection and bacteria mainly localize in the reproductive organs, particularly in pregnant animals. Besides, *Brucella* spp. may also be localized in the mammary glands [43].

Many people in poor African countries such as Ethiopia are dependent on livestock for their livelihood which leads to their close association with the domestic animals, increasing the risk of infection through *Brucella* spp. [42, 44]. Cases of brucellosis are very high in rural areas as farmers live closely with their domestic animals and more often consume unpasteurized milk products [24]. In countries like Ethiopia, the habit of consuming raw milk, improper handling of an aborted fetus and reproductive excretions are responsible for the transmission of zoonotic diseases like brucellosis to humans [45].

In many other countries, risk factors for infection with *Brucella* include consumption of contaminated animal products such as milk and meat, handling of infected animals, traveling to an endemic area and mishandling cultures of *Brucella* sp. in laboratories and diagnostic centers. Veterinarians, dairy workers, and slaughterhouse workers are more susceptible to infection with *Brucella* [8]. Recent studies showed a poor community's knowledge of brucellosis and the risk associated with brucellosis among people living adjacent to Awash National Park in Ethiopia [46]. Hence, there is an utmost need to create awareness about the disease, improve knowledge, attitudes and practices among livestock owners, which would further lead to a significant reduction in the transmission of the bacteria from animals to humans in the disease-prone areas [41].

7. Transmission

Brucella melitensis has been found to be sexually transmitted in sheep and goats. The transmission of brucellosis is facilitated by the intermingling of animal

herds that belong to different owners and by the procurement of cattle from sources that are not properly screened for the disease [2]. Moreover, using common male breeding stock also increases the risk of disease transmission among domestic animals. Other factors that can promote the transfer of infection include the intermingling of animals during grazing, the crowding of animals in farms, marketplaces or animal fairs [1]. Following an abortion in domestic animals, animal farms can become contaminated with *Brucella* spp. and other animals on the farm may acquire the disease by ingestion, inhalation, skin contamination or udder inoculation. Sometimes, pooled colostrums used for feeding newborns can also play a role in the transmission of the disease. Artificial insemination may also promote the transmission of the *Brucella* spp. to healthy animals.

In humans, brucellosis is caused by *B. melitensis*, *B. abortus* and *B. suis* which are transmitted by an infected goat, pigs, sheep or cows to healthy humans [47]. Besides, domestic and wild animals are also infected with *Brucella* sp. and can act as reservoirs of bacteria that can be transmitted to both humans and domestic animals [41]. Exposure of humans to infected domestic animals or the consumption of milk or meat products derived from infected animals enhances the risk of acquiring brucellosis [8]. The transmission of brucellosis may also occur through blood transfusion or organ transplantation. Some people such as farmers, farm laborers, animal attendants, shepherds, and veterinarians are at a very high risk of acquiring the infection. These workers are always at a very high risk of infection with *Brucella* spp. due to direct contact with infected animals or constant exposure to the contaminated environments. The main source of *Brucella* infection in the urban population is usually contaminated food, milk or dairy products derived from infected animals [20, 47].

8. Clinical Symptoms

Animals

The incubation period in brucellosis is found to be highly variable and is defined as the period between the exposure and first appearance of clinical symptoms or abortion. In cows, infected at the early stage of pregnancy, abortion may occur after 225 days. But for those infected at seven months gestation, abortion may occur after 50 days. Various factors such as age, sex, stage of gestation, infective dose and immune system of the animals may influence the incubation period [2, 48]. In very susceptible animals with weak immune systems, abortion occurs during the third trimester and other clinical symptoms include metritis, retained placenta, and reduced milk production [49]. It has been observed that abortion may occur in 80% of animals

that are infected with *B. abortus* [48]. Brucellosis is one of the major causes of infertility in camels, cows, goats, sheep, pigs, and dogs [50, 51]. Infection in male animals causes hygromas, orchitis, and inflammation of the seminal vesicles [50].

9. Human brucellosis

In humans, there are three stages of brucellosis i.e. acute, subacute or chronic phase and the incubation period is two to three weeks and sometimes several months. The predominant symptoms of brucellosis in humans include intermittent fever, headache, backache, weakness, weight loss, anorexia and mental depression [52, 53]. During the chronic phase, knee joints are also affected [54]. Complications may occur in the gastrointestinal, cardiovascular, pulmonary, lymphatic, and nervous systems [55, 56]. The effect of *Brucella* infection on the nervous system causes neuro-brucellosis, which is characterized by fever, headache, psychosis, seizures, behavioral changes, and spastic paresis [57].

10. Diagnosis of brucellosis

It has always been difficult to clinically diagnose brucellosis in animals as well as in humans [13]. Presently, the serological method, culture-based method, and molecular techniques are employed to detect *Brucella* infection in animals and humans [58]. Diagnostic tests are based on the detection of the causative agent *Brucella* sp., the detection of antibodies in the serum and allergic reactions [59].

11. Detection of *Brucella* organisms

Culture

Culture-based methods are employed to detect *Brucella* spp. in milk, blood or colostrum, including fetal membranes, uterine discharges of infected animals and aborted fetuses. The supra mammary lymph nodes or retropharyngeal or prescapular lymph nodes are also very suitable samples for the diagnosis of brucellosis in animals [48, 60]. For the diagnosis of brucellosis in humans, blood, urine and cerebrospinal fluid are screened in order to detect the bacteria, particularly during the acute stage of brucellosis [12, 14, 61]. However, culture-based methods are not suitable for the diagnosis of brucellosis during the chronic phase, as the bacterial count is very low. Another major drawback of the culture-based methods is the slow growth rate of the *Brucella* species. Moreover, there is a very high risk to the health of the laboratory personnel [1, 12, 13].

Microscopic examination

Staining methods such as Ziehl Nelsen staining can also be used to detect *Brucella* in infected animals. However, this staining technique is not very specific to *Brucella* spp., as other microorganisms such as *Chlamydia*, *Coxiella*, and *Nocardia* exhibit acid-fast features [47].

12. Serological tests

Several serological tests are currently being employed for qualitative and quantitative detection of specific immunoglobulins of *Brucella* organism-specific antibody titer in the infected animals. Serological tests such as Rose Bengal Plate test (RBPT), Complement Fixation Test (CFT), Serum Agglutination Test (SAT), and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) are routinely used for diagnosis of brucellosis in animals and human [60]. Milk Ring Test (MRT) is employed for the detection of *Brucella* organisms in infected animals [62].

Serum Agglutination Test (SAT)

Globally, this test has been used for the detection of brucellosis in infected animals and humans for decades [63]. However, there are some drawbacks associated with this technique, which limit its utility. This test is unable to distinguish natural *Brucella* infections from the vaccination effect. It is also unable to detect *Brucella*-specific antibodies after abortion in infected animals and during the chronic phase of brucellosis [48, 50].

Rose Bengal Plate test (RBPT)

Rose Bengal test is usually used for the diagnosis of brucellosis in most countries. It has been effectively used for screening domestic animals, wildlife and the human population [64]. The probability of obtaining false-negative data is very rare. However, there is a possibility of getting false-negative results during the early stages of infection, whereas false-positive results can occur due to vaccination and cross-reactivity [48].

Milk Ring Test (MRT)

This test is used for the screening of domestic animals to detect brucellosis infection [48]. However, the major limitation of this test is its very low sensitivity compared to other techniques such as ELISA [65]. The comparison of the MRT and ELISA techniques by testing milk and sera, respectively, obtained from the same female animals indicate that the ELISA test revealed more positive animals as compared to MRT [59]. Low sensitivity of the Milk ring test is attributed to mastitis, vaccination with S19, temperature variations and the use of soured milk in the test [48].

Complement Fixation Test (CFT)

The major advantage of the complement fixation test is its high specificity and sensitivity and it is a commonly used test for serological detection of brucellosis infection in domestic animals and humans [66]. Non-specific reactions are not an issue in the Complement Fixation Test. Moreover, unlike the Serum agglutination test, the CFT is more suitable for screening brucellosis infection during the chronic stage of the disease.

Enzyme Linked – Immunosorbent Assay (ELISA)

The diagnosis of *Brucella* infection has improved through the development of ELISA technology [55, 65]. Among various ELISA methods, the Competitive ELISA (c-ELISA) is more robust, very sensitive, and highly specific. The c-ELISA has the capability to differentiate naturally infected animals from the vaccinated ones and also has the ability to rule out animals infected with cross-reacting microorganisms. The c-ELISA can be performed by using the serum as well as milk samples from different animal species without compromising the sensitivity and specificity [64, 67].

13. Molecular diagnostic methods

Currently, molecular biology techniques are being used extensively to identify the causative agents, as these techniques are less time-consuming, have high specificity and sensitivity to detect microorganisms [60, 68]. In addition, restriction endonuclease and hybridization have been used extensively for decades for *Brucella* detection [14, 69].

PCR is very sensitive, highly specific, rapid, and easily amenable for high-throughput screening. It is also more suitable for the detection of slow-growing bacteria such as *Brucella* [70]. Due to its very high sensitivity, the PCR based method has the capability to detect tiny amounts of bacteria in clinical samples. It has also been demonstrated that the PCR technique is able to detect dead microbes in clinical samples, hence reducing the need for proper sample preservation before analysis [71]. This method of detecting *Brucella* infection is highly reproducible and very reliable, however, care should be taken to avoid contamination during analysis in the laboratory [72].

PCR-based protocols for the detection of *Brucella* spp. in clinical samples have been designed and developed. These methods are based on the amplification of gene BCSP31 which is highly conserved among *Brucella* spp., or the amplification of the 16S rRNA gene [72]. This approach is useful for screening when biovar or species designation is not critical. In order to distinguish *Brucella* species or biovar, PCR protocols have been developed based on gene loci, which vary among biovars

and species. However, such gene targets are not common in *Brucella*, as the genus is unusually homogeneous and conserved. While few deletions and rearrangements have been found within a biovar or species, most of the differences at genetic levels consist of single nucleotide polymorphisms [69]. Differential PCR based methods are of great value for epidemiological studies, disease monitoring, and species-specific eradication program. The differential PCR protocols can be denoted as species-specific and genus specific. In the case of species-specific methods, three approaches have been reported (i) protocols designed with highly specific primers and stringent assay conditions; (ii) protocols developed with low-specific primers and less stringent PCR conditions, and (iii) protocols designed with random primers under very flexible assay conditions [73, 77].

14. Control and prevention of brucellosis

Brucellosis is an infectious disease that has been controlled and eradicated in some countries in the world [3]. In sub-Saharan Africa, animal health services have been substantially deteriorated over the last 20 years due to various factors such as reduction in government budgets, especially the funds required to control brucellosis [81]. Hence, various programs that require the use of disease prevention measures, information exchange, and coordinated surveillance, are not properly implemented in many sub-Saharan countries [2, 18, 42, 82].

The primary objectives for the control and prevention of brucellosis are centered on the economic impacts of the disease and its public health consequences [73]. Control activities mainly reported by countries include surveillance, controlling the movement of domestic animals, treatment of meat and milk products and animal vaccination, [3, 42, 84]. In Mozambique, the control of brucellosis was well organized by using the S19 vaccine in cattle until 1980. A strain 19 vaccine produced by the Underreport Veterinary Institute in South Africa containing viable *Brucella* cells was used. The vaccine was administered subcutaneously to heifer calves at four to eight months of age. However, recently some private farmers have been using S19 vaccination in adult cows. Also, surveillance and movement control were also implemented at a very low level, resulting in a drastic increase in cases of brucellosis. *Brucella abortus* vaccine, strain RB-51, live culture, licensed in 1996, has been extensively used in USA to eradicate brucellosis [73–77].

Antibodies against *Brucella* cell wall O-polysaccharide (OPS) component of smooth lipopolysaccharide is known to confer protective efficacy to the currently used vaccines. However, the detection of these antibodies is

also used in diagnosis of brucellosis in animals, and so it becomes very difficult to differentiate vaccinated animals from infected animals and this hampers the effort to control the disease [75]. In order to sort out this issue, it has been proposed that combining anti-*Brucella* OPS antibody response with the induction of cell-mediated response would provide highly effective protection against brucellosis which can be achieved by the conjugation of O-polysaccharide (OPS) to a highly immunogenic *Brucella* protein. Such type of glycoconjugate vaccine would be more effective in protecting animals and humans against brucellosis and would not interfere with the diagnostic testing for *Brucella* infection [75].

Acknowledgments

This work was supported by the King Abdul Aziz City for Science and Technology in the Kingdom of Saudi Arabia, Grant No. (1-18-01-009-0009). The authors also acknowledge assistance from the Science and Technology Unit, Deanship of Scientific Research and Deanship of Graduate Studies and acknowledge assistance from the Dept. of Biological Sciences, Faculty of Science, King Abdul Aziz University (KAU), Jeddah, KSA.

References

1. Corbel M.J.: Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* **3**, 213–221 (1997)
2. Wang W, Lu X., Li C., Ri M.J., Cui W.: A man with recurrent fever, arthritis, and rashes-brucellosis. A case reports. *BMC Inf. Dis.* **20**, 1–4 (2020)
3. Shi Y, Gao H., et al.: Clinical features of 2041 human brucellosis cases in China. *PLoS One*, **13**, e020550 (2018)
4. Zheng R., Xie S., et al.: A systematic review and meta-analysis of epidemiology and clinical manifestations of human brucellosis in China. *Biomed. Res. Int.* 5712920 (2018)
5. Crawford R.P., Huber J.D., Adams B.S. (1990). Epidemiology and Surveillance. In: Animal brucellosis. Edited by Nielsen, K and Duncan, I.R. Boca Raton, Florida. CRe Press. pp. 131–151.
6. Corbel M.J., Beeching N.J.: Brucellosis, Chapter 141. Pp. 914–917. In: Harrison's textbook of Internal Medicine, 16th ed.; McGraw-Hill, New York. (2004)
7. Ghorbani A., Rabbani K.M., Zarkesh-Esfahani H., Shari-fiyazd I.H., Dehghan K.A, Emami H.: Comparison of serology, culture, and PCR for detection of brucellosis in slaughtered camels in Iran. *Comp. Clin. Path.* **22**, 913–917 (2013)
8. Khamesipour F, Doosti A., Taheri H.: Molecular detection of *Brucella* spp. in the semen, testis and blood samples of cattle and sheep. *J. Pure Appl. Micr.* **7** (Suppl. Edn.) 495–500 (2013)
9. Khamesipour F, Rahimi E., Shakerian A., Doosti A., Momtaz H.: Molecular study of the prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in the blood and lymph node samples of slaughtered camels by polymerase chain reaction (PCR) in Iran. *Acta Vet. Beog.* **64**, 245–256 (2014)
10. Roth F, Zinsstag J, Orkhon D., Chimed-Ochir G., Hutton G.: Human health benefits from livestock vaccination for brucellosis: case study. *Bull. W. Health Organ.* **81**, 867–876 (2003)
11. FAO: Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance. FAO Animal Production and Health Paper 156, Rome, Italy, pp. 1–45. (2003)

12. Corbel M.J., MacMillan A.P.: Brucellosis, Chapter 41. Volume III. In: Topley and Wilson's, Microbiology and microbial infections, 9th ed.; Hausler W.J., Sussman M., eds. Arnold, London (1999)
13. Baily G.G., Krahn L.B., Drasar B.S., Stoker N.G.: Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* **95**, 271–275 (1992)
14. Ghassan M., Issam A.K., Alex M.A.: Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J. Clin. Micro.* **477**–478 (1996)
15. Sabir J., Mutawakil M., EL-Hanafy A., Al-Hejin A., Sadek M.A., Abou Alsoud M., Qureshi M., Saini K., Ahmed M.M.: Applying molecular tools for improving livestock performance: From DNA markers to next generation sequencing technologies. *J. Food Agr. & Env. JFAE.*, **12**, 541–553 (2014)
16. Ageely H., Bani I., Gaffar A.: Prevalence and risk factors for Brucellosis in Jazan province, Saudi Arabia. *Trop. J. Pharm. Res.* **15**, 189–194 (2016)
17. Bansal Y., Aggarwal A., Gadepalli R., Nag V.L.: Seroprevalence of brucellosis in Western Rajasthan: A Study from a Tertiary Care Centre, Wolters Kluwer – Medknow, **30**, 226–230 (2020)
18. Deka R.P., Magnusson U., Grace D., Lindahl J.: Bovine brucellosis: Prevalence, risk factors, economic cost and control options with eference to India – A review. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **8**, 1556548 (2018)
19. Shome R., Kalleshmurthy T. et al.: Prevalence and risk factors of brucellosis among veterinary health care professionals. *Pathog. Glob Health* **111**, 234–239 (2017)
20. Patil D.P., Ajjantha G.S. et al.: Trend of human brucellosis over a decade at tertiary care centre in North Karnataka. *Indian J. Med. Microbiol.* **34**, 427–432 (2016)
21. Mani S.S., Gunasekaran K.: Clinical spectrum, susceptibility profile, treatment and outcome of culture-confirmed brucellosis from South India. *Indian J. Med. Microbiol.* **36**, 289–292. (2018)
22. Fallatah S.M., Oduloju J.S., Al-Dusari N.S., Fakunle M.Y.: Human brucellosis in Northern Saudi Arabia. *Saudi. Med. J.* **26**, 1562–1566 (2005)
23. Elfaki M.G., Alaidan A.A., Al-Hokail A.A.: Host response to *Brucella* infection: review and future prespective. *J. Infect. Dev. Ctr.* **9**, 697–701 (2015)
24. Memish Z., Mah M.W.: Brucellosis in laboratory workers at a Saudi Arabian hospital. *Am. J. Infect. Control.* **29**, 48–52 (2001)
25. Cooper C.W.: Risk factors in transmission of brucellosis from animals to humans in Saudi Arabia. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**, 206–209 (1992)
26. Malik A.M.A.: Clinical Study of Brucellosis in Adults in the Asir Region of Southern Saudi Arabia. *J. Trop. Med. Hyg.* **6**, 375–377 (1997)
27. Kiel F.W., Khan M.Y.: Brucellosis in Saudi Arabia. *Soc. Sci. Med.* **29**, 999–1001 (1989)
28. Al Sekait M.A.: Seroepidemiological survey of brucellosis antibodies in Saudi Arabia. *Ann. Saudi Med.* **19**, 219–222 (1999)
29. Morgan W.J.B., Mackinnon D.J., Lawson J.R., Cullen G.A.: The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Vet. Rec.* **85**, 636–641 (1969)
30. Halling S.M., Peterson-Burch B.D., Bricker B.J., Zuerner R.L., Qing Z., Li L.L., Kapur V., Alt D.P., Olsen S.C.: Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* **187**, 2715–2726 (2005)
31. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidi N., Christou L., Tsianos E.V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 91–99 10 (2006)
32. World Health Organization (WHO): Brucellosis in humans and animals. Geneva, Switzerland: WHO Press. (2006)
33. Alto G., Jones L., Angus R., Verger J.: Techniques for the brucellosis laboratory. 1st edn. Tech. rep., Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. Referred to in Lopez-Gñi and O'Callaghan, (2012)
34. Lindquist D., Chu M.C., Probert W.W.S.: *Francisella* and *Brucella*. In: Manual of Clinical Microbiology, 9th ed., Murray P.R., Baron E.J.O., Jorgensen J.H., et al. (eds.), ASM Press, Washington, D.C. pp. 824. (2007)
35. Paulsen I.T., Seshadri R.: The *Brucella suis* genome reveal fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Prot. of Nat. Acad. of Sci. USA*, **99**, 13148–13153 (2002)
36. Blasco J.M., Diaz R.: *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet*, **342**, 805 (1993)
37. OIE: Bovine Brucellosis. In: Diagnostic technique manual of standards for diagnostic tests and vaccine 4th ed., Paris: Office International Des Epizooties, pp. 328–345. Seifert S.H., Tropical animal health. (2nd edn), Kluwer Academic Publishers, London, UK (2000)
38. Ragan V.E.: The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. *Vet. Microbiol.* **90**, 11–18 (2002)
39. Blasco J.M., Molina-Flores B.: Control and eradication of brucellosis. veterinary clinics of North America: *F. Ani. Med.* **27**, 95–104 (2011)
40. Lucero N.E., Ayala S.M., Escobar G.L., Jacob N.R.: *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epid. Inf.* **136**, 496–503 (2008)
41. Godfroid J., Scholz C.H., et al.: Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev. Vet. Med.* **102**, 118–131 (2011)
42. McDermont J.J., Arimi S.M.: Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Vet. Microbiol.* **20**, 111–134 (2002)
43. Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W., Constable P.D.: Diseases associated with *Brucella* species. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Elsevier Limited. Ragan, V.E., The Animal and Plant Health Inspection, 2007
44. Omer M.K., Skjerve E, Holstad G., Woldehiwet Z., Macmillan A.P.: Prevalence of antibodies to *Brucella* spp. in cattle, sheep, goats horses and camels in the state of Eritrea; Influence of husbandry system. *Epid. Inf.* **125**, 447–455 (2000)
45. Bekele W.A., Tessema T.S., Melaku, S.K.: Camelus dromedarius brucellosis and its public health associated risks in the Afar National Regional State in north eastern Ethiopia. *Acta Vet. Scand.* **5**, 1–8 (2013)
46. Tuli G.: Seroprevalence of Brucellosis in Cattle Slaughtered at Debre Zeit Elfora and Municipality Abattoirs and Evaluation of the Risk of Infection Abattoir Workers. Addis Ababa: Msc Thesis, Addis Ababa University, Akililu Lemma Institute of Pathobiology, 2009
47. Makita K., Fevre M.E., Waiswa C., Kaboyo W., De Clare Bronsvoort M.B., Eisler C.M., Welburn C.S.: Human brucellosis in urban and peri-urban areas of Kampala, Uganda. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1149**, 309–311 (2008)
48. Bishop G.C., Bosman P.P., Herr S.: Bovine brucellosis: in infectious diseases of livestock with special reference to Southern Africa. Edited by J.A.W Coetzer G.R, Thomson and R.C Tustin, Oxford University Press UK, p. 1053–1066, 1994
49. Ariza J., Gudiol F., Pallares R.: Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampin or doxycycline plus streptomycin: a randomized, double blind study. *Ann. Intern. Med.* **117**, 25–30 (1992)

50. Swai E.S., Moshy W., Mbise E., Lutatina J. and Bwanga S.: Disease and health conditions affecting camel production in pastoral and agro-pastoral communities of northern Tanzania. *Res. Opinion. Anim. Vety. Sci.* **1**, 83–88 (2011)
51. Kubuafor D.K., Awumbila B., Akanmori B.D.: Seroprevalence of brucellosis in cattle and humans in the Akwapim-South district of Ghana: public health implications. *Acta Trop.* **76**, 45–48 (2000)
52. Abram S.B.: Control of communicable diseases in man. 14th Ed. American Public Health Association, Washington. pp. 453, 1985
53. Benjamin B., Annobil S.H.: Childhood brucellosis in south-western Saudi Arabia: A 5-year experience. *J. Trop. Ped.* **38**, 167–172 (1992)
54. Lulu A.R., Araj G.F., Khateeb M.I., Mustafa M.Y., Yusufu A.R., Fenech F.F.: Human brucellosis in Kuwait: A prospective study of 400 cases. *Quarterly J. Med.* **66**, 39–54 (1988)
55. Schussler J.M., Fenves, A.Z., sutker W.L.: Intermittent fever and pancytopenia in a young Mexican man. *South. Med. J.* **10**, 1037–1039 (1997)
56. WHO: The development of new/Improved brucellosis vaccines Report of a WHO meeting. Geneva, Switzerland 11–12 Dec 1997 (1998)
57. Yamout B.I., Nassar N.T., Ghayad E., Habdi A.: Neurobrucellosis, presentation, treatment and outcome in seven cases. *Medit. J. Inf. Par. Dis.* **11**, 111–115 (1996)
58. Pouillot R., Garin-Bastuji B., Gerbier G., Coche Y., Cau C., Dufour B., Moutou F.: The brucellin skin test: A tool to discriminate false positive serological reaction in bovine brucellosis. *Vet. Res.* **28**, 365–374 (1997)
59. Abdel-Hafeez M.M., Abdel-Kadder H.A., Bastawros A.F., El-Ballal S.S., Hamdy M.E.R.: Bacteriological and pathological studies on *Brucella melitensis* infection in a dairy farm. Proceedings of the Third Scientific Congress of the Egyptian Society for Cattle Diseases. *Assuit, Egypt*, **2**, 266–274 (1995)
60. Fuerst R.: Microbiology i health and diseases 15th ed. W.B. Saunders Co. London, pp. 669, 1983
61. Mohan K., Mkaya P.V., Muvavarirwa P., Matope G., Mahembe E., Pawandiwa A.: Brucellosis surveillance and control in Zimbabwe: bacteriological and serological investigation in dairy herds. *J. Vet. Res.* **63**, 47–51 (1996)
62. Orner M.K., Skjerve E., MacMillan A.P., Woldehiwet Z.: Comparison of three serological tests in the diagnosis of *Brucella* infection in unvaccinated cattle in Eritrea. *Pre. Vet. Med.* **48**, 215–222 (2001)
63. Vanzini V.R., Aguirre N.P., Valentini B.S., Torioni de Echaide S., Lugaresi C.I., Marchesino M.D., Nielsen K.: Comparison of an indirect ELISA with the *Brucella* milk ring test for detection of antibodies to *Brucella abortus* in bulk milk samples. *Vet. Microbiol.* **82**, 5–60 (2001)
64. Orner M.K., Skjerve E., Woldehiwet Z., Holstad G.: Risk factors for *Brucella* spp. infection in dairy cattle farms in Asmara, State of Eritrea. *Prev. Vet. Med.* **46**, 257–265 (2000)
65. Queipo-Ortuno M.I., Morata P., Dcon P., Manchado P., Colmenero D.J.: Rapid diagnosis of Human brucellosis by peripheral blood PCR assay. *J. Cli. Microb.* **35**, 2929–2930 (1997)
66. Tenover F.C.: Diagnostic Deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin. Microb. Rev.* **1**, 82–101 (1988)
67. Bricker B.J., Halling S.M.: Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 2660–2666 (1994)
68. Bricker B.J., Ewalt D.R., Olsen S.C., Jensen A.E.: Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J. Vet. Diag. Inv.* **15**, 374–378 (2003)
69. Banai M.: Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet. Microbiol.* **90**, 497–519 (2002)
70. Smits H.L., Abdoel T.H., Solera J., Clavijo E., Diaz R.: Immunochromatographic *Brucella*-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clin. Diag. Lab. Immun.* **10**, 1141–1146 (2003)
71. Blasco J.M., Diaz R.: *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet*, **342**, 805 (1993)
72. Nicoletti P.V.: In Animal brucellosis. Edited by Nielsen K., Duncan J.R Boca Raton, Florida. CRC Press. pp. 283–299 (1990)
73. Blasco J.M.: A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* **31**, 275–283 (1997)
74. Fero E., Juma A., Koni A., Boci J., Kirandjiski T., Connor R., Wareth G., Koleci X.: The seroprevalence of brucellosis and molecular characterization of *Brucella* species circulating in the beef cattle herds in Albania. *PLOS ONE*, **5**, pp. 1–14, 2020
75. Bundle D.R., McGiven J.: Brucellosis Improved diagnostics and vaccine insights from synthetic glycans. *Acc. Chem. Res.* **50**, 2958–2967 (2017)
76. Scholz H.C., Revilla-Fernandez S., et al.: *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *Inter. J. Sys. Evo. Micro.* **66**, 2090–2098 (2016)
77. Lemos T.S., Cequinel J.C., et al.: Outbreak of human brucellosis in Southern Brazil and historical review of data from 2009 to 2018. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **12**, e0006770 (2018)

GENEROWANIE MOSTKÓW DISIARCZKOWYCH W BIAŁKACH – RÓŻNORODNOŚĆ STRUKTURALNA I FUNKCJONALNA BIAŁEK DSBA

Anna Marta Banaś, Anna Petrykowska, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka*

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano w październiku 2020 r.

Streszczenie: Białka Dsb katalizują wprowadzanie mostków disiarczkowych pomiędzy grupami tiolowymi reszt cysteinowych do białek pozacytoplazmatycznych w komórkach bakterii. Proces ten warunkuje osiągnięcie przez białka prawidłowej struktury, umożliwiającej pełnienie funkcji w komórce. Najlepiej poznanym i scharakteryzowanym białkiem zaangażowanym w proces wprowadzania mostków disiarczkowych jest monomeryczna oksydoreduktaza DsbA, działająca w komórkach modelowego organizmu *Escherichia coli*. Badania wielu mikroorganizmów pokazały ogromną różnorodność funkcjonowania szlaku wprowadzania mostków disiarczkowych. W prezentowanej pracy zebrano informacje charakteryzujące wyodrębnione strukturalne i filogenetyczne grupy białek DsbA różnych gatunków bakterii. Opiszano ich właściwości fizykochemiczne a także oddziaływanie z partnerami redoks oraz substratami. Skoncentrowano się również na opisanu dimerycznych białek, pełniących rolę w procesie wprowadzania mostków disiarczkowych. Ponieważ białka Dsb decydują często o aktywności czynników wirulencji, poznanie ich struktury i mechanizmów działania może przyspieszyć opracowanie nowych terapii antybakteryjnych.

1. Wstęp. 2. System białek Dsb *Escherichia coli*. 2.1. Charakterystyka tiolowej oksydoreduktazy *E. coli* – białka DsbA. 2.2. Białka szlaku izomerizacji-redukcji. 3. Klasyfikacja monomerycznych białek DsbA. 3.1. Fizyczno-chemiczne właściwości różnych grup DsbA. 4. Oddziaływanie DsbA z dwiema grupami substratów – partnerami redoks oraz substratami. 4.1. Oddziaływanie z partnerami redoks. 4.2. Oddziaływanie z substratami. 5. Dimeryczne oksydoreduktazy o aktywności oksydacyjnej. 6. Podsumowanie. 7. Piśmiennictwo

DISULFIDE BONDS FORMATION IN BACTERIAL PROTEINS – STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DIVERSITY AMONG DSBA PROTEINS

Abstract: Bacterial proteins of the Dsb (disulfide bond) system catalyze the formation of disulfide bridges, a post-translational modification of extra-cytoplasmic proteins, which leads to stabilization of their tertiary and quaternary structures and often influences their activity. DsbA – *Escherichia coli* monomeric oxidoreductase is the best studied protein involved in this process. Recent rapid advances in global analysis of bacteria have thrown light on the enormous diversity among bacterial Dsb systems. The set of Dsb proteins involved in the oxidative pathway, varies, depending on the microorganism. In this article we have focused on characterization of structural and phylogenetic groups of monomeric DsbAs. This review discusses their physicochemical features and interactions with redox partners as well as with substrate proteins. The last part of the review concentrates on dimeric oxidoreductases responsible for disulfide generation. Many virulence factors are the substrates of the Dsb proteins. Thus unraveling the machinery that introduces disulfide bonds and expanding knowledge about Dsb protein structures and their activities may facilitate the discovery of an effective anti-bacterial drugs.

1. Introduction. 2. *Escherichia coli* Dsb system. 2.1. Characteristic of the *E. coli* thiol oxidoreductase – DsbA. 2.2. Isomerization / reduction pathway proteins. 3. Classification of the monomeric DsbAs. 3.1. Physicochemical features of different classes of DsbAs. 4. DsbA interactions with redox partner and substrates. 4.1. DsbA interactions with redox partner. 4.2. DsbA interactions with substrates. 5. Dimeric Dsb proteins with oxidative activity. 6. Conclusions. 7. References

Słowa kluczowe: białka Dsb, dimeryczne oksydazy Dsb, EcDsbA, klasyfikacja DsbA, mostki disiarczkowe

Key words: Dsb proteins, dimeric Dsb oxidases, EcDsbA, DsbA classification, disulfide bonds

1. Wstęp

Procesy utleniania i redukcji reszt cysteinowych białek odgrywają istotną rolę w wielu procesach zachodzących w komórkach, pełniąc rolę strukturalną, katalityczną oraz sygnalizacyjną. Generowanie mostków disiarczkowych, będących kowalencyjnymi wiązaniami wytwarzanymi w reakcji utleniania reszt cysteinowych

białek, jest istotnym elementem procesu dojrzewania protein zapewniającym ich funkcjonalność poprzez wpływ na ich konformację i stabilność. W komórkach bakterii Gram-ujemnych proces ten zachodzi w utleniających warunkach przestrzeni peryplazmatycznej i jest katalizowany przez zespół białek Dsb (disulfide bond). W strukturze przestrzennej białek Dsb wyróżnia się domenę tioredoksyny (TRX) ze ściśle konserwowanym,

* Autor korespondencyjny: prof. dr hab. Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka, Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

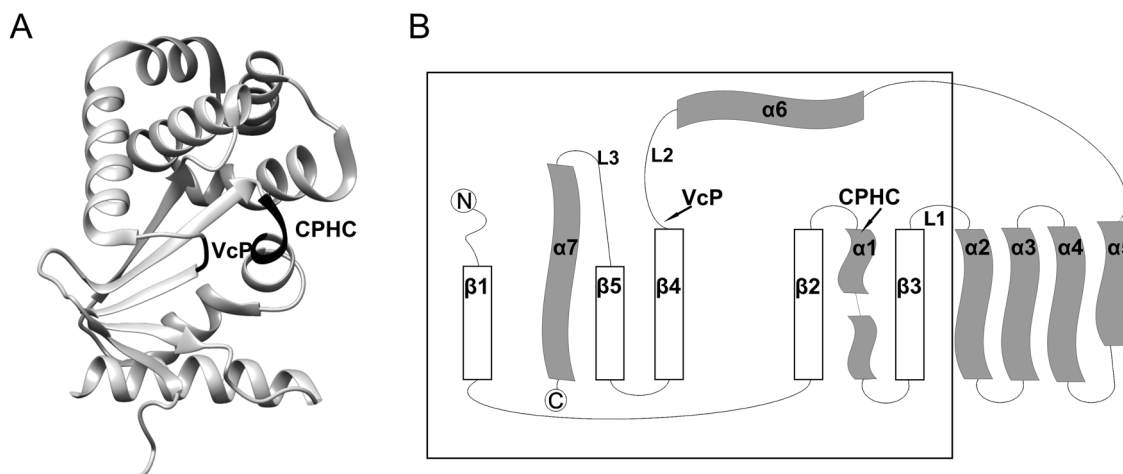
aktywnym motywem CXXC oraz tak zwaną pętlę prolinową (reszta cis-proliny w strukturze przestrzennej białka sąsiadująca z motywem CXXC i oddziałująca z cysteiną aktywną w reakcji redoks). Oba te elementy odgrywają istotną rolę w oddziaływaniach białek Dsb z ich partnerami redoks i substratami. Ponieważ czynniki wirulencji wielu patogennych bakterii to białka pozacytoplazmatyczne, które dla osiągnięcia właściwej struktury wymagają wprowadzenia mostków disiarczkowych, aktywność systemów Dsb jest istotną determinantą zjadliwości mikroorganizmów. Rozwiązanie struktur białek Dsb oraz zrozumienie mechanizmów ich działania zapoczątkowało badania zmierzające do wykorzystania ich jako celów leków antybakteryjnych [6, 58]. Wykorzystanie różnorodnych strategii (mikrobiologicznych, biochemicznych, biofizycznych, bioinformatycznych czy proteomicznych) zaowocowało w ostatnich latach szczegółową charakterystyką funkcjonowania sieci Dsb modelowej bakterii *Escherichia coli* (EcDsb). Dane te przedstawia wiele znakomitych publikacji przeglądowych. Ostatnio opublikowane to między innymi [3, 40, 43]. Doskonalenie metod sekwencjonowania materiału genetycznego ujawniło różnorodność systemów Dsb w świecie mikroorganizmów. Różnice dotyczą liczby białek Dsb konkretnej kategorii, ich wzajemnych interakcji oraz struktur i obserwowane są nie tylko pomiędzy przedstawicielami różnych rodzajów czy gatunków, ale także czasami pomiędzy szczepami tego samego gatunku bakterii [8, 18, 42]. Prezentowana praca przeglądowa przedstawia charakterystykę białek DsbA bezpośrednio odpowiedzialnych za wprowadzanie mostków disiarczkowych do białek pozacytoplazmatycznych bakterii Gram-ujemnych. Koncentruje się na uzyskanych w ostatnich latach danych dotyczących ich struktur, filogenezy oraz oddziaływań z partnerami redoks i substratami.

2. System białek Dsb *Escherichia coli*

2.1. Charakterystyka tiolowej oksydoreduktazy *Escherichia coli* – białka DsbA

Modelowym i najdokładniej scharakteryzowanym w wielu aspektach białkiem DsbA jest EcDsbA. Zostało ono zidentyfikowane w roku 1991 a jego strukturę rozwiązano w roku 1993 [5, 44]. EcDsbA (21 kDa) jest monomerem składającym się z dwóch domen: tioredoksynowej i helikalnej (Ryc. 1). Domena tioredoksynowa (około 90 reszt aminokwasowych) zawiera pięć β -katek/harmonijek połączonych trzema α -helisami (H1, H6 i H7). Helisy H2-H5 tworzą domenę helikalną. Cechą charakterystyczną EcDsbA jest obecność α -heliakalnej domeny wewnątrz domeny tioredoksynowej. Centrum katalityczne tworzy motyw CXXC (CPHC) zlokalizowany na N-końcu helisy H1, otoczony trzema pętlami. Pętla pierwsza (L1) łączy harmonijkę $\beta 3$ i helisę H2, pętla druga (L2) określana jako pętla cisPro (cisPro loop) łączy fragmenty H6 i $\beta 4$, a pętla 3 (L3) łączy fragmenty $\beta 5$ i H7. Wytworzony na powierzchni EcDsbA, powyżej aktywnego motywu, hydrofobowy rowek oraz ładunek powierzchniowy decydują o aktywności enzymatycznej białka, jego oddziaływaniach z substratami, zarówno partnerem redoks jak i białkami do których wprowadzane są mostki disiarczkowe [57]. W przeciwieństwie do większości białek peryplazmatycznych przenoszonych do peryplazmy po zakończeniu procesu translacji, DsbA jest transportowane przez błonę wewnętrzną komórki kotranslacyjnie, w sposób zależny od SRP (signal recognition particle) z wykorzystaniem translokonu SecYEG [56].

DsbA katalizuje tworzenie wiązań disiarczkowych bezpośrednio po transporcie białka do peryplazmy, a jego substraty mogą być na różnych etapach związania.



Ryc. 1. Struktura białka DsbA pochodzącego z *Escherichia coli*

A) Struktura przestrzenna białka DsbA *E. coli* (PDB, 1FVK [20]). W kolorze czarnym zaznaczono lokalizację motywów katalitycznych CPHC oraz VcP. (B) Schematyczne ułożenie elementów strukturalnych białka EcDsbA. W ramce zaznaczono domenę tioredoksynową (opis w tekście). β -kartki są reprezentowane przez prostokąty, α -helisy – przez faliste czworokąty.

W warunkach *in vivo* proces ten wymaga współdziałania kilku oksydoreduktaz warunkujących transport elektronów. Proces rozpoczyna się od nukleofilowego ataku zredukowanej cysteiny białka, które jest substratem dla DsbA. Atak dokonywany jest na N-terminalną, zlokalizowaną na powierzchni białka cysteinę C30 motywu CPHC DsbA. Ukryta we wnętrzu DsbA cysteina C33 nie bierze udziału w tym procesie. W wyniku tej reakcji powstaje przejściowy kompleks pomiędzy DsbA i substratem. W następnym etapie, kolejna cysteina białka substratowego przeprowadza atak na cysteinę połączoną z DsbA. Następuje utlenienie substratu i redukcja białka DsbA [13].

Partnerem redoks DsbA, odpowiadającym za odtworzenie jego utlenionej aktywnej formy, jest białko błony wewnętrznej EcDsbB. W jego sekwencji aminokwasowej obecne jest sześć reszt cysteinowych, spośród których cztery są niezbędne do ponownego utlenienia DsbA. W strukturze przestrzennej EcDsbB wyróżniono cztery helisy transmembranowe (TM1-TM4) oraz dwie pętle peryplazmatyczne P1 i P2, w obrębie których występują dwie aktywne pary cystein: Cys41-Cys44 w pętli P1 oraz Cys104-Cys130 w pętli P2 [23]. Reakcja ponownego utlenienia białka EcDsbA przez białko EcDsbB rozpoczyna się od nukleofilowego ataku Cys30 motywu katalitycznego białka DsbA na disiarczek Cys104-Cys130 białka DsbB. Skutkuje to powstaniem przejściowego mostka disiarczkowego pomiędzy Cys30 (EcDsbA) a Cys104 (EcDsbB) i przeniesieniem wiązania na EcDsbA. Powstałe grupy tiolowe Cys104 i Cys130 EcDsbB są ponownie utleniane przez parę reszt cysteinowych pętli pierwszej (Cys41-44), a elektrony są przekazywane na chinon, a następnie na tlen (warunki tlenowe) lub fumaran/azotan (warunki beztlenowe) [24].

2.2. Białka szlaku izomeryzacji-redukcji

Białko DsbA skutecznie i szybko katalizuje reakcje powstawania wiązań disiarczkowych pomiędzy cysteinami białka transportowanego do peryplazmy. Utlenianie reszt cysteinowych zachodzi w sposób zgodny z ich kolejnością w łańcuchu aminokwasowym. Białka, które wymagają wprowadzania wiązań disiarczkowych pomiędzy niesąsiadującymi resztami cysteinowymi, w takiej sytuacji nabywają złą konformację. Są one degradowane przez proteazy peryplazmatyczne albo izomeryzowane z powrotem do prawidłowego utlenionego stanu, przez izomerazę disiarczkową EcDsbC [43, 44]. EcDsbC (23 kDa) jest homodimerem o V-kształtnej strukturze. Każdy monomer złożony jest z dwóch domen: C-koniec zawiera domenę TRX z motywem CXXC (Cys98 i Cys101), o właściwościach katalitycznych, natomiast N-koniec domenę dimeryzacyjną [45]. Aktywną formą EcDsbC jest jego forma zredukowana. Proces dimeryzacji białka DsbC jest kluczowy w jego

aktywności, zapobiega bowiem jego utlenianiu przez EcDsbB [2]. EcDsbC jest utrzymywane w zredukowanej formie przez aktywność błonowego EcDsbD, transportującego w wieloetapowym procesie elektrony z cytoplazmy. EcDsbD, zawierające w sekwencji aminokwasowej sześć reszt cysteinowych, składa się z ośmiu transbłonowych segmentów (domena β) i dwóch domen peryplazmatycznych (N- i C-koniec białka, nazywane odpowiednio α i γ domenami). Cysteiny EcDsbD są niezbędne do transportu elektronów z cytoplazmatycznej tioredoksyny, poprzez domeny β , γ i α EcDsbD do peryplazmatycznych tiolowych oksydoreduktaz [11, 31]. Poza EcDsbC, substratami EcDsbD są EcDsbG oraz EcCcmG. EcDsbG (26 kDa) to dimeryczna peryplazmatyczna tiolowa oksydoreduktaza o strukturze podobnej do EcDsbC lecz odmiennej funkcji. Jej aktywność redukująca chroni białka posiadające pojedyncze cysteiny przed utlenieniem do kwasu sulfonowego [14, 21]. EcCcmG (cytochrome c maturation system) jest błonowym białkiem biorącym udział w procesie biogenezy cytochromu c [52].

3. Klasyfikacja monomerycznych białek DsbA

Przez ostatnie trzy dekady opisano wiele białek rodziny DsbA, obecnych w proteomach różnych gatunków bakterii, przedstawicieli typów Proteobacteria, Firmicutes czy Actinobacteria. Struktury rozwiązano dla ponad dwudziestu. Wszystkie białka homologii DsbA, pomimo często niskiej identyczności sekwencji aminokwasowej, posiadają podobną architekturę – domenę tioredoksynową z wbudowaną domeną heliakalną. Badania strukturalne, prowadzone zarówno metodą klasycznej rentgenowskiej krystalografii jak i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR-nuclear magnetic resonance), w połączeniu z analizami cech biochemicznych i biofizycznych białek umożliwiły podział tej rodziny na dwie klasy: klasa DsbA-I z podziałem na DsbA-Ia i DsbA-Ib oraz klasa DsbA-II. Prawdopodobnie, po poznaniu struktur większej liczby białek, w klasie II również będzie konieczne wyróżnienie kilku podklas [47]. Podział białek DsbA w oparciu o analizy filogenetyczne pokrywa się z podziałem bazującym na analizach strukturalnych [59]. W tych badaniach wyróżniono trzy kłady. Pierwszy z nich grupuje białka Dsb blisko spokrewnione z EcDsbA z komórek Gammaproteobacteria, takich jak np. *Klebsiella pneumoniae* (KpDsbA), *Shigella flexnerii* (SfDsbA), *Salmonella enterica* (SeDsbA i SeSgrA) czy *Proteus mirabilis* (PmDsbA) i odpowiada poprzednio opisaną grupie DsbA-Ia [35, 36, 60, 66]. Białka o wysokiej (około 80%) identyczności sekwencji aminokwasowej do EcDsbA (z wyjątkiem PmDsbA – 59% identyczności) należące do tej grupy, posiadają podobnie jak EcDsbA długi

hydrofobowy rowek otaczający motyw aktywny, który jest identyczny jak ten w EcDsbA (CPHC oraz cis-prolina poprzedzona walina).

Do kładu pierwszego zaliczane są też białko DsbA z *Vibrio cholerae* (VcDsbA – 40% identyczności sekwencji aminokwasowej z EcDsbA) oraz białka DsbL (dodatkowe białka DsbA występujące w niektórych szczepach *E. coli* czy *S. enterica*). Motyw aktywny oraz potencjał redoks VcDsbA są zbliżone do wartości charakterystycznych dla EcDsbA ale jego struktura posiada cechy charakterystyczne dla grupy DsbA – Ib (patrz niżej) [63]. W wypadku białek DsbL zarówno ich właściwości (potencjał redoks, specyficzność substratowa) jak i architektura (skrócony hydrofobowy rowek oraz ładunek powierzchniowy) odbiegają od cech EcDsbA [18, 22].

Przedstawicielami kładu drugiego (uprzednio nazwany DsbA-Ib) są białka DsbA Gamma- oraz Betaproteobakteria np. *Pseudomonas aeruginosa* PaDsbA1, *Neisseria meningitidis* NmDsbA1 i NmDsbA3 czy *Burkholderia pseudomallei* BpDsbA [26, 38, 46, 61, 62]. Ta grupa nie jest tak homogenna jak wyżej opisana i pod różnymi aspektami odbiega od prototypowego białka EcDsbA. Identyczność sekwencji aminokwasowej do EcDsbA dla przedstawicieli tej grupy waha się w przedziale 20–30%. Różnice dotyczą między innymi cech motywu katalitycznego. Spotykany jest motyw CPHC sparowany z Val-cisPro jak i inne motywy np. NmDsbA3 posiada motyw CVHC połączony z Thr-cisPro. Różnice strukturalne dotyczą długości hydrofobowego rowka, ładunku powierzchniowego oraz motywu katalitycznego.

Trzeci kład tworzą homologi EcDsbA należące do różnych grup taksonomicznych, które znacząco odbiegają od prototypowego EcDsbA, zarówno pod względem identyczności sekwencji aminokwasowej jak i struktury przestrzennej. Do najdokładniej scharakteryzowanych należą DsbA przedstawicieli *Actinobacteria* (MtDsbA z *Mycobacterium tuberculosis*, CdMdbA z *Corynebacterium diphtheriae*), Gram-dodatnich Firmicutes (BsBdbD z *Bacillus subtilis* czy SaDsbA z *Staphylococcus aureus*) a także *Proteobacteria* zarówno Alphaproteobacteria (WpDsbA z *Wolbachia pipientis*) jak i Gammaproteobacteria (PaDsbA2 z *Pseudomonas aeruginosa*). Do tego kładu zaliczane jest także białko DsbA *Chlamydia trachomatis* (CtDsbA), Gram-ujemnego mikroorganizmu należącego do klasy *Chlamydia* [1, 10, 12, 37, 59]. Główna różnica strukturalna pomiędzy klasą DsbA-I i DsbA-II dotyczy ułożenia harmonijki β 1. Dodatkowo w sekwencji aminokwasowej białka grupy DsbA-II zawierają drugą parę reszt cysteinowych powiązanych mostkiem, która nie pełni funkcji katalitycznej choć może odgrywać rolę w procesach regulacyjnych, co udokumentowano w odniesieniu do WpDsbA [37]. Białka tej grupy różnią ich motywy katalityczne [3].

3.1. Fizyczno-chemiczne właściwości różnych grup DsbA

Jedną z istotnych cech białek Dsb odzwierciedlających rodzaj i siłę ich aktywności jest potencjał redoks oraz pK_a N-końcowej cysteiny motywu CXXC. Generalnie pod kątem potencjału redoks można je podzielić na trzy grupy; te o wysokim potencjale (około – 100 mV i powyżej), te o pośrednim potencjale (około – 200 mV) oraz białka o niskim potencjale (poniżej – 200 mV). Niski potencjał jest charakterystyczny dla cytoplazmatycznych tioredoksyn o aktywności redukującej, pośredni dla białek o aktywności izomeryzacyjnej, odpowiedzialnych za przebudowę żle wprowadzonych mostków. Wysoki potencjał redoks charakteryzuje pozacytoplazmatyczne białka Dsb o aktywności oksydacyjnej, a więc białka z rodziny DsbA. Potencjał redoks EcDsbA wynosi – 122 mV [44]. Zbliżoną wartość wykazują białka DsbA z grupy Ia (od – 154 mV do – 116 mV). Białka z grupy Ib mają zdecydowanie wyższy potencjał (od – 80 mV do – 94 mV) a te z grupy II są pod względem ich potencjałów redoks grupą wysoce niejednorodną, np. wartość potencjału redoks PaDsbA2 to –67 mV a CtDsbA to –229 mV [3]. Wartość pK_a cysteiny pozwala określić w jakim pH cysteina występuje w równowadze w formie uprotonowanej (SH) i w formie anionu tiolowego (S⁻). Standardowe pK_a dla wolnej cysteiny wynosi 8,3/8,6. Wartość pK_a wyeksponowanych na powierzchni białek DsbA N-końcowych cystein motywu CXXC jest dużo niższa niż ta dla wolnej cysteiny i waha się od około 3,0 do 5,0. Występuje korelacja pomiędzy wartością pK_a a potencjałem redukcyjnym białka Dsb – im niższa wartość pK_a N-terminalnej cysteiny motywu CXXC tym wyższy potencjał redukcyjny (wartość pK_a dla cytoplazmatycznych tioredoksyn wynosi około 7) [53].

Testy biochemiczne określające poziom aktywności oksydacyjnej białek DsbA to test redukcji insuliny, testy utleniania białek zawierających mostki disiarczkowe (RNaza, hirudyna) czy zdolność do utleniania syntetycznego charakteryzującego się fluorescencją peptydu. W tych testach białka przedstawiciele należące do grupy DsbA-Ia (głównie SeDsbA i KpDsbA) wykazują właściwości prawie identyczne jak EcDsbA [8, 36, 59]. Właściwości innych DsbA, nawet tych z grupy DsbA-Ib odbiegają od cech charakterystycznych dla EcDsbA co jest efektem, czasami nawet niewielkich, zmian strukturalnych.

4. Oddziaływanie DsbA z dwiema grupami partnerów – partnerami redoks i substratami

Różnice struktury, często nawet niewielkie mają wpływ na rodzaj i liczbę substratów białek DsbA. Te tiolowe oksydoreduktazy oddziałują z dwoma rodzajami

substratów: w stanie utlenionym z białkami do których wprowadzane są mostki pomiędzy grupami – SH reszt cysteinowych, w stanie zredukowanym z jednym substratem – białkami homologami EcDsbB, co prowadzi do reutlenia DsbA.

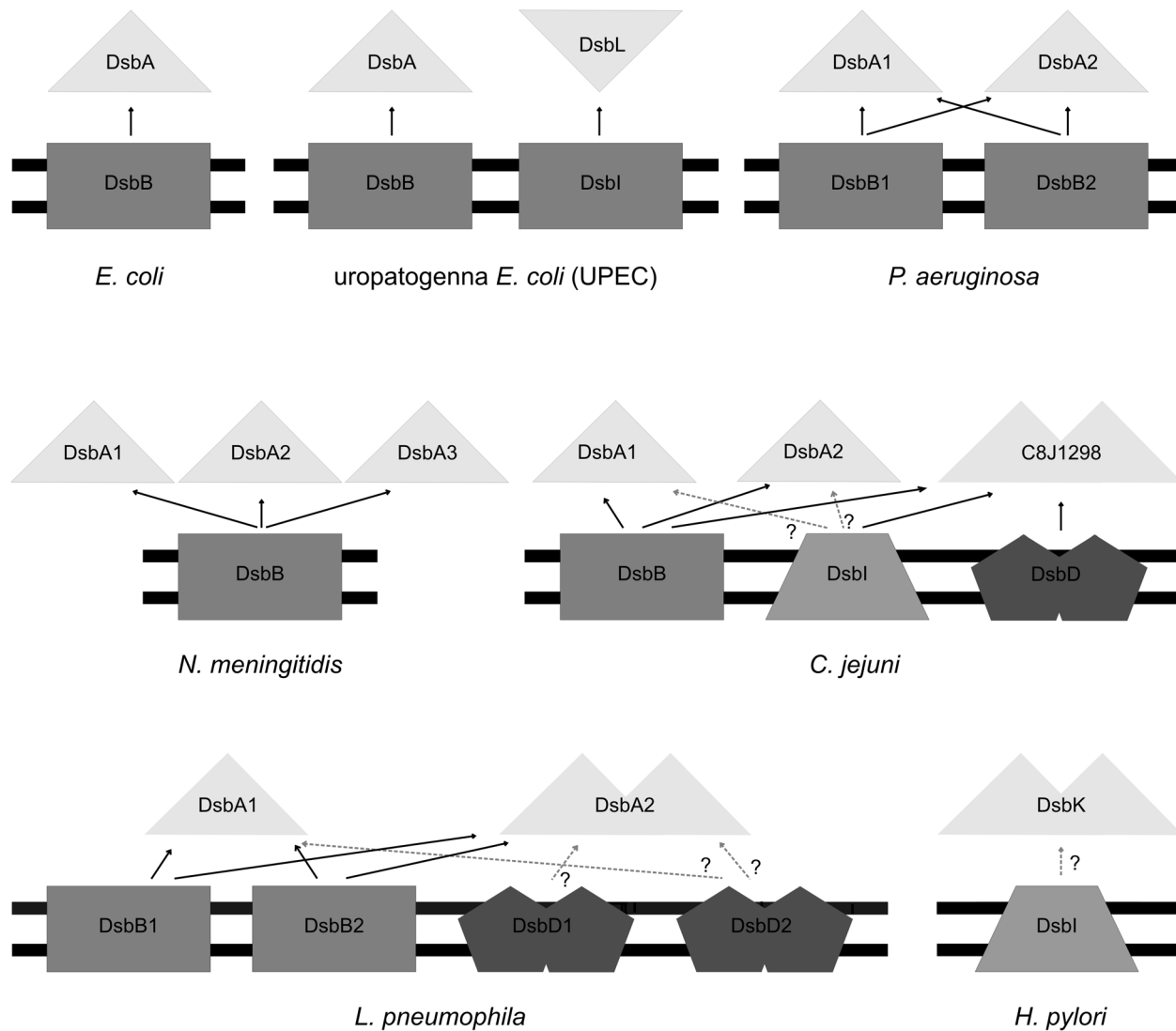
4.1. Oddziaływanie z partnerami redoks

Rozwiązanie struktury kompleksu EcDsbA z EcDsbB doprowadziło do określenia sekwencji aminokwasowej krótkiego peptydu (⁶PSPFATCDFM¹⁰⁶) z drugiej peryplazmatycznej pętli EcDsbB oddziałującego z EcDsbA w procesie transferu elektronów [25, 35, 68]. Ta sekwencja aminokwasowa jest identyczna lub prawie identyczna w białkach DsbB będących partnerami redoks DsbA z grupy Ia. Zgodnie z tym DsbA Ia oddziałują w testach *in vitro* z EcDsbB a *in vivo* komplementują brak EcDsbA w sposób zależny od EcDsbB [35, 36]. Sekwencje aminokwasowe peptydów białek DsbB biorących udział w reutlenianiu DsbA z grup Ib i II różnią się znacząco, zarówno między sobą jak i w porównaniu do EcDsbB. Tylko nieliczni przedstawiciele grupy Ib (NmDsbA1, PaDsbA1) wykazują zdolność do częściowej komplementacji braku EcDsbA (test ruchliwości) a białka DsbA z grupy II najbardziej strukturalnie odbiegające od EcDsbA nie są też funkcjonalnymi odpowiednikami EcDsbA. Ciekawe są interakcje pomiędzy białkami DsbA i DsbB w komórkach bakterii posiadających więcej niż jedno białko DsbA, które przeważnie należą do różnych grup strukturalnych. Genom *Pseudomonas aeruginosa* koduje dwa białka DsbA (PaDsbA1 i PaDsbA2) o różnej funkcji/specyficzności substratowej i strukturze oraz dwa białka DsbB (PaDsbB1 i PaDsbB2). PaDsbA1 odpowiedzialne za wprowadzanie mostków disiarczkowych do wielu czynników wirulencji jest zaliczane do grupy Ib. PaDsbA2 produkowane prawdopodobnie tylko w specyficznych warunkach posiada odmienną strukturę, jest przedstawicielem grupy II. Obydwa PaDsbA są reutleniane zarówno przez PaDsbB1 jak i PaDsbB2, dopiero brak obu PaDsbB wpływa na stan redoks DsbA1 i zakłóca jego funkcjonowanie. Przyczyna obecności dwóch białek o nakładających się funkcjach nie jest wyjaśniona. Wyznaczona *in silico* sekwencja aminokwasowa otaczająca resztę cysteinową drugiej pętli peryplazmatycznej jest identyczna w obu PaDsbB (AQGMGSKM) i znacząco różna od tej obecnej w EcDsbB, chociaż oba PaDsbB komplementują brak EcDsbB w teście ruchliwości [1]. W komórkach uropatogennych szczepów *Escherichia coli* oraz niektórych szczepach *Salmonella enterica* poza główną parą EcDsbA/EcDsbB czy SeDsbA/SeDsbB funkcjonuje druga para tiolowych oksydaz DsbL/DsbI o wysokiej specyficzności substratowej. Oba białka DsbL (EcDsbL i SeDsbL) o wysokiej identyczności sekwencji aminokwasowej (93%)

charakteryzują się wysokim podobieństwem struktur lecz znacząco różnią się od EcDsbA zarówno strukturalnie jak i funkcjonalnie. Białka DsbL są reutleniane przez tworzące z nimi parę redoks białka, homologi EcDsbB, nazwane DsbI, o odmienniej od EcDsbB sekwencji aminokwasowej peptydu wchodzącego w interakcje z partnerem generującym wiązania disiarczkowe. Sekwencja aminokwasowa tego peptydu to LFGVQGCST (analiza *in silico*) [3]. W komórkach *N. meningitidis* funkcjonują trzy białka DsbA: NmDsbA1, NmDsbA2 i NmDsbA3. Dwa z nich (NmDsbA1 i NmDsbA2) są lipoproteinami a jedno (NmDsbA3) jest białkiem peryplazmatycznym. Pomimo istniejących między nimi różnic strukturalnych wszystkie współpracują z jednym białkiem DsbB, które jest też zdolne *in vitro* do reutlenia EcDsbA. Sekwencja aminokwasowa jego aktywnego peptydu (TAPSCGAP) jest odmienna od tej wyznaczonej dla EcDsbB [38, 61, 62]. Procesy reutlenia dimerycznych tiolowych oksydoreduktaz generujących mostki disiarczkowe (patrz niżej) jak dotąd pozostają niewyjaśnione. DsbK (HP0231) *H. pylori* jest obecne w komórce typu dzikiego w stanie utlenionym a na jego stan redoks tylko w nieznacznym stopniu wpływa brak białka DsbI (nietypowy homolog EcDsbB) [8]. W komórkach *E. coli* HP0231 komplementuje brak EcDsbA w kilku testach (wrażliwość na DTT, ruchliwość i aktywność alkalicznej fosfatazy) w sposób niezależny od EcDsbB [55]. Dane te dokumentują aktywność HP0231 jako oksydazy, reutlenie tego białka po przekazaniu mostka na odpowiedni substrat prawdopodobnie umożliwia jego dimeryczną strukturę. Mechanizmy regulujące aktywność dwufunkcyjnych dimerycznych tiolowych oksydoreduktaz *L. pneumophilla* i *C. jejuni* (odpowiednio LpDsbA2 i C8J_1298) również nie zostały poznane. Rycina 2 przedstawia przykłady oddziaływań pomiędzy białkami DsbA i DsbB u różnych gatunków bakterii, natomiast rycina 3 topologię wybranych białek DsbB z zaznaczonymi aminokwasami istotnymi dla interakcji z DsbA.

4.2. Oddziaływanie z substratami

Różnice strukturalne pomiędzy białkami DsbA mają wpływ na rodzaj i liczbę ich substratów – białek do których wprowadzane są mostki disiarczkowe. Ponieważ kompleksy tworzone przez DsbA z substratami są nietrwałe, odpowiednie substraty identyfikowane są poprzez porównywanie subproteomów peryplazmatycznych szczepów dzikich z subproteomami mutantów w genach *dsbA* lub z zastosowaniem odpowiednich mutantów punktowych opóźniających lub uniemożliwiających rozwiązanie kompleksów [6, 27]. Zidentyfikowano dużą liczbę substratów białek DsbA, często istotnych czynników wirulencji [6, 40]. Niektóre białka DsbA jak np. EcDsbL charakteryzują się bardzo wysoką

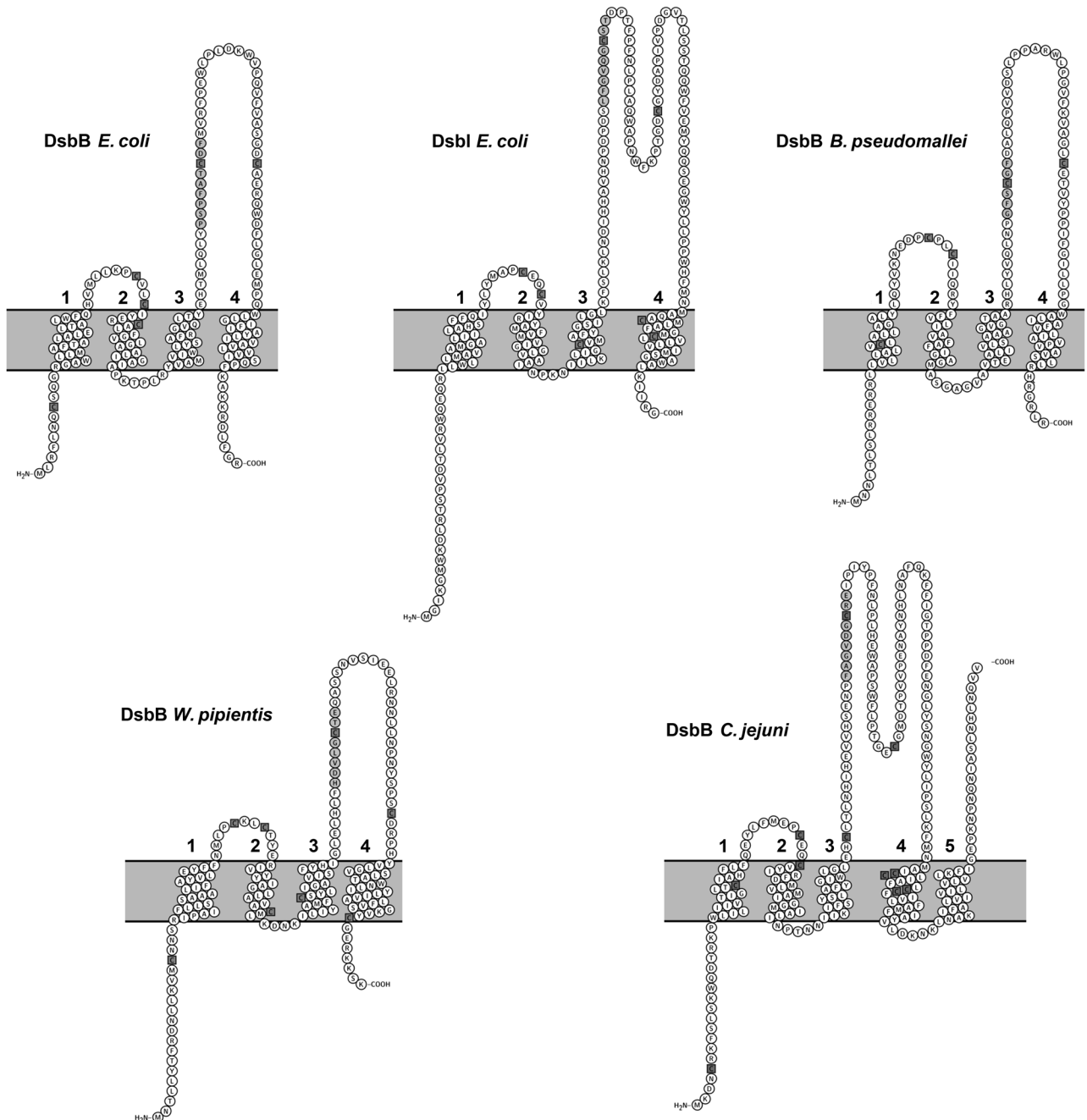


Ryc. 2. Oddziaływania pomiędzy białkami DsbA i DsbB

Przykłady dotyczące wybranych gatunków bakterii Gram-ujemnych. Za wprowadzanie mostków disiarczkowych w komórkach *Escherichia coli* K12 odpowiedzialne jest monomeryczne białko DsbA oraz reutleniające je błonowe białko DsbB; w komórkach uropatogennych szczepów *E. coli* (UPEC) funkcjonuje dodatkowa para białek DsbL-DsbI. *Pseudomonas aeruginosa* koduje dwa białka DsbA (DsbA1, DsbA2) oraz dwa błonowe DsbB (DsbB1, DsbB2). W komórkach *Neisseria meningitidis* kodowane są trzy białka DsbA (DsbA1, DsbA2, DsbA3) oraz tylko jedno białko DsbB. Dwa białka DsbA (DsbA1, DsbA2) oraz dwa błonowe białka DsbB i DsbI kodowane są w genomie *Campylobacter jejuni* 81116. DsbI kodowane w genomie *C. jejuni* 81116 oraz w genomie UPEC to dwa różne białka [49]. Oprócz monomerycznych białek DsbA1/2 we wprowadzanie mostków disiarczkowych zaangażowana jest także dimeryczna oksydoreduktaza C8J_1298, która oddziałuje zarówno z białkami DsbB, DsbI jak i białkiem szlaku izomeryzacji redukcji – DsbD. W komórkach *Legionella pneumophila* kodowane są monomeryczne DsbA1, dimeryczne DsbA2 a także dwa DsbB (DsbB1, DsbB2) oraz dwa DsbD (DsbD1, DsbD2). *Helicobacter pylori* nie koduje w genomie klasycznej pary białek DsbA-DsbB, za wprowadzanie mostków disiarczkowych odpowiedzialna jest dimeryczna oksydaza DsbK, kodowane jest również DsbI – homolog CjDsbI. Oddziaływania pomiędzy białkami zostały na rysunku przedstawione w postaci strzałek; przerywaną szarą linią zaznaczono potencjalne oddziaływania, które nie zostały udowodnione w eksperymentach *in vivo* *in vitro*.

specyficznością substratową, podczas gdy inne reagują z wieloma substratami. W komórkach niektórych mikroorganizmów np. *N. meningitidis* czy *S. enterica* funkcjonuje zwiokrotniona liczba białek DsbA, które posiadają zarówno nakładające się, jak i odmienne substraty. Jak dotąd pozostają niewyjaśnione dokładnie oddziaływania utlenionych DsbA z ich substratami. Być może mechanizm tych oddziaływań nie jest identyczny dla wszystkich białek DsbA. Analiza pierwszorzędowych sekwencji aminokwasowych, otaczających reszty cysteinowe pomiędzy którymi wytwarzane są

mostki disiarczkowe, kilkudziesięciu białek nie wykazała istnienia pomiędzy nimi istotnych podobieństw. Analiza właściwości mutantów punktowych oraz fakt, że mutanty o zamienionej prolinie na treoninę w pętli cisPro (L2) sugerują, że ta pętla pełni kluczową rolę w wiązaniu substratów przez utlenioną formę EcDsbA. Rozwiązanie struktury kompleksu EcDsbA z peptydem białka SigA *S. flexnerii*, zawierającym reszty cysteinowe pomiędzy którymi wytwarzany jest mostek, wskazało, że peptyd nie wiąże się do regionu hydrofobowego rowka, który jest miejscem oddziaływania z EcDsbB.



Ryc. 3. Topologia DsbB w błonie

Porównanie białek DsbB oddziałujących z białkami DsbA, zaliczonymi do różnych klas – por. rozdział 3 (*Escherichia coli* – klasa Ia; *Burkholderia pseudomallei* – klasa Ib; *Wolbachia pipientis* – klasa II; *Campylobacter jejuni* – ?). Przewidywania topologii białek DsbB w błonie wykonano z wykorzystaniem programu Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/#>) [48]. Reszty cysteinowe w obrębie białek zostały zaznaczone kolorem ciemnoszarym. Sekwencje aminokwasowe wytypowane jako motywy biorące udział w oddziaływaniu z białkiem DsbA zaznaczono kolorem jasnoszarym.

Tak więc można postawić hipotezę że hydrofobowy rowek determinuje oddziaływanie DsbA z partnerem redoks a nie z substratami [50].

5. Dimeryczne białka o aktywności oksydacyjnej

W komórkach niektórych gatunków mikroorganizmów funkcjonują dimeryczne tiolowe oksydoreduktazy, o strukturach zbliżonych do EcDsbC lub EcDsbG, ale

odgrywające role w generowaniu mostków disiarczkowych. Niektóre z nich są enzymami dwufunkcyjnymi, funkcjonują zarówno jako oksydazy reszt cysteinowych jak i izomerazy, często zależnie od tła genetycznego. W świecie mikroorganizmów spotykamy gatunki gdzie tego typu oksydazy funkcjonują razem z typowymi monomerycznymi DsbA (np. rodzaj *Campylobacter* czy *Legionella pneumophila*) oraz gatunki w komórkach których są one jedynymi enzymami utleniającymi reszty cysteinowe (np. *Helicobacter pylori*).

Campylobacter i *Helicobacter* to przedstawiciele klasy *Epsilonproteobacteria*, mikroorganizmy będące ludzkimi patogenami. Infekcja *Campylobacter jejuni* skutkuje stanami zapalnymi jelit. *Helicobacter pylori* jest czynnikiem etiologicznym poważnych objawów chorobowych górnego odcinka przewodu pokarmowego takich jak – stan zapalny błony śluzowej żołądka, choroba wrzodowa żołądka/dwunastnicy czy choroba nowotworowa. Rodzaj symptomów chorobowych jest zależny od genotypu szczepu patogenu, genotypu gospodarza oraz czynników środowiskowych.

W proteomie *H. pylori* nie stwierdzono ani obecności białek DsbA/DsbB ani DsbC/DsbD. Zidentyfikowano 149 białek zawierających motyw CXXC, ale tylko cztery z nich posiadają charakterystyczny zwój tioredoksynowy, a więc należą do klasy tiolowych oksydoreduktaz. Dwa z nich to cytoplazmatyczne tioredoksyny a dwa (HP0231 i HP0377) to białka pozacytoplazmatyczne. [30]. Ich struktura została rozwiązana [64, 65]. HP0377 jest nietypowym białkiem CcmG (*cytochrome c maturation*), które poza zdolnością do redukcji apocytochromu c, w testach *in vitro* wykazuje aktywność izomeryzacyjną. HP0377 utrzymywane jest w stanie zredukowanym przez błonowe białko HP0265 – CcdA, będące skróconą wersją klasycznego DsbD [54]. HP0231 to dimeryczna oksydoreduktaza odpowiedzialna za generowanie mostków disiarczkowych i wpływająca na wiele aspektów procesu wirulencji. W proteomie *H. pylori* obecne jest dodatkowo białko HP0595 (DsbI) – nietypowy homolog EcDsbB – o dokładnie nieokreślonej funkcji.

HP0231 (DsbK) o strukturze zbliżonej, ale nie identycznej jak EcDsbG, posiada domenę katalityczną charakterystyczną dla klasy DsbA-II, z motywem aktywnym identycznym jak EcDsbA (CPHC sparowany z VcP). Obecność domeny dimeryzacyjnej warunkuje aktywność enzymu w komórkach naturalnego gospodarza. Eksperymenty mutagenyzy specyficznej co do miejsca analizujące aminokwasy centrum katalitycznego wykazały, że zamiana waliny na treoninę w tzw. pętli prolinowej (VcP na TcP) całkowicie znosi aktywność białka [7, 9, 41, 55]. Proces reutlenia HP0231 nadal jest niejasny. System Dsb ma istotny wpływ na procesy wirulencji *H. pylori*. Brak białka HP0595 w znaczący sposób obniża poziom kolonizacji błony śluzowej żołądka myszy [16]. Szczep *H. pylori* zmutowany w genie *hp0231* charakteryzuje się obniżonym poziomem translokacji do komórek eukariotycznych białka CagA, głównej determinanty procesu nowotworzenia [67]. Celem działania HP0231 jest między innym białko błony zewnętrznej HopQ zawierające trzy mostki disiarczkowe. HopQ jest adhezyną *H. pylori* rozpoznająca na powierzchni komórek eukariotycznych cząsteczki CEACAM (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*) [29, 32]. Brak HopQ lub jego zmieniona struktura w znaczący sposób

hamuje proces translokacji CagA oraz indukcję szlaków przekazywania sygnałów [19].

WHO zaklasyfikowało *H. pylori* jako jeden z 12 ludzkich patogenów przeciwko któremu niezbędne jest szybkie opracowanie nowych leków. HP0231 ze względu na istotny wpływ na proces wirulencji, nietypową strukturę oraz peryplazmatyczną lokalizację spełnia wymagania stawiane celom terapii antybakteryjnych. Potencjalne inhibitory HP0231 nie powinny hamować aktywności białek Dsb innych gatunków bakterii wchodzących w skład ludzkiej mikrobioty jak i nie powinny mieć wpływu na funkcjonowanie systemu wprowadzania mostków disiarczkowych funkcjonujących w komórkach eukariotycznych. Badania dotyczące wykorzystania białek systemu Dsb *E. coli* jako celów terapeutycznych są prowadzone w kilku światowych laboratoriach [15, 39, 58].

Szlak oksydacyjny Dsb *C. jejuni* jest bardziej złożony niż ten obecny w komórkach modelowej bakterii *E. coli* K-12. W zależności od szczepu, wyróżnia się w nim trzy lub cztery enzymy. Dwa z nich (DsbB i DsbI) zlokalizowane są w błonie wewnętrznej, jeden lub dwa w peryplazmie (DsbA1 i DsbA2). Dodatkowo analizy *in silico* wytypowały dwa homologii białek *E. coli* szlaku izomeryzacyjnego: C8J_1298 i C8J_0565 – podane numery dotyczą genomu szczepu *C. jejuni* 81116 (odpowiednio homologii EcDsbC i EcDsbD). Oksydoreduktazy CjDsbA1 i CjDsbA2 posiadają klasyczne sekwencje sygnałowe, które zapewniają ich transport przez błonę cytoplazmatyczną do peryplazmy. Identyfikacja sekwencji aminokwasowych pomiędzy CjDsbA1 i CjDsbA2 wynosi 47%. Białka te, wykazują odpowiednio 24% i 28% identyfikacji sekwencji aminokwasowych z EcDsbA oraz 28,5% i 39% z EcDsbL. Różnice pomiędzy nimi jak i między DsbA *C. jejuni* a DsbA *E. coli* dotyczą centrów aktywnych oraz struktur tych oksydoreduktaz. Reszta izoleucyny w aktywnym motywie CIHC CjDsbA1 zastąpiona jest resztą treoninową (CTHC) CjDsbA2. Zatem te motywy, są różne od motywu EcDsbA (CPHC) i EcDsbL (CPFC). W obydwu CjDsbA pętla cis-Pro, poprzedzona jest resztą treoniny (tworzącej motyw TcP), w przeciwieństwie do reszty waliny (motyw VcP) obecnej w EcDsbA i EcDsbL. Modelowanie strukturalne wskazuje, że oba CjDsbA1 i CjDsbA2 są zbliżone bardziej do EcDsbL, niż do EcDsbA, choć istnieją istotne różnice strukturalne między nimi. Odpowiednikiem EcDsbL jest raczej CjDsbA2. Różnice strukturalne pomiędzy oksydoreduktazami CjDsbA wpływają na cechy fenotypowe bakterii warunkowane aktywnością tych enzymów. Substratem CjDsbA1 jest fosfataza alkaliczna CjPhoX, a aktywność CjDsbA2 kluczowa jest dla aktywności sulfotransferazy arylosulfatu CjAstA. Różnice strukturalne pomiędzy CjDsbA1 a CjDsbA2 widoczne są także w ich aktywności w komórkach *E. coli*. CjDsbA1, w przeciwieństwie

do CjDsbA2, komplementuje brak EcDsbA w sposób zależny od EcDsbB. Obie tiolowe oksydoreduktazy są reutleniające przez ten sam błonowy enzym CjDsbB [17]. Rola CjDsbI nie jest wyjaśniona. Udowodniono, że CjDsbI nie oddziałuje ani z CjDsbA1 ani z CjDsbA2, ale odgrywa rolę w obronie komórek przed stresem oksydacyjnym, działa zatem raczej w szlaku redukcyjnym [4, 51]. Nietypowym białkiem Dsb bakterii rodzaju *Campylobacter* jest produkt genu *c8j_1298* (numeracja ze szczepu 81116). Początkowo, na podstawie analiz *in silico* został on zaklasyfikowany jako izomeraza Dsb, homolog EcDsbC. Rzeczywiście C8J_1298 jest homodimerem wykazującym w testach *in vitro* cechy zbliżone do EcDsbC. Jednak w komórkach występuje nietypowo zarówno w formie utlenionej jak i zredukowanej, a funkcja tego białka jest uzależniona od tła genetycznego. W komórkach typu dzikiego pełni prawdopodobnie rolę EcDsbG, a przy braku CjDsbA1 jest tiolową oksydoreduktazą o aktywności utleniającej. Filogenetycznie białko C8J_1298 jest spokrewnione bliżej z dimeryczną oksydoreduktazą *H. pylori* (HP0231) niż EcDsbC [4].

Dimeryczna dwufunkcyjna tiolowa oksydoreduktaza występuje też w komórkach *Legionella pneumophila*, patogenu górnych dróg oddechowych, czynnika etiologicznego tzw. choroby legionistów. System Dsb tego mikroorganizmu jest wyjątkowo skomplikowany. W genomie *L. pneumophila* zidentyfikowano dwa geny kodujące oksydoreduktazy tiolowe, oznaczone LpDsbA1 i LpDsbA2, dwa geny kodujące białka homologii EcDsbB oraz dwa geny kodujące homologii EcDsbD. Monomeryczne LpDsbA1 komplementuje mutację $\Delta dsbA$ *E. coli*, a jego brak w komórkach *L. pneumophila* nie skutkuje obserwowalną zmianą fenotypu mutantu. Podobnie jak zaobserwowano w wypadku C8J_1298, aktywność LpDsbA2 jest zależna od tła genetycznego. LpDsbA2 w komórkach *L. pneumophila* odpowiedzialne jest za utlenianie cystein kilku białek, składników IV systemu sekrecji T4SS a w komórkach *E. coli* funkcjonuje jako izomeraza [28, 33, 34].

6. Podsumowanie

Badania nad systemami Dsb w komórkach różnych gatunków bakterii przybliżają nas do wprowadzenia nowych terapii antybakteryjnych. W pierwszej kolejności najbardziej prawdopodobne jest wprowadzenie tych terapii przeciwko patogenom posiadającym białka DsbA zaliczane do klasy DsbA-Ia (m.in. EcDsbA, SeDsbA, KpDsbA). Jednak opracowanie terapii wymaga wcześniejszego poznania systemów Dsb działających w komórkach naszej mikroflory. Dodatkowym wyzwaniem jest zaprojektowanie skutecznych metod dostarczania takich leków. Przeprowadzone dotąd badania pokazują, że do tego etapu jeszcze daleka droga.

Podziękowania

Artykuł powstał w wyniku realizacji projektu finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki NCN 2018/29/B/NZ1/00140.

Piśmiennictwo

1. Arts I.S., Collet J.F. i wsp.: Dissecting the machinery that introduces disulfide bonds in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*. **4**, e00912-00913 (2013)
2. Bader M.W., Hiniker A., Regeimbal J., Goldstone D., Haebel P.W., Riemer J., Metcalf P., Bardwell J.C.: Turning a disulfide isomerase into an oxidase: DsbC mutants that imitate DsbA. *EMBO J*. **20**, 1555–1562 (2001)
3. Banas A.M., Bocian-Ostrzycka K.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Engineering of the Dsb (disulfide bond) proteins – contribution towards understanding their mechanism of action and their applications in biotechnology and medicine. *Crit. Rev. Microbiol.* **45**, 433–450 (2019)
4. Banas A.M., Bocian-Ostrzycka K.M., Plichta M., Dunin-Horkawicz S., Ludwiczak J., Placzekiewicz J., Jagusztyn-Krynicka E.K.: C8J_1298, a bifunctional thiol oxidoreductase of *Campylobacter jejuni*, affects Dsb (disulfide bond) network functioning. *PLoS One*, **15**, e0230366 (2020)
5. Bardwell J.C., McGovern K., Beckwith J.: Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell*, **67**, 581–589 (1991)
6. Bocian-Ostrzycka K.M., Grzeszczuk M.J., Banas A.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Bacterial thiol oxidoreductases – from basic research to new antibacterial strategies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 3977–3989 (2017)
7. Bocian-Ostrzycka K.M., Grzeszczuk M.J., Banas A.M., Jastrzab K., Pisarczyk K., Kolarzyk A., Lasica A.M., Collet J.F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Engineering of *Helicobacter pylori* Dimeric Oxidoreductase DsbK (HP0231). *Front. Microbiol.* **7**, 1158 (2016)
8. Bocian-Ostrzycka K.M., Grzeszczuk M.J., Dziewit L., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Diversity of the *Epsilonproteobacteria* Dsb (disulfide bond) systems. *Front. Microbiol.* **6**, 570 (2015)
9. Bocian-Ostrzycka K.M., Lasica A.M., Dunin-Horkawicz S., Grzeszczuk M.J., Drabik K., Dobosz A.M., Godlewska R., Nowak E., Collet J.F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Functional and evolutionary analyses of *Helicobacter pylori* HP0231 (DsbK) protein with strong oxidative and chaperone activity characterized by a highly diverged dimerization domain. *Front. Microbiol.* **6**, 1065 (2015)
10. Christensen S., Groftehaug M.K., Byriel K., Huston W.M., Furlong E., Heras B., Martin J.L., McMahon R.M.: Structural and biochemical characterization of *Chlamydia trachomatis* DsbA reveals a cysteine-rich and weakly oxidising oxidoreductase. *PLoS One*, **11**, e0168485 (2016)
11. Collet J.F., Riemer J., Bader M.W., Bardwell J.C.: Reconstitution of a disulfide isomerization system. *J. Biol. Chem.* **277**, 26886–26892 (2002)
12. Daniels R., Mellroth P., Bernsel A., Neiers F., Normark S., von Heijne G., Henriques-Normark B.: Disulfide bond formation and cysteine exclusion in Gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem.* **285**, 3300–3309 (2010)
13. Denoncin K., Collet J.F.: Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. *Antioxid. Redox. Signal.* **19**, 63–71 (2013)
14. Depuydt M., Leonard S.E., Vertommen D., Denoncin K., Morsomme P., Wahni K., Messens J., Carroll K.S., Collet J.F.: A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science*, **326**, 1109–1111 (2009)

15. Duprez W., Premkumar L., Halili M.A., Lindahl F., Reid R.C., Fairlie D.P., Martin J.L.: Peptide inhibitors of the *Escherichia coli* DsbA oxidative machinery essential for bacterial virulence. *J. Med. Chem.* **58**, 577–587 (2015)
16. Godlewska R., Dzwonek A., Mikula M., Ostrowski J., Pawłowski M., Bujnicki J.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: *Helicobacter pylori* protein oxidation influences the colonization process. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**, 321–324 (2006)
17. Grabowska A.D., Jagusztyn-Krynicka E.K. i wsp.: Functional and bioinformatics analysis of two *Campylobacter jejuni* homologs of the thiol-disulfide oxidoreductase, DsbA. *PLoS One*, **9**, e106247 (2014)
18. Grimshaw J.P., Stirnimann C.U., Brozzo M.S., Malojcic G., Grutter M.G., Capitani G., Glockshuber R.: DsbL and DsbI form a specific dithiol oxidase system for periplasmic arylsulfate sulfotransferase in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **380**, 667–680 (2008)
19. Grzeszczuk M.J., Bocian-Ostrzycka K.M., Banas A.M., Roszczenko-Jasinska P., Malinowska A., Stralova H., Haas R., Meyer T.F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Thioloxydoreductase HP0231 of *Helicobacter pylori* impacts HopQ-dependent CagA translocation. *Int. J. Med. Microbiol.* **308**, 977–985 (2018)
20. Guddat L.W., Bardwell J.C., Zander T., Martin J.L.: The uncharged surface features surrounding the active site of *Escherichia coli* DsbA are conserved and are implicated in peptide binding. *Protein Sci.* **6**, 1148–1156 (1997)
21. Heras B., Edeling M.A., Schirra H.J., Raina S., Martin J.L.: Crystal structures of the DsbG disulfide isomerase reveal an unstable disulfide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8876–8881 (2004)
22. Heras B., Totsika M., Jarrott R., Shouldice S.R., Guncar G., Achard M.E., Wells T.J., Argente M.P., McEwan A.G., Schembri M.A.: Structural and functional characterization of three DsbA paralogues from *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Biol. Chem.* **285**, 18423–18432 (2010)
23. Inaba K., Ito K.: Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine. *Biochim. Biophys. Acta.* **1783**, 520–529 (2008)
24. Inaba K., Murakami S., Nakagawa A., Iida H., Kinjo M., Ito K., Suzuki M.: Dynamic nature of disulphide bond formation catalysts revealed by crystal structures of DsbB. *EMBO J.* **28**, 779–791 (2009)
25. Inaba K., Murakami S., Suzuki M., Nakagawa A., Yamashita E., Okada K., Ito K.: Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of disulfide bond generation. *Cell*, **127**, 789–801 (2006)
26. Ireland P.M., McMahon R.M., Marshall L.E., Halili M., Furlong E., Tay S., Martin J.L., Sarkar-Tyson M.: Disarming *Burkholderia pseudomallei*: structural and functional characterization of a disulfide oxidoreductase (DsbA) required for virulence *in vivo*. *Antioxid. Redox Sign.* **20**, 606–617 (2014)
27. Jagusztyn-Krynicka E. K. Banaś A.M., Grzeszczuk M. J.: Strategie badań tiolowych oksydoreduktaz. *Post. Mikrobiol.* **56**, 326–334 (2017)
28. Jameson-Lee M., Garduno R.A., Hoffman P.S.: DsbA2 (27 kDa Com1-like protein) of *Legionella pneumophila* catalyses extracytoplasmic disulphide-bond formation in proteins including the Dot/Icm type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **80**, 835–852 (2011)
29. Javaheri A., Gerhard M. i wsp.: *Helicobacter pylori* adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. *Nat. Microbiol.* **2**, 16189 (2016)
30. Kaakoush N.O., Kovach Z., Mendz G.L.: Potential role of thiol: disulfide oxidoreductases in the pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **50**, 177–183 (2007)
31. Katzen F., Beckwith J.: Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell*, **103**, 769–779 (2000)
32. Koniger V., Haas R. i wsp.: *Helicobacter pylori* exploits human CEACAMs via HopQ for adherence and translocation of CagA. *Nat. Microbiol.* **2**, 16188 (2016)
33. Kpadeh Z.Z., Day S.R., Mills B.W., Hoffman P.S.: *Legionella pneumophila* utilizes a single-player disulfide-bond oxidoreductase system to manage disulfide bond formation and isomerization. *Mol. Microbiol.* **95**, 1054–1069 (2015)
34. Kpadeh Z.Z., Jameson-Lee M., Yeh A.J., Chertihin O., Shumilin I.A., Dey R., Day S.R., Hoffman P.S.: Disulfide bond oxidoreductase DsbA2 of *Legionella pneumophila* exhibits protein disulfide isomerase activity. *J. Bacteriol.* **195**, 1825–1833 (2013)
35. Kurth F., Duprez W., Premkumar L., Schembri M.A., Fairlie D.P., Martin J.L.: Crystal structure of the dithiol oxidase DsbA enzyme from *Proteus mirabilis* bound non-covalently to an active site peptide ligand. *J. Biol. Chem.* **289**, 19810–19822 (2014)
36. Kurth F., Martin, J.L. i wsp.: Comparative sequence, structure and redox analyses of *Klebsiella pneumoniae* DsbA show that anti-virulence target DsbA enzymes fall into distinct classes. *PLoS One*, **8**, e80210 (2013)
37. Kurz M., Iturbe-Ormaetxe I., Jarrott R., Shouldice S.R., Wouters M.A., Frei P., Glockshuber R., O'Neill S.L., Heras B., Martin J.L.: Structural and functional characterization of the oxidoreductase alpha-DsbA1 from *Wolbachia pipientis*. *Antioxid. Redox Sign.* **11**, 1485–1500 (2009)
38. Lafaye C., Iwema T., Carpentier P., Jullian-Binard C., Kroll J.S., Collet J.F., Serre L.: Biochemical and structural study of the homologues of the thiol-disulfide oxidoreductase DsbA in *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Biol.* **392**, 952–966 (2009)
39. Landeta C., Boyd D. i wsp.: Compounds targeting disulfide bond forming enzyme DsbB of Gram-negative bacteria. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 292–298 (2015)
40. Landeta C., Boyd D., Beckwith J.: Disulfide bond formation in prokaryotes. *Nat. Microbiol.* **3**, 270–280 (2018)
41. Lester J., Kichler S., Oickle B., Fairweather S., Oberc A., Chahal J., Ratnayake D., Creuzenet C.: Characterization of *Helicobacter pylori* HP0231 (DsbK): role in disulfide bond formation, redox homeostasis and production of *Helicobacter* cysteine-rich protein HcpE. *Mol. Microbiol.* **96**, 110–133 (2015)
42. Lin D., Kim B., Slauch J.M.: DsbL and DsbI contribute to periplasmic disulfide bond formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, **155**, 4014–4024 (2009)
43. Manta B., Boyd D., Berkmen M.: Disulfide bond formation in the periplasm of *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, **8**, DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2018 (2019)
44. Martin J.L., Bardwell J.C., Kuriyan J.: Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation *in vivo*. *Nature*, **365**, 464–468 (1993)
45. McCarthy A.A., Haebel P.W., Torronen A., Rybin V., Baker E.N., Metcalf P.: Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 196–199 (2000)
46. McMahon R.M., Coincon M., Tay S., Heras B., Morton C.J., Scanlon M.J., Martin J.L.: Sent packing: protein engineering generates a new crystal form of *Pseudomonas aeruginosa* DsbA1 with increased catalytic surface accessibility. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **71**, 2386–2395 (2015)
47. McMahon R.M., Premkumar L., Martin J.L.: Four structural subclasses of the antivirulence drug target disulfide oxidoreductase DsbA provide a platform for design of subclass-specific inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* **1844**, 1391–1401 (2014)

48. Omasits U., Ahrens C.H., Muller S., Wollscheid B.: Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, **30**, 884–886 (2014)
49. Pawlowski M., Lasica A.M., Jagusztyn-Krynicka E.K., Bujnicki J.M.: AAN82231 protein from uropathogenic *E. coli* CFT073 is a close paralog of DsbB enzymes and does not belong to the DsbI family. *Pol. J. Microbiol.* **58**, 181–184 (2009)
50. Paxman J.J., Scanlon M.J. i wsp.: The structure of the bacterial oxidoreductase enzyme DsbA in complex with a peptide reveals a basis for substrate specificity in the catalytic cycle of DsbA enzymes. *J. Biol. Chem.* **284**, 17835–17845 (2009)
51. Raczko A.M., Bujnicki J.M., Pawlowski M., Godlewska R., Lewandowska M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Characterization of new DsbB-like thiol-oxidoreductases of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* and classification of the DsbB family based on phylogenomic, structural and functional criteria. *Microbiology*. **151**, 219–231 (2005)
52. Reid E., Cole J., Eaves D.J.: The *Escherichia coli* CcmG protein fulfils a specific role in cytochrome c assembly. *Biochem. J.* **355**, 51–58 (2001)
53. Roos G., Foloppe N., Messens J.: Understanding the pK(a) of redox cysteines: the key role of hydrogen bonding. *Antioxid. Redox. Signal.* **18**, 94–127 (2013)
54. Roszczenko P., Grzeszczuk M., Kobierecka P., Wywiał E., Urbanowicz P., Wincek P., Nowak E., Jagusztyn-Krynicka E.K.: *Helicobacter pylori* HP0377, a member of the Dsb family, is an untypical multifunctional CcmG that cooperates with dimeric thioldisulfide oxidase HP0231. *BMC Microbiol.* **15**, 135 (2015)
55. Roszczenko P., Radomska K.A., Wywiał E., Collet J.F., Jagusztyn-Krynicka E.K.: A novel insight into the oxidoreductase activity of *Helicobacter pylori* HP0231 protein. *PLoS One*, **7**, e46563 (2012)
56. Schierle C.F., Berkmen M., Huber D., Kumamoto C., Boyd D., Beckwith J.: The DsbA signal sequence directs efficient, cotranslational export of passenger proteins to the *Escherichia coli* periplasm via the signal recognition particle pathway. *J. Bacteriol.* **185**, 5706–5713 (2003)
57. Shouldice S.R., Heras B., Walden P.M., Totsika M., Schembri M.A., Martin J.L.: Structure and function of DsbA, a key bacterial oxidative folding catalyst. *Antioxid. Redox. Signal.* **14**, 1729–1760 (2011)
58. Smith R.P., Paxman J.J., Scanlon M.J., Heras B.: Targeting Bacterial Dsb Proteins for the Development of Anti-Virulence Agents. *Molecules*, **21**, DOI: 10.3390/molecules21070811 (2016)
59. Totsika M., Vagenas D., Paxman J.J., Wang G., Dhoub R., Sharma P., Martin J.L., Scanlon M.J., Heras B.: Inhibition of Diverse DsbA Enzymes in Multi-DsbA Encoding Pathogens. *Antioxid. Redox. Signal.* **29**, 653–666 (2018)
60. Turcot I., Ponnampalam T.V., Bouwman C.W., Martin N.L.: Isolation and characterization of a chromosomally encoded disulphide oxidoreductase from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Can. J. Microbiol.* **47**, 711–721 (2001)
61. Vivian J.P., Scanlon M.J. i wsp.: Structure and function of the oxidoreductase DsbA1 from *Neisseria meningitidis*. *J. Mol. Biol.* **394**, 931–943 (2009)
62. Vivian J.P., Scanlon, M.J. i wsp.: Structural and biochemical characterization of the oxidoreductase NmDsbA3 from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* **283**, 32452–32461 (2008)
63. Walden P.M., Heras B., Chen K.E., Halili M.A., Rimmer K., Sharma P., Scanlon M.J., Martin J.L.: The 1.2 Å resolution crystal structure of TcpG, the *Vibrio cholerae* DsbA disulfide-forming protein required for pilus and cholera-toxin production. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 1290–1302 (2012)
64. Yoon J.Y., Suh S.W. i wsp.: Structural and functional characterization of HP0377, a thioredoxin-fold protein from *Helicobacter pylori*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 735–746 (2013)
65. Yoon J.Y., Kim J., Lee S.J., Kim H.S., Im H.N., Yoon H.J., Kim K.H., Kim S.J., Han B.W., Suh S.W.: Structural and functional characterization of *Helicobacter pylori* DsbG. *FEBS Lett.* **585**, 3862–3867 (2011)
66. Yu J.: Inactivation of DsbA, but not DsbC and DsbD, affects the intracellular survival and virulence of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **66**, 3909–3917 (1998)
67. Zhong Y., Anderl E., Kruse T., Schindele F., Jagusztyn-Krynicka E.K., Fischer W., Gerhard M., Mejias-Luque R.: *Helicobacter pylori* HP0231 Influences Bacterial Virulence and Is Essential for Gastric Colonization. *PLoS One*, **11**, e0154643 (2016)
68. Zhou Y., Cierpicki T., Jimenez R.H., Lukasik S.M., Ellena J.F., Cafiso D.S., Kadokura H., Beckwith J., Bushweller J.H.: NMR solution structure of the integral membrane enzyme DsbB: functional insights into DsbB-catalyzed disulfide bond formation. *Mol. Cell.* **31**, 896–908 (2008)

BACILLUS THURINGIENSIS – NOWY POTENCJAŁ APLIKACYJNY

Aleksandra Gęsicka, Agata Henschke, Zuzanna Barańska,
Agnieszka Wolna-Maruwka*

Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Wpłynęło w lutym, zaakceptowano w październiku 2020 r.

Streszczenie: Owadobójcze właściwości *Bacillus thuringiensis* (Bt) sprawiają, że jest to cenny gatunek bakterii dla rozwoju rolnictwa. Produkowane przez Bt białka Cry i Cyt działają w sposób selektywny, dlatego ich stosowanie prowadzi do wyeliminowania tylko larw owadów docelowych. Znane są również inne substancje produkowane przez bakterie Bt, które mogą się przyczynić do eliminacji agrofagów i promowania wzrostu roślin. Ponadto podejmowane są próby stosowania szczepów *B. thuringiensis* w procesie bioremediacji terenów skażonych toksycznymi związkami organicznymi oraz w medycynie, w zwalczaniu patogenów ludzkich i zwierzęcych oraz komórek nowotworowych.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka gatunku *Bacillus thuringiensis*. 3. Czynniki wirulencji *Bacillus thuringiensis*. 4. Wykorzystanie *Bacillus thuringiensis* w nowoczesnym rolnictwie 5. Nowe możliwości wykorzystania bakterii *Bacillus thuringiensis*. 6. Podsumowanie

BACILLUS THURINGIENSIS – NEW APPLICATION POTENTIAL

Abstract: One of essential bacteria used in modern agriculture, in particular because of its ability to eradicate insects, is *Bacillus thuringiensis*. Cry and Cyt proteins produced by Bt are selective, therefore using those proteins eliminates only larvae of target insects. There are various other known substances produced by Bt bacteria, that may help with further elimination of pests and promoting plant growth. Furthermore, there are attempts being made to use Bt strains in bioremediation of contaminated sites as well as in medicine, especially in combating human and animal pathogens, or cancer cells.

1. Introduction. 2. Characteristics of *Bacillus thuringiensis*. 3. Virulence factors of *Bacillus thuringiensis*. 4. Applications of *Bacillus thuringiensis* in modern agriculture 5. Novel possible applications of *Bacillus thuringiensis*. 6. Conclusions

Słowa kluczowe: *Bacillus thuringiensis*, białka Cry, bioinsektycydy, bioremediacja, medycyna

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Cry proteins, bioinsecticides, bioremediation, medicine

1. Wprowadzenie

Intensywne rolnictwo konwencjonalne polega na stosowaniu na szeroką skalę pestycydów, które poprzez eliminację patogenów umożliwiają pozyskanie wysokiego plonu roślin uprawnych. Według danych GUS, w 2018 roku ogólna ich produkcja w Polsce wyniosła 23178,4 ton. Stosowanie pestycydów, pomimo skuteczności ich działania cechuje wiele wad, przede wszystkim wykazują toksyczny wpływ na organizm człowieka, a także mogą kumulować się w glebie, doprowadzając do zaburzenia jej równowagi biologicznej [68, 82]. Związki zawarte w pestycydach cechują się dużą rozpuszczalnością w wodzie, przez co z łatwością przedostają się do organizmów żywych. Z tego powodu niewłaściwe stosowanie pestycydów, przykładowo podczas opadów deszczu lub nawadniania pól, powoduje zanieczyszczenie wód powierzchniowych i prowadzić może do zachwiania prawidłowego funkcjonowania procesów biologicznych. Istnieje również ryzyko ich przedostawania się do wód gruntowych [5]. W celu

regulacji racjonalnego stosowania pestycydów wprowadzono integrowaną ochronę roślin, która wykorzystuje różne metody i środki promujące odporność roślin na patogeny i szkodniki. Idea ta nie dąży do całkowitego wykluczenia stosowania związków chemicznych, ale do ograniczenia ich aplikacji na rzecz przyjaznych środowisku metod nie chemicznych [64].

Alternatywą dla pestycydów są preparaty przygotowane na bazie mikroorganizmów, które nie kumulują się w środowisku i nie wykazują antagonistycznego oddziaływania w stosunku do mikrobioty glebowej oraz organizmu ludzkiego i zwierzęcego. Od wielu lat dużym zainteresowaniem cieszą się preparaty zawierające szczepy bakterii *Bacillus thuringiensis* (Bt), stosowanych jako insektycydy. Działanie Bt opiera się na produkcji toksycznych białek krystalicznych Cry i cytotoksycznych białek Cyt, które selektywnie zwalczają owady niszczące uprawy roślin, nie oddziałując negatywnie na organizmy inne niż docelowe. Wyżej wymienione białka działają jedynie na stadium larwalne owadów, podczas gdy jaja oraz dorosłe osobniki nie są na

* Autor korespondencyjny: dr hab. Agnieszka Wolna-Maruwka, prof. UPP. Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Szydlowska 50, 60-656 Poznań; tel. 618466724; email: amaruwka@up.poznan.pl

niewrażliwe [24]. Działanie Cry opiera się na paraliżu mięśni układu pokarmowego, który uniemożliwia larwie dalsze żerowanie [20, 49], jak również uszkodzeniu nabłonka jelitowego, co prowadzi do śmierci larwy [24]. Bt jest wykorzystywany także w inżynierii genetycznej, gdzie odpowiedzialne za owadobójcze działanie geny są włączane do nasion roślin uprawnych, czyniąc je odpornymi na działanie agrofagów [41]. Do innych możliwych aplikacji *B. thuringiensis* należy promowanie wzrostu roślin oraz antagonistyczny wpływ na grzyby patogenne [44]. Ze względu na produkcję bakteriocyn, lipopeptydów oraz parasporyn niniejsze bakterie znalazły również zastosowanie w medycynie [31, 47]. Na uwagę zasługuje ponadto możliwość ich stosowania w bioremediacji terenów zanieczyszczonych toksycznymi związkami organicznymi [33].

2. Charakterystyka gatunku *Bacillus thuringiensis*

Bakterie *B. thuringiensis* zostały po raz pierwszy wyizolowane przez japońskiego naukowca Shigetane Ishiwata w 1901 roku z martwych larw jedwabnika *Bombyx mori*. Kilka lat później, w 1911 roku Bt został ponownie wyizolowany przez Ernsta Berlinera, również z martwych larw śródziemnomorskiej ćmy mącznej *Anagasta kuehniella*, pochodzących z młyna w Turynii. Ernst Berliner nazwał wyizolowany mikroorganizm *B. thuringiensis* na cześć tej niemieckiej prowincji. Odkrycia te przyczyniły się do opisanie biobójczych właściwości Bt wobec larw owadów, co zasugerowało jego możliwe zastosowanie jako biologiczny środek ochrony roślin [41, 65].

Gatunek *B. thuringiensis* należy do domeny *Bacteria*, typu *Firmicutes*, klasy *Bacilli*, rzędu *Bacillales*, rodziny *Bacillaceae* i rodzaju *Bacillus* [67]. Rodzaj *Bacillus* dzieli się na trzy grupy, przy czym *B. thuringiensis* jest zaliczany do grupy *B. cereus*, do której należą *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. toyonensis*, oraz *B. weihenstephanensis* [86]. Przez ostatnie 100 lat, ze względu na różnice w morfologii ich kolonii, właściwości metaboliczne, w tym oporność na penicylinę, bakterie te opisywano jako odrębne gatunki [58]. Cechą odróżniającą szczep *B. thuringiensis* od *B. cereus* jest obecność genów kodujących owadobójcze toksyny, zwykle znajdujących się na plazmidach [37]. Jarret i Stephenson [43] wykazali, że podczas hodowli *B. thuringiensis* z innymi bakteriami w obrębie grupy *B. cereus* może dochodzić do transferu plazmidu zawierającego geny *cry*, tym samym doprowadzając do produkcji owadobójczych białek przez inne mikroorganizmy. Z tego względu zidentyfikowanie bakterii jako *B. thuringiensis* jedynie na podstawie wykazywania zdolności do produkcji białek Cry może być niewiarygodne. Lepszym rozwiązaniem jest zastosowa-

nie nowoczesnych technik, takich jak real-time PCR z wykorzystaniem specyficznych biomarkerów, dzięki którym możliwe jest zidentyfikowanie obecności Bt w badanej próbce [86].

Bakterie *B. thuringiensis* można klasyfikować określając podgatunek, odmianę czy serotyp (odmiana mikroorganizmu, którą można określić za pomocą reakcji z użyciem przeciwciał). Jest to możliwe dzięki wykorzystaniu charakterystycznych cech biochemicznych, różnych antygenów bakterii (serotypowanie H, antygeny kryształów parasporalnych) oraz identyfikacji produkowanych przez nie antybiotyków i esteraz [10, 51, 79]. Typową metodą stosowaną do klasyfikacji Bt jest serotypowanie H, które polega na wywołaniu reakcji immunologicznej wobec bakteryjnego antygeny – flagelliny, białka kodowanego przez gen *hag* [41]. Serotypowanie H ma jednak pewne ograniczenia, wynikające z nierozróżniania szczepów pochodzących z tego samego serotypu [10, 41, 53, 81].

Komórki *B. thuringiensis* są ruchliwymi, urzęsionymi na całej powierzchni, przetrwalnikującymi pałeczkami (d. laseczkami) o długości 2–5 µm oraz szerokości około 1 µm, które zwykle układają się w pary lub krótkie łańcuchy [21, 41]. Cykl życiowy tych Gram-dodatnich bakterii składa się z dwóch faz: wegetatywnego podziału komórki oraz rozwoju spor, inaczej zwanego cyklem sporulacji, który zachodzi przykładowo kiedy w środowisku nie ma wystarczającej ilości składników odżywczych [11, 21]. W trakcie rozmnażania komórka wegetatywna dzieli się na dwie identyczne komórki potomne przez uformowanie nowej ściany komórkowej w połowie błony plazmatycznej. W fazie sporulacji podział komórki przebiega nieco inaczej, jest on asymetryczny i składa się z 7 etapów. W I etapie powstaje filament aksjalny, w etapie II formuje się septum, a w III powstają kryształy parasporalne oraz prespora. Następnie, w etapie IV formuje się egzospora, pierwotna ściana komórkowa, nukleoid oraz osłony białkowe, a jąderko spory ulega przekształceniu. W ostatniej fazie sporulacji (VII) następuje dojrzewanie spor, liza komórki i uwolnienie form przetrwalnych [13, 41, 58].

Kryształy parasporalne są inkluzjami wewnątrzkomórkowymi, zbudowanymi ze skryształizowanego polipeptydu, składającego się z białek Cry, który warunkuje bioaktywność *B. thuringiensis* [65, 84]. Białka Cry są toksyczne dla insektów z rzędów *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Dictyoptera*, *Orthoptera* i *Mallofaga* oraz dla niektórych nicieni, pierwotniaków i roztoczy [3, 84]. Z prowadzonych badań wiadomo, że konkretny szczep *B. thuringiensis* może być wykorzystany do walki z konkretnym gatunkiem owada, np. na *Lepidoptera* działa *B. subsp. kurstaki* oraz *aizawai*, na *Coleoptera* z kolei *B. subsp. tenebrionis*, a na *Diptera* *B. subsp. israelensis* [34]. Wiele toksyn Cry wykazuje niskie aktywności toksyczne przeciwko

komarom, a najbardziej użytecznym w ich zwalczaniu jest szczep *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Jest on wysoce toksyczny w stosunku do różnych gatunków tych owadów, szczególnie dla: *Aedes*, *Culex* i *Anopheles*, które stanowią wektory dla takich chorób, jak żółta febra oraz denga, ale charakteryzuje się jedynie średnią toksycznością względem wektorów malarii [19, 20].

3. Czynniki wirulencji *Bacillus thuringiensis*

Owadobójcze zdolności bakterii z gatunku *B. thuringiensis* opierają się na produkowanych przez nie w procesie sporulacji parasporalnych kryształach, przeważnie złożonych z jednego lub paru białek Cry (Crystal) lub Cyt (Cytolitic) [19]. Toksyny te nazywane są także δ -endotoksynami. Niniejsze nazewnictwo wprowadzone zostało przez Heimpel'a w 1967 roku, ze względu na fakt, że białka te formowane są wewnątrz komórek oraz dlatego, że odkryto je jako czwarte z kolei toksyczne komponenty u tego gatunku bakterii [41]. Toksyny Cry oficjalnie definiuje się jako parasporalne kryształy białek o aktywności owadobójczej [25]. Natomiast do toksyn Cyt zalicza się parasporalne białka Bt, wykazujące aktywność hemolityczną. Stwierdzono, że niniejsze toksyny są wysoce specyficzne w działaniu, w stosunku do docelowych owadów, nieszkodliwe dla ludzi, kręgowców i roślin oraz kompletnie biodegradowalne [19].

Białka Cry wydzielane są w formie rozpuszczalnej w wodzie i należą do grupy toksyn formujących kanały błonowe (pore-forming toxins, PFT) w membranie komórek gospodarza. Powstają w wyniku ekspresji genów *cry*, jako monomery zdolne do oligomeryzacji, czyli łączenia się kilku łańcuchów polipeptydowych w jedną cząsteczkę. Zdolność do zmiany konformacji tych białek jest niezbędnym elementem w procesie ich toksycznego oddziaływania na komórki larw owada, umożliwiającym im wchodzenie w strukturę membrany jelita gospodarza. Inaczej działają toksyny Cyt, które bezpośrednio wchodzi w interakcje z lipidami membrany i wnikają do niej. Badania wskazują, że białka Cyt synergizują lub przełamują odporność przeciw białkom Cry, przez funkcjonowanie jako receptor do wiązania Cry z membraną jelita owada [4, 41].

Mechanizm działania toksycznych białek wytwarzanych przez *B. thuringiensis* jest podobny u wszystkich rzędów owadów. W przeciwieństwie do chemicznych pestycydów, które w większości są toksynami kontaktowymi, białka Cry muszą zostać spożyte przez owada, żeby mogły stać się toksyczne [40]. Według Melo i wsp. [59] oraz Hung i wsp. [40] po spożyciu *B. thuringiensis* przez larwy owada, wyprodukowane przez nie kryształy białek Cry ulegają rozpuszczaniu w jelicie, a następnie w kolejnym etapie uwalniane są protoksyny, nie-

aktywne jeszcze toksyny, których przejście do formy czynnej zachodzi na drodze enzymatycznej [40, 59]. Enzymy odpowiedzialne za ten proces to trawienne proteazy gospodarza; serynowe u przedstawicieli rzędu *Lepidoptera* i *Diptera* oraz cysteinowe i asparaginowe u owadów z rzędu *Coleoptera* [49]. Tak zaktywowane toksyny wiążą się do specyficznych receptorów kadherynowych na powierzchni membrany komórek epitelialnych jelita, po czym ich konformacja ulega zmianie [41, 49]. Następnie zostają wbudowane w błonę jelita, gdzie dochodzi do ich oligomeryzacji i tworzenia kanałów [19]. Białka Cry wchodzi także w kontakt z dodatkowymi receptorami jelita – N-aminopeptydazami, które odpowiadają za zakotwiczenie formujących się kanałów w dwuwarstwie lipidowej jelita [41, 59]. Natomiast białka Cyt wiążą się bezpośrednio z lipidami membrany komórek nabłonka jelita, także tworząc kanały w ich błonie lub niszcząc ją przez oddziaływanie podobne do detergentu [19].

Już w latach 80 ubiegłego wieku Knowles i Ellar [48] stwierdzili, że powstające w błonie komórek jelita kanały są głównym elementem mechanizmu toksycznego działania endotoksyn *B. thuringiensis*, gdyż prowadzą do wystąpienia lizy osmotycznej i śmierci komórki [18, 40, 55]. Dokładnie liza komórek epitelialnych jelita wywoływana jest przez zmianę ciągłości i utratę funkcyjności membrany, powodowaną przez powstające w niej kanały [12, 36, 91]. Zhang i wsp. [92] przedstawili inny możliwy model działania białek Cry na komórki owada, który zaprzecza wcześniejszej teorii. Zdaniem niniejszych autorów samo formowanie kanałów litycznych jest niewystarczające do spowodowania śmierci komórki. Zaproponowany model zakłada, że śmierć komórek owadzych wywołana jest nie przez stres osmotyczny, a szereg reakcji zmieniających metabolizm komórkowy, do których zachodzi po związaniu toksyny Cry z receptorem jelitowym. Według tej teorii wiązanie białka Cry do kadheryn i N-aminopeptydaz wywołuje, w jeszcze dokładnie niepoznanym procesie przekaz bodźca aktywującego kanały Mg^{2+} w błonie plazmatycznej komórek epitelialnych owadów, czego następstwem jest zwiększenie poziomu komórkowego cAMP (cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan) [91, 92]. Do śmierci komórek dochodzi w wyniku działania kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP. Niniejsze zjawisko nazywamy onkozą, gdyż zaobserwowana przez Zhang i wsp. [92] śmierć poddanych transfekcji komórek pobranych z jajnika *Trichoplusia ni*, nie wykazywała cech charakterystycznych dla apoptozy ani endocytozy, a powodowana była przez ich pęcznienie oraz zwiększoną przepuszczalność membrany [85]. Niezależnie od przyjętej teorii, co do dokładnego cytotoksycznego wpływu białek Cry na komórki epitelialne jelita, wiadomo, że ich zniszczenie wywołuje paraliż jelita środkowego larw owadów i prowadzi do

śmierci w wyniku wygłodzenia. Zdaniem Raymonda i wsp. [73] niekiedy do śmierci owada może także dochodzić w wyniku postępującej infekcji bakteryjnej i wywołania posocznicy. Dzieje się tak, gdy przez zniszczone komórki nabłonka jelita do hemolimfy owada przedostają się wegetatywne komórki *B. thuringiensis*. Wówczas ich namnażanie w organizmie larwy może prowadzić do ciężkiej infekcji bakteryjnej – sepsy, skutkującej śmiercią.

Choć owadobójczość *B. thuringiensis* opiera się głównie na toksycznych białkach Cry, to bakterie te produkują także inne czynniki wirulentne. Czynniki te mogą samodzielnie wpływać biobójczo na owady, np. białka Vip, proteiny Sip oraz beta-egzotoksyna lub działać synergistycznie wraz z toksynami Bt, np. proteina P20, czy enzym chitynaza [49]. Podczas wegetatywnej fazy wzrostu bakterie *B. thuringiensis* wytwarzają białka Vip (vegetative insecticidal proteins), które wykazują działanie insektycydowe nawet na owady, które wykształciły odporność na białka krystaliczne oraz beta-egzotoksynę, stanowiącą inhibitor dla polimerazy RNA zależnej od DNA. Wspomniana wyżej egzotoksyna wpływa negatywnie nie tylko na bezkręgowce, ale także na kręgowce, dlatego szczepy charakteryzujące się ich syntezą, nie mogą być wykorzystywane do produkcji biopestycydów [32, 38]. Chitynaza poza wykazywaniem właściwości synergistycznych wobec toksyn Cry jest istotnym enzymem biorącym udział w infekcji owadów, gdyż doprowadza do powstawania perforacji w błonie komórek jelita owadów, umożliwiając przedostanie się bakterii do hemocelu (jama ciała u niektórych bezkręgowców) [77]. Natomiast ekspresja genu odpowiadającego za produkcję białka P20 wpływa na potranskrypcyjne zwiększenie akumulacji białek krystalicznych w komórce i może pełnić także funkcję stabilizującą dla białek Cry [88].

4. Wykorzystanie *Bacillus thuringiensis* w nowoczesnym rolnictwie

Postęp cywilizacyjny oraz obowiązujące prawodawstwo wymagają stosowania innowacyjnych środków ochrony roślin w rolnictwie, w tym również tych opracowanych na bazie mikroorganizmów. Ciągłe dążenie do zwiększenia produkcji żywności, w związku ze stałym wzrostem ludności na świecie pociąga za sobą nadmierne stosowanie chemicznych środków ochrony roślin. Wysoce istotne wydaje się otrzymywanie wysokiego plonu roślin, przy zachowaniu tej samej powierzchni uprawy, zadbanie o zachowanie bezpieczeństwa ludzi, zwierząt i środowiska, a także zapewnieniu plonu wolnego od patogenów.

Obecnie często odnotowywanym zjawiskiem jest nabywanie odporności przez owady na chemiczne

środki ochrony roślin, co prowadzi do stosowania większych ich dawek, a tym samym przyczynia się do zaburzenia funkcjonowania całych agrobiocenoz [26]. W celu regulacji powyższych kwestii w dniu 21 października 2009 roku wprowadzona została dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE, zgodnie z którą niezwykle istotne jest wykazanie, że środki ochrony roślin nie wpływają negatywnie na środowisko, a jednocześnie zapewniają jednoznaczne korzyści dla produkcji rolnej [27]. W Polsce integrowaną ochronę roślin definiuje Ustawa z dnia 8 marca 2013 r. o środkach ochrony roślin (Dz. U. poz. 455) [28, 29], która nastawiona jest na wykorzystanie metod minimalizujących zużycie chemicznych środków ochrony roślin, zastosowanie odpowiedniej agrotechniki, stosowanie tolerancyjnych lub odpornych odmian roślin oraz zwalczanie patogenów na drodze biologicznej [30]. W Art. 35 wyżej wymienionej ustawy podkreślona została zasadność stosowania preparatów biologicznych, w sposób nie zagrażający środowisku, a także bezpieczny dla zdrowia ludzi i zwierząt [29].

Stosowanie biologicznych środków ochrony roślin jest doskonałą alternatywą dla chemicznych środków ochrony roślin. Preparaty zawierające w swoim składzie Bt nie wykazują negatywnego oddziaływania na człowieka oraz nie zanieczyszczają środowiska, a dodatkowym ich atrybutem jest stosunkowo niski koszt. Ponadto bardzo rzadko powodują wykształcenia odporności u larw owadów, aczkolwiek jest to możliwe [56].

Bioinsektycydy na bazie Bt cieszą się dużą popularnością. Już w 2006 roku biopreparaty, zawierające w swoim składzie spory *B. thuringiensis* i kryształy białkowe przez nie wytwarzane, stanowiły 75% światowego rynku biologicznych środków ochrony roślin [49, 83].

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań nad sposobem produkcji bakteryjnych bioinsektycydów na bazie alternatywnych mediów, takich jak: melasa, skrobia, w tym skrobia kukurydziana, ziarna zbóż, otręby pszenne czy słoma ryżowa, a także osady ściekowe czy osady z sadzawek krewetek [7, 13, 64, 85, 94]. Surowce te dzięki temu, że stanowią odpady z produkcji rolno-przemysłowej są znacznie tańsze niż konwencjonalnie stosowane syntetyczne media zawierające soję, czystą glukozę czy ekstrakt z kukurydzy. Zastosowanie tańszych podłoży do namnażania bakterii *B. thuringiensis*, stanowiących nawet 50% całkowitych kosztów produkcji, pozwala na znaczne zmniejszenie kosztowności niniejszego procesu [95]. Dodatkowo możliwość wykorzystania odpadów jako podłoży do hodowli Bt rozwiązuje problem z ich utylizacją. Badania prowadzone przez Brar i wsp. [15] oraz Zhuang i wsp. [93, 94] wykazują, że przy zastosowaniu odpowiednich metod produkcji, także stosowanie ścieków czy różnego typu osadów komunalnych daje zadowalające rezultaty względem promowania rozwoju bakterii,

Tabela I
Przykładowe insektycydy zawierające *Bacillus thuringiensis* dostępne na rynku europejskim

Preparat	Producent	Kraj producenta	Szczep Bt	Docelowa grupa owadów
XenTari®	Sumitomo Chemical Agro Europe	Francja	<i>Bt</i> ssp. <i>aizawai</i> szczep ABTS-1857	<i>Lepidoptera</i>
Agree 50 WG	Mitsui AgriScience International	Belgia	<i>Bt</i> ssp. <i>aizawai</i> szczep GC-91	
Xtreem®	KENOGARD	Hiszpania	<i>Bt</i> ssp. <i>aizawai</i> szczep ABTS-1857	
DiPel®	Sumitomo Chemical Agro Europe	Francja	<i>Bt</i> ssp. <i>kurstaki</i> szczep ABTS 351	<i>Lepidoptera</i>
Biobit®	Sumitomo Chemical Agro Europe	Francja	<i>Bt</i> ssp. <i>kurstaki</i> szczep ABTS 351	
Delfin WG	Mitsui AgriScience International	Belgia	<i>Bt</i> ssp. <i>kurstaki</i> szczep SA-11	
LEPINOX® Plus	CBC (Europe)	Włochy	<i>Bt</i> ssp. <i>kurstaki</i> szczep EG 2348	
VectoBac®	Sumitomo Chemical Agro Europe	Francja	<i>Bt</i> ssp. <i>israelensis</i> szczep AM65-52	<i>Diptera</i>
Novodor®	Sumitomo Chemical Agro Europe	Francja	<i>Bt</i> ssp. <i>tenebrionis</i>	<i>Coleoptera</i>

Na podstawie: [51, 83, 90].

sporulacji i formowania toksyn, w porównaniu do zwykle stosowanych w tych procesach mediów sojowych. Jednym z głównych problemów w stosowaniu osadów ściekowych jako alternatywnego źródła dla produkcji mikrobiologicznych środków ochrony roślin jest obecność w nich metali ciężkich, gdyż w nieodpowiednim stężeniu mogą hamować wzrost i rozwój bakterii.

Przykładowe biologiczne środki ochrony roślin skonstruowane na bazie Bt, wykazujące selektywne oddziaływanie na poszczególne organizmy owadzie, zebrane zostały w tabeli nr I [49, 80, 87]. Insektycydy zawierające w swoim składzie szczep *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* działają biobójczo na owady z rzędu *Diptera*, do których zaliczamy lenie. Ich larwy żerują na korzeniach młodych roślin warzywnych i zbóż. Natomiast najbardziej znane spośród szkodników roślin kapustowatych larwy bielinka kapustnika oraz bielinka rzepnika (rząd *Lepidoptera*), powodujące gołozery liści, są zwalczane przez *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* lub subsp. *kurstaki* [63].

Zastosowanie mikrobiologicznych środków ochrony roślin niesie ze sobą wiele korzyści dla środowiska. Jednakże, niezwykle istotna jest wiedza i świadomość użytkowników niniejszych biopreparatów, pozwalająca na prawidłowe rozpoznanie żerujących owadów i ukierunkowane dobranie odpowiedniego szczepu *B. thuringiensis*.

5. Nowe możliwości wykorzystania bakterii *Bacillus thuringiensis*

Zastosowanie *B. thuringiensis* w nowoczesnym rolnictwie, jako bioinsektycydów oraz w konstruowaniu roślin GMO odpornych na szkodniki owadzie, to jeden z obszarów analiz dotyczących tego gatunku bakterii. Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały ponadto możliwość zastosowania niektórych szcze-

pów Bt w biologicznej kontroli grzybów patogennych, w promowaniu wzrostu roślin, bioremediacji gleb skażonych oraz w produkcji związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwnowotworowej [44].

Rośliny uprawne podatne są na wiele chorób, w tym również wywołanych przez grzyby patogenne. Wykazano, że bakterie *B. thuringiensis* przejawiają aktywność przeciwgrzybiczą, głównie w stosunku do patogenów z rodzaju *Fusarium* [35, 75, 76], *Sclerotium* [74, 78] oraz *Rhizoctonia* [35]. Antagonistyczne działania Bt w stosunku do wyżej wymienionych patogenów oparte jest na produkcji chitynaz oraz proteaz, enzymów przyczyniających się do trawienia strzępek patogenów oraz wytwarzaniu lipopeptydu – fengicyny (fengycin). Wykazano, że właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze niniejszego antybiotyku dają możliwość zastosowania go jako środka biokontroli, nie tylko w rolnictwie, ale również w medycynie [47].

Niektóre szczepy *B. thuringiensis* kolonizujące korzenie roślin, zalicza się do grupy PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria), które poprzez produkcję witamin oraz fitohormonów pozytywnie wpływają na wzrost i rozwój roślin. Potencjał wykorzystania Bt lub ich mieszanin z innymi mikroorganizmami, w postaci nawozów biologicznych poprawiających rozwój roślin, zaobserwowano na przykładzie uprawy soi, groszku polnego, soczewicy, czy kukurydzy [6, 8, 60, 61]. Bai i wsp. [8] wykazali, że koinokulacja soi szczepami *B. thuringiensis* NEB17 oraz *Bradyrhizobium japonicum* istotnie poprawiła wzrost roślin. Pozytywny wpływ koinokulacji soi szczepem *B. thuringiensis* KR1 oraz *B. japonicum* na plon roślin zaobserwowali również w swoich badaniach Mishra i wsp. [61]. Z badań wyżej wymienionych autorów wynika ponadto, że zastosowanie Bt KR1 wraz z *Rhizobium leguminosarum*-PR1 w większym stopniu wpływało na wzrost groszku polnego i soczewicy, niż inokulacja roślin jedynie szczepem *R. leguminosarum*-PR1 [60]. Pomimo, że wyniki badań prowadzonych

nad pozyskiwaniem szczepów Bt o wysokiej aktywności PGPB są bardzo obiecujące, to na rynku bionawozów nadal nie ma preparatu, który by na nich bazował. Dlatego też dokładniejsze zrozumienie mechanizmu interakcji pomiędzy niniejszymi bakteriami a roślinami wydaje się być niezbędne [44].

Obecnie prowadzone są również badania dotyczące zastosowania bakterii *B. thuringiensis* w procesie bioremediacji gleb skażonych. Zanieczyszczenie środowiska związkami chemicznymi stanowi ogromny problem ekologiczny, dlatego poszukuje się opłacalnych i efektywnych metod usuwania tych substancji z gleby, wody czy powietrza. Do degradacji związków organicznych zanieczyszczających glebę wykorzystuje się mikroorganizmy, które na drodze bioremediacji prowadzą do całkowitej ich utylizacji [33]. *B. thuringiensis* poza właściwościami owadobójczymi wykazuje zdolność do rozkładu niektórych toksycznych związków organicznych. Z przeglądu literatury wynika, że był on stosowany do rozkładu ftalanu dimetylu [16], fipronilu [57], trifenylocyny [39], bisfenolu A [54] czy policyklicznych węglowodorów aromatycznych (PHA), takich jak np. fenantren, a także niektórych pestycydów np. imidakloprydu [33] czy cyhalotryny [22]. Z badań Brar i wsp. [16] wynika, że *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* produkuje specyficzne enzymy odpowiedzialne za biodegradację DMP (ftalan dimetylu), dzięki czemu jest w stanie wzrastać na podłożu zanieczyszczonym tym związkiem i wykorzystywać go jako źródło węgla. Wyizolowany przez Chen i wsp. [22] szczep *B. thuringiensis* ZS-19 wykazywał zdolność całkowitego rozkładu cyhalotryny, już w przeciągu 72 h. Mandal i wsp. [57] zaobserwowali, że obecność bakterii *B. thuringiensis* w środowisku zanieczyszczonym fipronilem znacznie przyspiesza tempo jego rozkładu, zmniejszając wykrywalność fipronilu w glebie z ponad 56 dni do 35–42 dni. Yi i wsp. [89, 90] w badaniach z wykorzystaniem szczepu *B. thuringiensis* GIMCC1.817 uzyskali niemal 80% stopień degradacji trifenylocyny (TPT) już w ciągu 7 dni, związany z efektem zerwania przez bakteryjny cytochrom P450 wiązania węgla-metal w cząsteczce TPT. Natomiast Li i wsp. [54] uzyskali w ciągu 24 h 85% wydajność degradacji bisfenolu A, którego mineralizacja opiera się najpewniej na działaniu NADPH (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy). Wyniki uzyskane przez Ferreira i wsp. [33] wskazują także na wysoki potencjał niniejszego gatunku bakterii w mineralizowaniu różnorodnych wielopierścieniowych związków aromatycznych, a także chemicznych pestycydów, co zdaniem wyżej wymienionych autorów wpływa na zwiększenie atrakcyjności tego gatunku do zastosowań w procesie bioremediacji.

Bakterie *B. thuringiensis* poza produkcją toksycznych białek, wytwarzają także inne związki oddziałujące na organizmy żywe, wykorzystywane w medycynie,

takie jak bakteriocyny, nanocząsteczki srebra, czy parasporyny o aktywności przeciwnowotworowej. Cechą znacznej większości bakterii jest syntezowanie przynajmniej jednej bakteriocyny [71]. Bakteriocyny są naturalnymi peptydami wpływającymi hamująco na wzrost zarówno gatunków bakterii z nimi niespokrewnionych, jak i blisko spokrewnionych [9]. W przeciwieństwie do antybiotyków, które stanowią metabolity wtórne mikroorganizmów, bakteriocyny są produktami syntezy rybosomalnej, wykazującymi wąskie spektrum działania [14]. Do roku 2013 poznanych zostało 18 różnych bakteriocyn wytwarzanych przez szczepy *B. thuringiensis*, m.in. subsp. *morrisoni*, *kurstaki*, *entomocidus*, *tolworthi*, czy *thuringiensis* [52]. Związki te wykazują inhibicję względem wielu patogennych bakterii ludzi i zwierząt, takich jak *Staphylococcus aureus* [9], *Listeria monocytogenes*, *Paenibacillus larvae*, czy inne gatunki *Bacillus* [23], a także bakterie *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, czy *Shigella flexneri* [71]. Zainteresowanie badaniami nad bakteriocynami wynika z potencjału ich praktycznego stosowania w medycynie zamiast antybiotyków, w związku z coraz częstszym pojawianiem się szczepów bakterii opornych na wiele z nich [44, 52]. Poza bakteriocynami, związkami produkowanymi przez *B. thuringiensis*, przydatnymi w zwalczaniu mikroorganizmów są lipopeptydy np. kurstakina (kurstakin), czy wspomniana już wcześniej fengicyna [31]. Niektóre szczepy *B. thuringiensis* wykazują również zdolność do produkcji nanocząsteczek srebra, które charakteryzują się wysoką aktywnością toksyczną względem różnych patogennych bakterii, przykładowo *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, czy *E. faecalis* [42, 46, 66]. Badania przeprowadzone przez Khaleghi i wsp. [46] wykazały, że nanocząsteczki srebra o średnicy 42 nm wykazywały działanie bakteriobójcze względem wszystkich sześciu, wyżej wymienionych gatunków mikroorganizmów referencyjnych. Zdaniem niniejszych autorów rozwój technologii wytwarzania nanocząsteczek przez Bt ma duży potencjał do produkcji preparatów eliminujących i zabezpieczających powierzchnie sprzętu medycznego przed powstawaniem biofilmu, w skład którego wchodzić mogą patogenne bakterie.

Wśród szczepów *B. thuringiensis* wykryto również izolaty wykazujące aktywność cytotoksyczną względem kilku ssaczych linii komórkowych oraz zidentyfikowano parasporyny nakierowane na nowotworowe komórki ssacze [1]. Parasporyny (PS) są to białka Cry, które nie wykazują aktywności insektycydowej, ani hemolitycznej, za to charakteryzują się cytotoksycznością w stosunku do komórek nowotworów ludzkich, jednocześnie nie wpływając na zdrowe komórki organizmu [69]. Z 6 subklas tych związków, szczególnie szeroko badane są parasporyny-2 (PS2), które

wykazują przeciwnowotworowe działanie względem zmutowanych linii komórek jelita grubego [2, 17, 50, 62, 72], wątroby [2, 17], szyjki macicy [17, 50], piersi [17], prostaty [17], chłoniaka [72] oraz białaczki [62]. Badania prowadzone przez Katayama i wsp. [45] wykazały, że również parasporyny-1 (PS1) wykazują aktywność przeciwnowotworową względem tumorów szyjki macicy, wątroby, jak również białaczki. Natomiast białko Cry45Aa, zaliczane do parasporyn-4 (PS4), wyizolowane z komórek Bt przez Okumura i wsp. [70], działało cytotoksycznie na linię komórek raka jelita grubego, wątroby oraz chłoniaka. Mechanizmy działania parasporyn na komórki nowotworowe są różne i zależne od docelowego rodzaju komórek na jakie oddziałują. PS1 oddziałują cytotoksycznie na komórki nowotworowe poprzez aktywowanie sygnałów apoptozy oraz zwiększenie stężenia Ca^{2+} wewnątrz nich. PS2 przez tworzenie kanałów w membranie komórek nowotworowych, zbliżone są w swoim działaniu do insektycydowych białek Cry. Natomiast PS4 doprowadzają do śmierci komórek nowotworów przez niespecyficzne wiązanie do błony i tworzenie w nich kompleksów oligomerycznych [44]. Głębsze poznanie mechanizmu ich działania na komórki rakowe i ogólnego wpływu na organizm człowieka stwarza ogromne możliwości w zastąpieniu nimi różnego rodzaju farmaceutyków stosowanych w medycynie.

6. Podsumowanie

Wzrost świadomości społeczeństwa na temat zagrożeń wynikających z szerokiego stosowania związków chemicznych w uprawach roślin, ich wpływu na środowisko i organizm ludzki, przyczynił się do zwiększenia zainteresowania biologicznymi środkami ochrony roślin. Popularną alternatywę dla chemicznych insektycydów stanowią preparaty na bazie *B. thuringiensis*, które charakteryzują się wysoką skutecznością działania, nie kumulują się w glebie i nie doprowadzają do zaburzenia jej równowagi biologicznej. Ponadto niektóre szczepy Bt poprzez produkcję metabolitów wtórnych oraz indukowanie odporności roślin przyczyniają się do biologicznej kontroli i promowania ich wzrostu i rozwoju. W ostatnich latach wykazano szerokie możliwości zastosowania tych bakterii poza obszarem rolniczym, przykładowo w bioremediacji terenów skażonych, w medycynie; w niszczeniu patogenów bakteryjnych, czy komórek nowotworowych. Prowadzenie dalszych badań nad *B. thuringiensis* powinno się skupiać na poszukiwaniu nowych, wydajniejszych szczepów, jak również optymalizacji procesów prowadzonych z ich udziałem, zmierzających do uzyskania nowych farmaceutyków, fungicydów, bionawozów oraz preparatów stosowanych w procesie bioremediacji terenów skażonych.

Piśmiennictwo

- 1 Abe Y., Inoue H., Ashida H., Maeda Y., Kinoshita T., Kitada S.: Glycan region of GPI anchored-protein is required for cytoxic oligomerization of an anticancer parasporin-2, Cry46Aa1 protein, from *Bacillus thuringiensis* strain A1547. *J. Invertebr. Pathol.* **142**, 71–81 (2017)
- 2 Abe Y., Shimada H., Kitada S.: Raft-targeting and oligomerization of parasporin-2, a *Bacillus thuringiensis* crystal protein with anti-tumour activity. *J. Biochem.* **143**, 269–275 (2008)
- 3 Ackermann H.W., Azizbekyan R.R., Bernier R.L., de Barjac H., Saindoux S., Valéro J.R., Yu M.X.: Phage typing of *Bacillus subtilis* and *B. thuringiensis*. *Res. Microbiol.* **146**, 643–657 (1995)
- 4 Adang M.J., Crickmore N., Jurat-Fuentes J.L.: Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. *Adv. Insect Phys.* **47**, 39–87 (2014)
- 5 Arias-Estévez M., López-Periago E., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J., Mejuto J.C., García-Río L.: The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric. Ecosyst. Environ.* **123**, 247–260 (2008)
- 6 Armada E., Azcón R., López-Castillo O.M., Calvo-Polanco M., Ruiz-Lozano J.M.: Autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus thuringiensis* from a degraded Mediterranean area can be used to improve physiological traits and performance of a plant of agronomic interest under drought conditions. *Plant Physiol. Biochem.* **90**, 64–74 (2015)
- 7 Azmi N.U., Ghafar N.S.A., Yin C.J., Yakubu S., Adli A.A., Aziz N.A.A., Mustafa M.: Toxicity of *Bacillus thuringiensis* biopesticide produced in shrimp pond sludge as alternative culture medium against *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Acta Biol. Malaysiana.* **4**, 5–16 (2015)
- 8 Bai Y., Zhou X., Smith D.L.: Crop ecology, management and quality: Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* **43**, 1774–1781 (2003)
- 9 Barboza-Corona J.E., de la Fuente-Salcido N., Alva-Murillo N., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J.E.: Activity of bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis* against *Staphylococcus aureus* isolates associated to bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **138**, 179–183 (2009)
- 10 de Barjac H., Frachon E.: Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga.* **35**, 233–240 (1990)
- 11 Bartoszewicz M., Czyżewska U.: Taksonomia, wirulencja i cykle życiowe *Bacillus cereus* sensu lato. *Post. Mikrobiol.* **56**, 440–450 (2017)
- 12 Baxter S. W., Badenes-Pérez F.R., Morrison A., Vogel H., Crickmore N., Kain W., Wang P., Heckel D.G., Jiggins C.D.: Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics* **189**, 675–679 (2011)
- 13 Bechtel D. B., Bulla L. A.: Ultrastructural analysis of membrane development during *Bacillus thuringiensis* sporulation. *J. Ultrastructure Res.* **79**, 121–132 (1982)
- 14 Błaszczuk U., Moczarny J.: Bacteriocyny bakterii Gram-ujemnych – struktura, mechanizm działania i zastosowanie. *Post. Mikrobiol.* **55**, 157–171 (2016)
- 15 Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y.: Efficient centrifugal recovery of *Bacillus thuringiensis* biopesticides from fermented wastewater and wastewater sludge. *Water Res.* **40**, 1310–1320 (2006)
- 16 Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Valéro J.R., Surampalli R.Y.: Concurrent degradation of dimethyl phthalate (DMP) during production of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *J. Hazard. Mater.* **171**, 1016–1023 (2009)
- 17 Brasseur K., Auger P., Asselin E., Parent S., Côté J.C., Sirois M.: Parasporin-2 from a new *Bacillus thuringiensis* 4r2 strain induces

- caspases activation and apoptosis in human cancer cells. *PLoS One*. **10**, 1–22 (2015)
- 18 Bravo A., Gómez I., Conde J., Muñoz-Garay C., Sánchez J., Miranda R., Zhuang M., Gill S.S., Soberón M.: Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **1667**, 38–46 (2004)
 - 19 Bravo A., Gill S.S., Soberón M.: Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. **49**, 423–435 (2007)
 - 20 Bravo A., Likitvivanavong S., Gill S.S., Soberón M.: *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**, 423–431 (2011)
 - 21 Bulla L.A., Bechtel D.B., Kramer K.J., Shethna Y.I., Aronson A.I., Fitz-James P.C.: Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Microbiol.* **8**, 147–204 (1980)
 - 22 Chen S., Deng Y., Chang C., Lee J., Cheng Y., Cui Z., Zhou J., He F., Hu M., Zhang L.H.: Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19. *Sci. Rep.* **5**, 1–10 (2015)
 - 23 Cherif A., Rezgui W., Raddadi N., Daffonchio D., Boudabous A.: Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110. *Microbiol. Res.* **163**, 684–692 (2008)
 - 24 Ciesielska J., Malusà E., Sas – Paszt L.: Środki ochrony roślin stosowane w rolnictwie ekologicznym. Opracowanie innowacyjnych technologii dla ekologicznej produkcji roślin sadowniczych. praca **3**, 1–81 (2011)
 - 25 Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean D.H.: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775–806 (1998)
 - 26 Dominik A., Schönthaler J.: Integrowana ochrona roślin w gospodarstwie. Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie (2012)
 - 27 Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej: Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG, z dnia 21.10.2009 roku (2009)
 - 28 Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej: Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/128/WE z dnia 21 października 2009 r. ustanawiająca ramy wspólnotowego działania na rzecz zrównoważonego stosowania pestycydów (2009)
 - 29 Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej: Ustawa o środkach ochrony roślin z dnia 8.03.2013 roku, Warszawa (2013)
 - 30 Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej: Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o ochronie roślin z dnia 12.03.2014 roku, Warszawa (2014)
 - 31 Fagerlund A., Dubois T., Økstad O.A., Verplaetse E., Gilois N., Bennaceur I., Perchat S., Gominet M., Aymerich S., Kolstø A.B., Lereclus D., Gohar M.: SinR controls enterotoxin expression in *Bacillus thuringiensis* biofilms. *PLoS One*, **9**, e87532 (2014)
 - 32 Fang J., Xu X., Wang P., Zhao J.Z., Shelton A.M., Cheng J., Feng M.G., Shen Z.: Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 956–961 (2007)
 - 33 Ferreira L., Rosales E., Danko A.S., Sanromán M A., Pazos M.M.: *Bacillus thuringiensis* a promising bacterium for degrading emerging pollutants. *Process Saf. Environ. Prot.* **101**, 19–26 (2016)
 - 34 Frankenhuyzen K. van: Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J. Invertebr. Pathol.* **101**, 1–16 (2009)
 - 35 Gomaa E.Z.: Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *J. Microbiol.* **50**, 103–111 (2012)
 - 36 Gómez I., Sánchez J., Miranda R., Bravo A., Soberón M.: Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* **513**, 242–246 (2002)
 - 37 Helgason E., Økstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolsto A.B.: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2627–2630 (2000)
 - 38 Hernández C. S., Martínez C., Porcar M., Caballero P., Ferré J.: Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I β -exotoxin production. *J. Invertebr. Pathol.* **82**, 57–62 (2003)
 - 39 Huang J., Ye J., Ma J., Gao J., Chen S., Wu X.: Triphenyltin biosorption, dephenylation pathway and cellular responses during triphenyltin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* and tea saponin. *Chem. Eng. J.* **249**, 167–173 (2014)
 - 40 Hung T.P., Truong L.V., Binh N.D., Frutos R., Quiquampoix H., Staunton S.: Persistence of detectable insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* (Cry) and toxicity after adsorption on contrasting soils. *Environ. Pollut.* **208**, 318–325 (2016)
 - 41 Ibrahim M.A., Griko N., Junker M., Bulla L.A.: *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *Bioeng. Bugs.* **1**, 31–50 (2010)
 - 42 Jain D., Kachhwaha S., Jain R., Srivastava G., Kothari S.: Novel microbial route to synthesize nanoparticles using spore crystal mixture of *Bacillus thuringiensis*. *Indian J. Exp. Biol.* **48**, 1152–1156 (2010)
 - 43 Jarrett P., Stephenson M.: Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1608–1614 (1990)
 - 44 Jouzani G. S., Valijanian E., Sharafi R.: *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 2691–2711 (2017)
 - 45 Katayama H., Yokota H., Akao T., Nakamura O., Ohba M., Mekada E., Mizuki E.: Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biochem.* **137**, 17–25 (2005)
 - 46 Khaleghi M., Khorrami S., Ravan H.: Identification of *Bacillus thuringiensis* bacterial strain isolated from the mine soil as a robust agent in the biosynthesis of silver nanoparticles with strong antibacterial and anti-biofilm activities. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **18**, 101047 (2019)
 - 47 Kim P. I., Bai H., Bai D., Chae H., Chung S., Kim Y., Park R., Chi Y.T.: Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 942–949 (2004)
 - 48 Knowles B.H., Ellar D.J.: Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochem. Biophys. Acta.* **924**, 509–518 (1987)
 - 49 Konecka E., Kaznowski A., Baranek J.: Wykorzystanie bakterii *Bacillus thuringiensis*. *Post. Mikrobiol.* **50**, 303–311 (2011)
 - 50 Krishnan K., Ker J.E.A., Mohammed S.M., Nadarajah V.D.: Identification of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a binding protein for a 68-kDa *Bacillus thuringiensis* parasporal protein cytotoxic against leukaemic cells. *J. Biomed. Sci.* **17**, 1–11 (2010)
 - 51 Krywienczyk J., Dulmage H.T., Fast P.G.: Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3 ab var. *kurstaki*. *J. Invertebr. Pathol.* **31**, 372–375 (1978)

- 52 de la Fuente-Salcido N.M., Casados-Vázquez L.E., Barboza-Corona J.E.: Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. *Can. J. Microbiol.* **59**, 515–522 (2013)
- 53 Lecadet M.M., Frachon E., Cosmao Dumanoir V., Ripoueteau H., Hamon S., Laurent P., Thiéry I.: Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 660–672 (1999)
- 54 Li C., Lu Q., Ye J., Qin H., Long Y., Wang L., Ou H.: Metabolic and proteomic mechanism of bisphenol A degradation by *Bacillus thuringiensis*. *Sci. Total Environ.* **640**, 714–725 (2018)
- 55 De Maagd R. A., Bravo A., Crickmore N.: How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* **17**, 193–199 (2001)
- 56 Malinowski H.: Powstawanie odporności na insektycydy u owadów. *Pr. Inst. Badaw. Leśnictwa*. seria A, **1** [908–912], 5–40 (2001)
- 57 Mandal K., Singh B., Jariyal M., Gupta V.K.: Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **93**, 87–92 (2013)
- 58 Maughan H., Van der Auwera G.: *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 789–797 (2011)
- 59 Melo A.L.D.A., Soccol V.T., Soccol C.R.: *Bacillus thuringiensis*: Mechanism of action, resistance, and new applications: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 317–326 (2016)
- 60 Mishra P.K., Mishra S., Selvakumar G., Bisht J.K., Kundu S., Gupta H.S.: Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 753–761 (2009)
- 61 Mishra P.K., Mishra S., Selvakumar G., Kundu S., Shankar Gupta H.: Enhanced soybean (*Glycine max* L.) plant growth and nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*-SB1 in presence of *Bacillus thuringiensis*-KR1. *Acta Agric. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.* **59**, 189–196 (2009)
- 62 Moazamian E., Bahador N., Azarpira N., Rasouli M.: Anti-cancer parasporin toxins of new *Bacillus thuringiensis* against human colon (HCT-116) and blood (CCRF-CEM) cancer cell lines. *Curr. Microbiol.* **75**, 1090–1098 (2018)
- 63 Mrówczyński M., Wachowiak H., Pruszyński G.: Atlas szkodników owadów pożytecznych i zapylających szkodniki rzepaku. Instytut Ochrony Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, ISBN 978-83-89867-97-1 (2014)
- 64 Mucha S.: Integrowana ochrona roślin. <https://www.gov.pl/web/rolnictwo/integrowana-ochrona-roslin>
- 65 Nakamura L.K.: DNA Relatedness among *Bacillus thuringiensis* Serovars. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 125–129 (2009)
- 66 Nayak P.S., Arakha M., Kumar A., Asthana S., Mallick B.C., Jha S.: An approach towards continuous production of silver nanoparticles using *Bacillus thuringiensis*. *RSC Adv.* **6**, 8232–8242 (2016)
- 67 NCBI Taxonomy: *Bacillus thuringiensis* Taxonomy. ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1428&lvl=3&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock (2019)
- 68 Nicolopoulou-Stamati P., Maipas S., Kotampasi C., Stamatis P., Hens L.: Chemical Pesticides and Human Health: The urgent need for a new concept in agriculture. *Front. Public Health.* **4**, 148 (2016)
- 69 Ohba M., Mizuki E., Uemori A.: Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Res.* **29**, 427–433 (2009)
- 70 Okumura S., Saitoh H., Ishikawa T., Wasano N., Yamashita S., Kusumoto K.I., Akao T., Mizuki E., Ohba M., Inouye K.: Identification of a novel cytotoxic protein, Cry45Aa, from *Bacillus thuringiensis* A1470 and its selective cytotoxic activity against various mammalian cell lines. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 6313–6318 (2005)
- 71 Pacheco-Cano R.D., de la Fuente-Salcido N.M., Salcedo-Hernández R., León-Galván M.F., Bideshi D.K., Hernández-Guzmán G., Barboza-Corona J.E.: Characterization, N-terminal sequencing and classification of Tolworthicin 524: A bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. *Microbiol. Res.* **169**, 948–953 (2014)
- 72 Poornima K., Selvanayagam P., Shenbagarathai R.: Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 348–354 (2010)
- 73 Raymond B., Johnston P.R., Nielsen-LeRoux C., Lereclus D., Crickmore N.: *Bacillus thuringiensis*: An impotent pathogen? *Trends Microbiol.* **18**, 189–194 (2010)
- 74 Reyes-Ramírez A., Escudero-Abarca B. I., Aguilar-Uscanga G., Hayward-Jones P.M., Barboza-Corona J.E.: Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *J. Food Sci.* **69**, M131–M134 (2006)
- 75 Rocha L.O., Tralamazza S.M., Reis G.M., Rabinovitch L., Barbosa C.B., Corrêa B.: Multi-method approach for characterizing the interaction between *Fusarium verticillioides* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *PLoS One.* **9**, e92189 (2014)
- 76 Sadif N., Cherif M., Fliss I., Boudabbous A., Antoun H.: Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of *Fusarium* dry rot of potato tubers. *J. Plant Pathol.* **83**, 101–117 (2001)
- 77 Sampson M.N., Gooday G.W.: Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiol.* **144**, 2189–2194 (1998)
- 78 Shrestha A., Sultana R., Chae J.C., Kim K., Lee K.J.: *Bacillus thuringiensis* C25 which is rich in cell wall degrading enzymes efficiently controls lettuce drop caused by *Sclerotinia minor*. *Eur. J. Plant Pathol.* **142**, 577–589 (2015)
- 79 Sierpinska A.: *Bacillus thuringiensis* w ochronie lasu – alternatywa dla insektycydów chemicznych. *Prace Instytutu Badawczego Leśnictwa*. seria A, **2** [895–899], 71–99 (2000)
- 80 Singh B., Arora R., Gosal S.S.: Biological and molecular approaches in pest management. Scientific Publisher (2015)
- 81 Soufiane B., Côté J.C.: Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **95**, 33–45 (2009)
- 82 Sułowicz S., Piotrowska-Seget Z.: Oddziaływanie fungicydów na mikroorganizmy w środowisku glebowym. *Post. Mikrobiol.* **55**, 12–18 (2016)
- 83 Thakore Y.: The biopesticide market for global agricultural use. *Ind. Biotechnol.* **2**, 194–208 (2006)
- 84 Vilas-Bôas G.T., Peruca A.P.S., Arantes O.M.N.: Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* **53**, 673–687 (2007)
- 85 Weerasinghe P., Buja L. M.: Oncosis: An important non-apoptotic mode of cell death. *Exp. Mol. Pathol.* **93**, 302–308 (2012)
- 86 Wei S., Chelliah R., Park B.J., Kim S.H., Forghani F., Cho M.S., Park D.S., Jin Y.G., Oh D.H.: Differentiation of *Bacillus thuringiensis* from *Bacillus cereus* group using a unique marker based on Real-Time PCR. *Front. Microbiol.* **10**, 1–8 (2019)
- 87 Weinzierl R., Henn T., Koehler P.G., Tucker C.L. Microbial insecticides. Cooperative Extension Service, University of Illinois at Urbana-Champaign. **1295** (1989).
- 88 Xu Y., Nagai M., Bagdasarian M., Smith T.W.: Expression of the p20 gene from *Bacillus thuringiensis* H-14 increases Cry11A toxin production and enhances mosquito-larvicidal activity in

- recombinant gram-negative bacteria. *Appl Env. Microbiol.* **67**, 3010–3015 (2001)
- 89 Yi W., Li C., Ye J., Long Y., Qin H.: Correlation between triphenyltin degradation and cellular metabolic responses of *Bacillus thuringiensis*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **122**, 61–68 (2017)
- 90 Yi W., Yang K., Ye J., Long Y., Ke J., Ou H.: Triphenyltin degradation and proteomic response by an engineered *Escherichia coli* expressing cytochrome P450 enzyme. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **137**, 29–34 (2017)
- 91 Zhang X., Candas M., Griko N.B., Rose-Young L., Bulla L.A.: Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death Differ.* **12**, 1407–1416 (2005)
- 92 Zhang X., Candas M., Griko N.B., Taussig R., Bulla L.A.: A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 9897–9902 (2006)
- 93 Zhuang L., Zhou S., Wang Y., Chang M.: Mosquito biolarvicide production by sequential fermentation with dual strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* using sewage sludge. *Bioresour. Technol.* **102**, 1574–1580 (2011)
- 94 Zhuang L., Zhou S., Wang Y., Liu Z., Xu R.: Cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides by solid-state fermentation using wastewater sludge: Effects of heavy metals. *Bioresour. Technol.* **102**, 4820–4826 (2011)
- 95 Zribi Zghal R., Kharrat M., Rebai A., Ben Khedher S., Jallouli W., Elleuch J., Ginibre C., Chandre F., Tounsi S.: Optimization of bio-insecticide production by Tunisian *Bacillus thuringiensis israelensis* and its application in the field. *Biol. Control.* **124**, 46–52 (2018)

PRZYDATNOŚĆ DIAGNOSTYCZNA REAKCJI PCR W ROZPOZNAWANIU BORELIOZY

Weronika Graźlewska, Bartłomiej Ferra, Lucyna Holec-Gąsior*

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

Wpłynęło w maju, zaakceptowano we wrześniu 2020 r.

Streszczenie: Borelioza jest wieloukładową chorobą wywoływaną przez bakterie zaliczane do kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Wektorem przenoszącym infekcję są kleszcze z rodzaju *Ixodes*, które zakażają kolejnych żywicieli krętka podczas spożywania ich krwi. Zróżnicowany przebieg boreliozy uniemożliwia jej rozpoznanie na podstawie objawów klinicznych. W związku z tym diagnostyka choroby z Lyme opiera się głównie na metodach laboratoryjnych, zarówno bezpośrednich (wykrycie obecności DNA lub białek czynnika zakaźnego w materiale biologicznym pobranym od pacjenta) jak i pośrednich (badania serologiczne). Powszechnie rekomendowanym podejściem jest serodiagnostyka, jednakże z powodu czasu wymaganego do wytworzenia przez organizm swoistych przeciwciał nie jest ona przydatna w początkowym okresie infekcji. Metody mikrobiologiczne, będące złotym standardem w wykrywaniu wielu infekcji bakteryjnych, nie są szeroko wykorzystywane w rozpoznaniu boreliozy ze względu na wysokie wymagania wzrostowe *B. burgdorferi* s.l. oraz długi czas oczekiwania na wynik. Potencjalnym rozwiązaniem tego problemu wydaje się być diagnostyka molekularna polegająca na wykrywaniu DNA krętka za pomocą reakcji PCR, która jest wysoko specyficzna oraz czuła. Jednakże efektywność tego podejścia zależy od wielu czynników dlatego konieczne jest opracowanie wystandaryzowanego algorytmu diagnostycznego zapewniającego powtarzalność wyników we wszystkich laboratoriach.

1. Wprowadzenie. 2. Genom *B. burgdorferi* s.l. 3. Diagnostyka boreliozy. 4. Rodzaje reakcji PCR wykorzystywane w diagnostyce boreliozy. 5. Geny wykorzystywane w detekcji DNA *B. burgdorferi* s.l. 6. Identyfikacja genogatków *B. burgdorferi* s.l. 7. Materiał kliniczny. 8. Czynniki wpływające na wydajność reakcji PCR. 9. Zalecenia dotyczące zastosowania diagnostyki PCR. 10. Podsumowanie

DIAGNOSTIC USEFULNESS OF PCR IN THE RECOGNITION OF LYME DISEASE

Abstract: Lyme disease is a multisystem disease caused by bacteria belonging to the group *Borrelia burgdorferi* sensu lato. The vector that carries the infection is a tick of the genus *Ixodes*, that infects subsequent hosts of the spirochete during blood-meal. The varied course of Lyme disease makes it impossible to recognize it on the basis of clinical symptoms. Therefore, the diagnosis of Lyme disease is based mainly on laboratory methods, both direct (detection of the presence of DNA or infectious agent proteins in the biological material collected from the patient) and indirect (mainly serological tests). A commonly recommended approach is serodiagnosis, however, due to the time required for the body to produce specific antibodies, it is not useful in the earliest period of infection. Microbiological diagnostics also can not be used to diagnose Lyme disease in the first weeks of the disease due to its low sensitivity and long waiting time for the result. The solution seems to be molecular diagnostics based on the detection of the spirochete DNA using PCR reaction that is highly specific and sensitive. However, the effectiveness of this approach depends on many factors, therefore it is necessary to develop a standardized protocol ensuring reproducibility of results in all laboratories.

1. Introduction. 2. Genome of *B. burgdorferi* s.l. 3. Diagnosis of Lyme borreliosis. 4. Types of PCR reactions used in the diagnosis of Lyme disease. 5. Target genes used to DNA detection of *B. burgdorferi* s.l. 6. Identification of *B. burgdorferi* s.l. genotypes. 7. Clinical material. 8. The factors affecting the efficiency of PCR. 9. Recommendations for the use of PCR diagnostics. 10. Summary

Słowa kluczowe: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, borelioza, diagnostyka molekularna, PCR

Keywords: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Lyme disease, molecular diagnostics, PCR

1. Wprowadzenie

Borelioza jest chorobą odkleszczową wywoływaną przez bakterie zaliczane do kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.). Obecnie do grupy tej należy około 20 genogatków, z czego tylko dla 5 (*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia burgdor-*

feri sensu stricto (s.s.), *Borrelia spielmanii*) definitywnie potwierdzono patogenność dla człowieka. Wszystkie z wyżej wymienionych genogatków występują na terenie Europy. Natomiast w Ameryce Północnej jedynym wykrywanym czynnikiem wywołującym boreliozę jest *B. burgdorferi* s.s. Jednakże najnowsze doniesienia sugerują, iż również *Borrelia bisettii* i *Borrelia*

* Autor korespondencyjny: Lucyna Holec-Gąsior, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, Polska, e-mail: lucyna.holec-gasior@pg.edu.pl

mayonii mogą wywoływać chorobę z Lyme na terenie USA i Kanady [27, 52].

Borelioza to wieloukładowa choroba o przebiegu fazowym. Na wczesnym etapie choroby (do 8 tygodni od momentu zakażenia) najczęściej jedynym objawem jest rumień wędrujący (EM, *erythema migrans*). Jest to bardzo charakterystyczna zmiana skórna, mająca postać zaczerwienienia z centralnym przejaśnieniem. Według zaleceń Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych (PTEiLCHZ) wystąpienie typowego EM jest wskazaniem do natychmiastowego rozpoczęcia antybiotykoterapii bez wykonywania badań serologicznych [37]. Niestety, EM nie występuje u wszystkich pacjentów, dotyka jedynie ok. 40–90% zakażonych [1, 31, 38, 51]. Zazwyczaj na tym etapie boreliozy nie towarzyszą pacjentom żadne inne dolegliwości lub przybierają one postać objawów grypopodobnych, dlatego też chorzy często nie zdają sobie sprawy, iż potrzebują specjalistycznej pomocy. Prowadzi to do bardzo poważnych konsekwencji, ponieważ w przypadku braku odpowiedniej antybiotykoterapii, choroba może rozwinąć się do fazy rozsianej (od 6 do 26 tygodni od momentu zakażenia). Do najczęstszych objawów fazy rozsianej należą m.in. rumień wędrujący mnogi, objawy ze strony układu nerwowego pod postacią zespołu Bannwartha, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenia korzeni nerwowych i nerwów czaszkowych, zmian zapalnych w obrębie serca oraz ostre nawracające zapalenie stawów. Innym charakterystycznym, lecz bardzo rzadkim objawem jest chłoniak limfocytowy (BL, *borrelial lymphocytoma*), który występuje u 0,3–3% chorych. BL ma postać niebolesnego, czerwonego obrzęku o średnicy kilku centymetrów zlokalizowanego głównie w lub na małżowinie usznej, mosznie i brodawkach sutkowych. Dolegliwości związane z późną fazą boreliozy, pojawiające się 6 miesięcy po zakażeniu, w znacznym stopniu uzależnione są od genogatunku krętka, który wywołał chorobę. Za boreliozowe zapalenie stawów (LA, Lyme arthritis) odpowiada głównie *B. burgdorferi* s.s., natomiast blisko ze sobą spokrewnione genogatunki *B. garinii* i *B. baviariensis* przeważnie prowadzą do postaci neurologicznej choroby (NB, neuroborelioza). *B. afzelii* jest w głównej mierze związana z zanikowym zapaleniem skóry (ACA, *acrodermatitis chronica atrophicans*). Natomiast *B. spielmanii* jest genogatunkiem sporadycznie wywołującym boreliozę u ludzi i jak dotąd izolowano go jedynie ze zmian skórnych [13, 25, 27, 50, 51].

2. Genom *B. burgdorferi* s.l.

Bakterie należące do grupy *B. burgdorferi* s.l. podczas swojego cyklu życiowego przebywają w bardzo różnicowanym środowisku. Prawdopodobnie to ta

różnorodność warunków ich bytowania sprawiła, iż genom *B. burgdorferi* s.l. ma jedną z najbardziej skomplikowanych struktur wśród bakterii [5, 17].

Genom krętków składa się z liniowego chromosomu o długości około 910 kbp oraz 21 plazmidów (9 kolistych i 12 liniowych) o wielkościach wynoszących w przybliżeniu od 5 do 54 kbp. Ponadto charakteryzuje się on dużą zawartością genów paralogicznych, pseudogenów oraz niekodujących fragmentów DNA. Warto zaznaczyć, iż do tej pory nie poznano funkcji wielu genów, ponieważ nie wykazują one znaczącej homologii z wcześniej poznanymi sekwencjami [7, 9, 17].

Liniowy chromosom ma dość dobrze zakonserwowaną sekwencję wśród dotychczas przebadanych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. Posiada on kowalencyjnie zamknięte końce przypominające strukturę spinki do włosów. Jego replikacja ma charakter dwukierunkowy symetryczny, jednakże jej szczegółowy mechanizm nie został dotychczas poznany. Chromosom zawiera 26 pseudogenów oraz 860 genów kodujących 797 białek, odpowiedzialnych głównie za metabolizm podstawowy bakterii. Dokładniejsza analiza sekwencji wykazała, że *B. burgdorferi* s.l. nie posiada genów kodujących enzymy niezbędne do syntezy aminokwasów, nukleotydów, kwasów tłuszczowych i kofaktorów enzymów. Prawdopodobnie zostały one utracone na skutek przystosowania się krętka do pasożytniczego trybu życia [5, 7, 9, 17, 36]. W związku z tym *B. burgdorferi* s.l. posiada wiele genów (co najmniej 52) kodujących różnego typu białka transporotowe oraz wiążące odpowiedzialne za dostarczanie komórce bakterii niezbędnych do przeżycia węglowodanów, peptydów i aminokwasów [45].

Duża liczba plazmidów, niespotykana u innych bakterii sprawia, że *B. burgdorferi* s.l. wykazuje znaczną zmienność w obrębie gatunku oraz w ciągu cyklu życiowego. Liczne plazmidy kodują głównie informację genetyczną wpływającą na wirulencję i patogenność bakterii z rodzaju *Borrelia*. Lipoproteiny, występujące na zewnętrznej błonie bakteryjnej stanowią kluczową grupę białek odpowiedzialnych między innymi za transmisję krętka, jego rozprzestrzenianie oraz przeżycie w organizmie żywiciela. Ich różnorodność oraz ogromne znaczenie w cyklu życiowym *B. burgdorferi* s.l. podkreśla fakt, iż geny kodujące lipoproteiny stanowią nawet 15% informacji genetycznej zlokalizowanej na plazmidach [7, 8, 30, 46]. Nie wszystkie szczepy *B. burgdorferi* s.l. posiadają pełen zestaw plazmidów. Jedynie plazmidy cp26, cp32 i lp54 są niezbędne do przeżycia bakterii w środowisku. Dlatego też obecne są we wszystkich izolatach *B. burgdorferi* s.l. oraz wykazują stosunkowo wysoki stopień zakonserwowania sekwencji nukleotydowej. Reszta z plazmidów jest dość łatwo gubiona, co wiąże się z dużą trudnością w hodowli laboratoryjnej w pełni wirulentnych szczepów *B. burgdorferi* s.l. [5, 8, 27, 36].

3. Diagnostyka boreliozy

Ze względu na zróżnicowany przebieg rozpoznanie boreliozy na podstawie objawów klinicznych jest bardzo trudne. Jedynie w przypadku pojawienia się typowego rumienia wędrującego można postawić prawidłową diagnozę. Niestety, nie pojawia się on u wszystkich chorych a jedynie u 40–90% z nich [1, 31, 38, 51]. Często też jest przez nich niezauważany, dlatego nie zawsze istnieje możliwość zdiagnozowania choroby na tej podstawie. Z tychże względów diagnostyka boreliozy opiera się głównie na metodach laboratoryjnych [1, 27, 38].

Dla większości chorób bakteryjnych diagnostyka oparta o laboratoryjną hodowlę patogenów z materiału biologicznego pobranego od pacjentów jest uznawana za złoty standard, cechujący się 100% specyficznością. Niestety, podejście to nie jest wykorzystywane w rozpoznaniu choroby z Lyme ze względu na bardzo duże wymagania wzrostowe krętków oraz długi czas oczekiwania na wynik [11, 27].

Obecnie w większości przypadków boreliozę rozpoznaje się na podstawie dwustopniowego badania serologicznego, którego pierwszym etapem jest czuły test immunoenzymatyczny (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay). Jeżeli wynik badania jest dodatni lub wątpliwy, jako test drugiego stopnia wykorzystuje się technikę Western blotting (WB). W obu metodach główne źródło antygenów stanowią całkowite lizaty komórkowe *B. burgdorferi* s.l. Niestety, ogromna różnorodność genogatunków w obrębie *B. burgdorferi* s.l. oraz niski stopień zakonserwowania sekwencji aminokwasowej ich białek sprawia, że wykorzystanie lizatów komórkowych jednego genogatunku nie jest wystarczające do prawidłowego rozpoznania boreliozy. Potencjalnym rozwiązaniem wyżej wymienionych problemów może być zastosowanie w serodiagnostyce niniejszej choroby antygenów rekombinantowych otrzymywanych z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej i biologii molekularnej. Jednakże, aby testy immunodiagnostyczne oparte na białkach rekombinantowych miały jak największą czułość i swoistość należy wykorzystać w nich starannie wyselekcjonowane antygeny lub ich fragmenty [19].

Dodatkowo czułość testów serologicznych jest silnie uzależniona od czasu trwania choroby. Ze względu na tzw. okienko serologiczne, czyli przedział czasu od momentu zakażenia do chwili pojawienia się w krążeniu swoistych immunoglobulin, które są wykrywane z wykorzystaniem laboratoryjnych metod diagnostycznych, wyniki badań serologicznych na wczesnym etapie choroby są często fałszywie ujemne. W miarę trwania infekcji odpowiedź immunologiczna stopniowo dojrzewa, w wyniku czego czułość testów serologicznych podczas późniejszych stadiów choroby znacząco wzrasta [1, 27, 31].

Rozwiązaniem problemów, które towarzyszą prawidłowemu, wczesnemu rozpoznaniu boreliozy może być zastosowanie nowoczesnych metod molekularnych polegających na wykrywaniu materiału genetycznego krętka tj. DNA w próbkach klinicznych za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, polymerase chain reaction) [11, 25, 44].

4. Rodzaje reakcji PCR wykorzystywane w diagnostyce boreliozy

Najprostszym podejściem mającym na celu amplifikację określonego fragmentu DNA jest klasyczna reakcja PCR z użyciem dwóch specyficznych starterów. Po jej zakończeniu należy określić wielkość otrzymanego produktu za pomocą elektroforezy agarozowej lub poliakrylamidowej. Istotną wadą tego podejścia jest możliwość pojawienia się niespecyficznych produktów PCR o zbliżonej wielkości do oczekiwanej. Z tego też względu niezbędna jest dodatkowa kontrola specyficzności. Zwykle do tego celu wykorzystuje się wyznakowane sondy, które są komplementarne do fragmentu amplifikowanej sekwencji DNA [11, 44].

Inną często wykorzystywaną metodą jest PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR, real-time PCR), który charakteryzuje się wyższą czułością i specyficznością niż standardowa reakcja PCR. Specyficzność reakcji jest kontrolowana poprzez hybrydyzację produktu reakcji z sondą dodaną do mieszaniny reakcyjnej lub poprzez analizę krzywej topnienia. W wyniku przyłączenia się sondy do powstałych amplikonów następuje wyemitowanie sygnału fluorescencyjnego, dzięki któremu możliwe jest monitorowanie przyrostu produktów w czasie rzeczywistym. Natomiast wyznaczenie temperatury topnienia produktu PCR jest możliwe dzięki znajdującemu się w mieszaninie reakcyjnej barwnikowi (np. SYBR Green), który zwiększa swoją fluorescencję po związaniu się z podwójną nicią DNA. Temperaturę topnienia produktu PCR wyznacza się po zakończeniu reakcji RT-PCR poprzez stopniowe ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej. W momencie osiągnięcia temperatury właściwej dla denaturacji fragmentu DNA (przejście do pojedynczej nici DNA) sygnał fluorescencji gwałtownie spada, co jest widoczne na wykresie (tzw. krzywej topnienia) jako wyraźny pik [11, 44].

Kolejna popularna odmiana metody PCR, która znalazła zastosowanie w diagnostyce boreliozy to tzw. wewnętrzny PCR. Jest to dwuetapowa reakcja PCR z wykorzystaniem dwóch par starterów (zewewnętrznych oraz wewnętrznych), które charakteryzują się dużymi różnicami w temperaturze topnienia. W pierwszym etapie reakcji otrzymuje się dłuższy produkt PCR z udziałem starterów zewnętrznych. Następnie po obniżeniu temperatury przyłączenia starterów w reakcji

Tabela I
Charakterystyka najpopularniejszych celów molekularnych

Cel molekularny	Lokalizacja	Produkt translacji	Źródło
<i>ospA</i>	Plazmid lp54	Lipoproteina niezbędna do przeżycia w organizmie kleszcza	[34, 41]
<i>ospC</i>	Plazmid cp26	Lipoproteina niezbędna do transmisji z kleszcza do ciała ssaka	[14, 15]
<i>p66 (oms66)</i>	Chromosom	Jedno z integralnych białek membranowych budujących poryny	[3, 41]
<i>fla</i>	Chromosom	Białko budujące wici	[54]
<i>rrf-rrl</i>	Chromosom	Wysoco specyficzny region pomiędzy fragmentami kodującymi 23S rRNA i 5S rRNA	[11]
<i>recA</i>	Chromosom	Białko katalizujące rekombinację pojedynczych nici DNA	[11, 44]
<i>rrs</i>	Chromosom	Cząsteczka 16S rRNA wchodząca w skład małej podjednostki rybosomu	[11, 34]
<i>rrl</i>	Chromosom	Cząsteczka 23S rRNA wchodząca w skład dużej podjednostki rybosomu	[11]
<i>polC (dnaE)</i>	Chromosom	Polimeraza DNA III podjednostka α	[44]
<i>rpoC</i>	Chromosom	Polimeraza RNA, podjednostka β	[14, 15]
<i>hbb</i>	Chromosom	Histonopodobne białko wiążące DNA	[40]
<i>rplB</i>	Chromosom	Białko L2 podjednostki 50S rybosomu	[14, 15]
<i>gyrB</i>	Chromosom	Podjednostka B topoiizomerazy DNA	[14, 15]
<i>leuS</i>	Chromosom	Ligaza leucyno-tRNA	[14, 15]

bierze udział druga para oligonukleotydów, komplementarna wobec sekwencji nukleotydowej znajdującej się w obrębie pierwotnego produktu PCR. Udowodniono, iż zastosowanie wewnętrznego PCR może nawet 1000-krotnie zwiększyć czułość testu diagnostycznego w porównaniu ze standardową reakcją PCR [11, 26].

Jedną z nowszych metod jest reakcja PCR połączona ze spektrometrią masową (MS, mass spectrometry) z elektrorozpylaniem (ESI, electrospray ionization) (PCR/ESI-MS). Podstawą PCR/ESI-MS jest zastosowanie starterów zdolnych do amplifikacji fragmentów genów metabolizmu podstawowego szerokiej grupy organizmów. Po zakończeniu reakcji produkty są analizowane za pomocą spektrometrii masowej z wystarczającą dokładnością, aby można było określić w nich zawartość poszczególnych zasad azotowych (A, G, C i T). Następnie uzyskane wyniki są porównywane z bazą danych znanych organizmów, co pozwala na szybką identyfikację organizmu, z którego pochodziło amplifikowane DNA. Amplifikacja fragmentów siedmiu genów *B. burgdorferi* s.l. tj. *ropC*, *rplB*, *leuS*, *flaB*, *ospC*, *hbb*, *gyrB* pozwala nie tylko na detekcję materiału genetycznego krętka, ale również umożliwia identyfikację poszczególnych genogatunków patogenu [14, 15].

5. Geny wykorzystywane w detekcji DNA *B. burgdorferi* s.l.

Kluczowym elementem diagnostyki molekularnej jest wybór odpowiedniego genu docelowego. Aby metoda ta była wysoce czuła i specyficzna cel molekularny musi być stabilny genetycznie oraz wysoce zakonserwowany wśród wszystkich genogatunków *B. burgdorferi* s.l. Dotychczas do celów klinicznych

wykorzystywano zarówno geny zlokalizowane na chromosomie (*hbb*, *fla*, *rrs*, *rrl*, region międzygenowy *rrl-rrf*, *recA*, *bmpA*, *p66*) jak i kodowane na plazmidach (*ospA*, *ospC*, *dbpA*) (Tab. I). Znaczący wpływ na czułość metody ma również liczba kopii danego fragmentu DNA w genomie bakterii. Plazmidy często występują w komórkach bakterii w kilku kopiach, z tego powodu wydaje się, iż wybór celu molekularnego zlokalizowanego na jednym z nich może zwiększać czułość testu diagnostycznego [1, 11, 39, 44]. Wyniki potwierdzające tę tezę przedstawili Nocton i wsp. (1994) udowadniając, iż PCR ukierunkowany na kodowany plazmidowo gen *ospA* charakteryzował się wyższą czułością w detekcji DNA *B. burgdorferi* s.l. w płynie stawowym, niż ten wykrywający zlokalizowany na chromosomie gen *rrs* [34]. Jednakże, w 1997 roku Priem i wsp. badając próby moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego i płynu maziowego pobrane od 57 pacjentów z boreliozą w kierunku obecności DNA *B. burgdorferi* s.l. otrzymali odmienne rezultaty. Badania te wykazały, iż reakcja PCR mająca na celu amplifikację sekwencji DNA zlokalizowanej na chromosomie (gen *p66*) cechowała się wyższą czułością w wykrywaniu DNA patogenu, niż oparta o kodowany plazmidowo gen *ospA* [41]. Przyczyną tej rozbieżności wyników wydaje się być wysoka heterogenność genu *ospA* wśród przedstawicieli *B. burgdorferi* s.l. [53]. Nocton i wsp. (1994) w swych badaniach wykorzystywali próbki kliniczne pobrane od pacjentów zamieszkujących USA, gdzie jedynym genogatunkiem wywołującym boreliozę jest *B. burgdorferi* s.s., prawdopodobnie więc sekwencja nukleotydowa genu *ospA* wśród poszczególnych izolatów była stosunkowo mało zróżnicowana. Natomiast Priem i wsp. (1997) badaniu poddali próby pochodzące od pacjentów zamieszkujących teren Niemiec, gdzie za wywołanie boreliozy

może być odpowiedzialnych co najmniej 5 genogatunków. Wydaje się zatem, iż zróżnicowanie genetyczne przedstawicieli *B. burgdorferi* s.l. w próbkach wykorzystywanych w powyżej przedstawionych badaniach było znacznie większe, a co za tym idzie startery wykorzystane w reakcji PCR nie rozpoznawały wszystkich wariantów sekwencji genu *ospA*, tym samym obniżając jej czułość.

Ogromna różnorodność genetyczna bakterii z grupy *B. burgdorferi* s.l. oraz duża liczba plazmidów utrudnia wybór celu molekularnego zlokalizowanego na plazmidzie, który umożliwiłby rozpoznanie boreliozy bez względu na to jakim genogatunkiem nastąpiło zakażenie. Z tego względu to właśnie geny umiejscowione na chromosomie, o stosunkowo wysoko zakonserwowanej sekwencji nukleotydowej, wydają się bardziej odpowiednie jako cele molekularne w diagnostyce boreliozy. Dzięki dostępnym w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information) sekwencjom nukleotydowym różnych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. możliwe jest ich porównanie w celu zidentyfikowania zakonserwowanych fragmentów. W wyniku takiej analizy naukowcom udało się zlokalizować region DNA (umiejscowiony na chromosomie) kodujący fragment rdzenia białka rybosomalnego S21, który powtarza się u 31 genogatunków *B. burgdorferi* s.l. [24].

6. Identyfikacja genogatunków *B. burgdorferi* s.l.

Różni przedstawiciele grupy *B. burgdorferi* s.l. powodują inny przebieg późnej boreliozy oraz mogą odmiennie reagować na używane w leczeniu choroby z Lyme antybiotyki. Z tych powodów identyfikacja poszczególnych genogatunków pozwala na lepsze poznanie epidemiologii oraz mechanizmów wirulencji *B. burgdorferi* s.l. [32, 49].

Możliwość opracowania szybkiej i taniej metody pozwalającej na rozróżnienie poszczególnych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. daje diagnostyka molekularna. Niestety, wybór odpowiedniej sekwencji, umożliwiającej łatwą identyfikację genogatunkową metodami molekularnymi jest bardzo trudny. Jednakże udowodniono, iż kilka specyficznych fragmentów genomu *B. burgdorferi* s.l. posiada potencjał różnicujący umożliwiający identyfikację genogatunków na podstawie analizy produktów reakcji PCR. Procedury te obejmują sekwencjonowanie, porównywanie wielkości produktów amplifikacji, wyznaczenie temperatury topnienia, analizę restrykcyjną oraz hybrydyzację ze specyficznymi sondami.

Jednym z fragmentów genomu pozwalającym na identyfikację poszczególnych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. jest region *rrf-rrl* umiejscowiony między genami kodującymi podjednostki 23S rRNA i 5S rRNA.

Wykazano, iż przy użyciu wewnętrznego PCR skierowanego na ten niekodujący fragment DNA, można łatwo odróżnić od siebie (na podstawie wielkości produktów PCR) *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* oraz *B. garinii*, które są najczęstszą przyczyną boreliozy w Europie [54]. Na szybką identyfikację wyżej wymienionych genogatunków pozwala również analiza krzywych topnienia produktów PCR powstałych na drodze amplifikacji wysoce zróżnicowanego genu *ospA* [42].

Bardzo wysoki potencjał różnicujący posiada gen *hbb*, kodujący jedno z białek histonopodobnych. W badaniach udowodniono, iż analiza krzywej topnienia amplifikowanego fragmentu genu *hbb* pozwala rozróżnić 5 genogatunków *B. burgdorferi* s.l., tj. *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae* [16, 40].

Popularną, lecz stosunkowo czasochłonną metodą umożliwiającą identyfikację poszczególnych genogatunków jest PCR połączony z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, restriction fragments length polymorphism). RFLP polega na trawieniu produktu PCR odpowiednim enzymem restrykcyjnym, co prowadzi do powstania fragmentów DNA o różnych długościach, charakterystycznych dla każdego genogatunku. Unikalny wzór prążków wizualizuje się za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym. Wykazano, iż analiza PCR-RFLP wykorzystująca fragmenty genów *fla* (trawienie enzymem restrykcyjnym HpyF3I) i *rrs* (trawienie enzymem restrykcyjnym FspBI) pozwala na identyfikację sześciu genogatunków z kompleksu *B. burgdorferi* s.l., tj. *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* i *Borrelia bissetti* [54].

Metodą mającą bardzo wysoki potencjał dyskryminacyjny jest MLST (multilocus sequence typing). Polega ona na amplifikacji fragmentów kilku genów metabolizmu podstawowego, a następnie sekwencjonowaniu otrzymanych produktów PCR. Porównanie sekwencji ośmiu genów *B. burgdorferi* s.l. (*clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB*, *uvrA*) pozwala na rozróżnienie nawet bardzo blisko spokrewnionych ze sobą genogatunków, np. *B. garinii* i *B. bavariensis*. Ze względu na to, iż MLST jest metodą wyjątkowo czułą, ale zarazem kosztowną, jest ona wykorzystywana przede wszystkim w badaniach epidemiologicznych oraz w analizie filogenetycznej [29, 44].

7. Materiał kliniczny

Rodzaj badanego materiału klinicznego uzależniony jest od objawów choroby oraz czasu ich trwania. W przypadku występowania EM lub ACA pobiera się bioptaty zajętej skóry, natomiast przy podejrzeniu NB jest to płyn mózgowo-rdzeniowy (CSF, cerebrospinal

Tabela II
Czułość metod molekularnych w zależności od badanej tkanki

Materiał kliniczny	Cele molekularne	Zakres czułości [%]	Zakres specyficzności [%]
Wycinki skóry – EM	<i>p66, rrl, fla, rrf-rrl, ospA, recA, rrs, ospC</i>	30–89	98–100
Wycinki skóry – ACA	<i>p66, ospA, rrl, rrf-rrl, fla,</i>	20–100	100
Płyn stawowy	<i>rrs-rrl, ospC, ospA, p66, fla</i>	23–100	100
Płyn mózgowo-rdzeniowy	<i>ospA, fla, rrf-rrl, p66</i>	5–100	99–100
Krew, surowica, osocze	<i>polC, ospA, rrs, rrf-rrl, rpoC, rplB, leuS, flaB, gyrB, ospC</i>	0–100	95–100
Mocz	<i>fla, ospA, rrl, p66, rrs</i>	7–92	77–100

Na podstawie: [11, 14, 15, 27, 34, 41, 44].

fluid), gdy zaś występują objawy stawowe do badań pobiera się płyn stawowy. Krew jest wykorzystywana jedynie w przypadku podejrzenia wczesnej boreliozy, natomiast stosowanie moczu jako materiału klinicznego nie jest zalecane ze względu na małą powtarzalność wyników. Każdy z tych materiałów charakteryzuje się odmienną przydatnością w diagnostyce boreliozy (Tab. II), na co wpływ ma obecność inhibitorów w danym rodzaju próbki klinicznej oraz tropizm tkankowy krętków [27, 44, 52].

Według wielu fachowców najlepszym materiałem do badań molekularnych w kierunku boreliozy są wycinki skóry z obszaru zajętego przez EM, czułość takich testów osiąga nawet 90%, natomiast swoistość waha się w zakresie 98–100%. Badania mające na celu porównanie skuteczności metod diagnostycznych w przypadku pacjentów z EM wykazały, iż najwyższą czułością charakteryzował się RT-PCR (80%). Na kolejnym miejscu znalazła się dwuetapowa diagnostyka serologiczna (66%), następnie wewnętrzny PCR (64%) oraz metoda biologiczna oparta o hodowlę krętków z próbek klinicznych (51%). Test oparty na RT-PCR wykazał dużo wyższą czułość niż badanie serologiczne, co pokazuje, o ile większą użyteczność mogą mieć metody molekularne w początkowych fazach infekcji [35, 44]. Wysoką czułość uzyskuje się również w przypadku badania biopłatów skóry pobranych ze zmian obecnych w przebiegu ACA, dodatkowo podejście to również charakteryzuje się bardzo wysoką specyficznością [11, 52].

Bardzo wysoką czułość i specyficzność testów diagnostycznych opartych na reakcji PCR otrzymuje się w przypadku badania płynu stawowego – w niektórych pracach naukowych obie te wartości wynoszą nawet 100%. Jednak w przypadku podejrzenia LA materiałem wyjściowym może być również błona maziowa. Takie podejście może prowadzić do znacznego zwiększenia czułości testu (nawet z 25% do 90%) [21, 44]. Dodatkowo udowodniono, iż po antybiotykoterapii DNA krętka dłużej utrzymuje się w tkance maziowej niż w płynie stawowym [11, 27]. Należy jednak podkreślić, iż metodyka opisana w powyższych publika-

cjach nie jest jeszcze powszechnie stosowana, dlatego te optymistyczne doniesienia o tak wysokiej czułości tego typów testów powinny być jeszcze zweryfikowane przez inne zespoły badawcze. Dodatkowo należy pamiętać, iż LA (podobnie jak ACA) jest objawem późnej boreliozy, więc u pacjentów na tym etapie choroby prawie zawsze w krążeniu występuje wysokie miano przeciwciał klasy IgG [11, 52].

Diagnostyka molekularna neuroboreliozy opiera się na analizie płynu mózgowo-rdzeniowego. Podejście to jednak ze względu na małą liczbę krętków w CSF, wysokie powinowactwo bakterii do otoczki mielinowej oraz możliwość degradacji materiału genetycznego, ma stosunkowo niską czułość (22,5%). Największe prawdopodobieństwo wykrycia DNA krętków w CSF występuje we wczesnej neuroboreliozie [18, 33, 44].

Próbki krwi, pomimo łatwości ich pozyskania, nie stanowią dobrego materiału klinicznego w diagnostyce molekularnej boreliozy. Spowodowane jest to niską liczbą krętków w krążeniu na co ma wpływ silny tropizm tkankowy patogenów (stawy, serce, tkanka nerwowa). Testy PCR z krwi są przydatne jedynie we wczesnej fazie infekcji, podczas rozprzestrzeniania się *B. burgdorferi* s.l. z miejsca wkłucia kleszcza przez układ krwionośny do innych narządów. Dodatkowo we krwi obecne są liczne inhibitory reakcji PCR (takie jak np. heparyna, hemoglobina, DNA gospodarza), co może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie negatywnych [1, 28, 47].

Mocz jest jednym z najłatwiej dostępnych materiałów klinicznych, dlatego wielu naukowców badało jego przydatność do diagnostyki molekularnej boreliozy. Wstępne doniesienia literaturowe były bardzo obiecujące. Bergmann i wsp. (2002) opracowali reakcję PCR wykrywającą DNA *B. burgdorferi* s.l. w moczu z czułością na poziomie 85% [2]. Niestety, po przeprowadzeniu badań na większej liczbie prób pacjentów z boreliozą okazało się, iż czułość, a w szczególności specyficzność testów molekularnych wykorzystujących ten materiał kliniczny, nie jest zadowalająca. Obecnie większość europejskich i amerykańskich standardów

odrządza stosowanie moczu w metodach opartych na PCR głównie z powodu często pojawiających się niespecyficznych produktów i małej powtarzalności wyników [1, 12, 23, 27, 43].

8. Czynniki wpływające na wydajność reakcji PCR

Czas pobrania próbki

Dla uzyskania wiarygodnego wyniku testu opartego o reakcję PCR ważne jest, by próbkę kliniczną pobrać od pacjenta przed rozpoczęciem leczenia. Wykazano bowiem, iż 4-tygodniowa antybiotykoterapia znacząco obniża wykrywalność DNA krętków. Natomiast przyjmowanie przez pacjenta antybiotyków przez kilka dni nie wpływa znacząco na czułość metod molekularnych [23].

Inhibitory

Jednym z najczęstszych problemów w diagnostyce molekularnej jest obecność inhibitorów w próbkach biologicznych. Związki hamujące reakcję PCR są powszechnie obecne we krwi (np. hemoglobina), w płynie mózgowo-rdzeniowym i fragmentach skóry (np. melanina). Dodatkowo wiele odczynników laboratoryjnych używanych przy pobieraniu i przechowywaniu próbek również jest silnymi inhibitorami amplifikacji (np. heparyna czy formalina). Najprostszą metodą pozwalającą na ograniczenie niepożądanego wpływu tych związków jest zmniejszenie ich stężenia poprzez rozcieńczenie wyizolowanego DNA. Aby upewnić się, że żadne związki zawarte w próbce nie hamują reakcji PCR, przyczyniając się do otrzymania wyniku fałszywie ujemnego, konieczne jest wykonanie wewnętrznej kontroli dodatniej [12, 48].

Innym czynnikiem wpływającym na wydajność reakcji PCR przy wykrywaniu kwasów nukleinowych krętka w materiale biologicznym może być zbyt duża zawartość ludzkiego DNA w stosunku do materiału genetycznego patogenu. Problem ten można jednak łatwo rozwiązać wykorzystując jeden z wielu komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji kwasów nukleinowych pozwalających na selektywne usunięcie ludzkiego DNA, takich jak np.: MolYsis Basic5 kit (Molzym, Bremen, Germany), NEBNext Microbiome DNA Enrichment kit (New England Biolab's, USA) [44].

Zanieczyszczenia

Bardzo często uzyskuje się wyniki fałszywie pozytywne, które prowadzą do wdrożenia nieodpowiedniego leczenia pacjenta. Źródłem kontaminacji może być DNA innych patogenów spokrewnionych z *B. burgdorferi* s.l. (naturalna flora bakteryjna pacjentów), ludzkie DNA (brak specyficznych sekwencji starterów) oraz amplikony z wcześniejszych reakcji PCR, które dostały

się do przestrzeni laboratoryjnej (blaty, pipety). Aby ograniczyć liczbę wyników fałszywie pozytywnych należy wykonywać kontrole ujemne oraz bezwzględnie przestrzegać wszelkich procedur mających na celu zminimalizowanie ryzyka kontaminacji próbek [47].

9. Zalecenia dotyczące zastosowania diagnostyki PCR

Diagnostyka molekularna ma znaczną przewagę nad standardowo stosowanymi metodami serologicznymi w początkowych fazach infekcji (zlokalizowanej i rozsianej), gdy organizm nie zdążył jeszcze wytworzyć swoistych przeciwciał. Dodatkowo, pomimo znacznych zalet reakcji PCR, również w przypadku diagnostyki molekularnej możliwe jest otrzymanie wyników fałszywie pozytywnych bądź fałszywie negatywnych. Spowodowane jest to faktem, iż na skuteczność techniki PCR wpływa wiele czynników, które zostały omówione powyżej (m.in.: rodzaj reakcji PCR, cel molekularny, materiał kliniczny, czas pobrania próbki – przed lub po rozpoczęciu leczenia, metody izolacji i oczyszczania DNA, obecności inhibitorów i/lub zanieczyszczeń) [27, 44]. Prawdopodobnie te właśnie problemy z powtarzalnością wyników przyczyniają się do tego, iż metody diagnostyczne oparte o metodę PCR nie są rekomendowane przez największe agencje zajmujące się ochroną zdrowia [6, 20, 33, 37]. Jednakże, mimo braku standaryzacji, coraz więcej placówek ochrony zdrowia dostrzega zalety metod molekularnych w rozpoznaniu boreliozy, dopuszczając to podejście diagnostyczne w niektórych przypadkach (Tab. III).

Zalecenia te dotyczą m.in. występowania nietypowych postaci rumienia wędrującego, które nie pozwalają na jednoznaczną diagnozę. Możliwe są przypadki pojawienia się krwotocznego EM (szczególnie na kończynach dolnych) przybierającego ciemnofioletowy kolor, inne doniesienia mówią także o wyjątkowo „bladych” postaciach EM, w których wyraźnie widoczne są jedynie ich obwódki. Dodatkowo w miejscu ugryzienia kleszcza, w odpowiedzi na alergeny zawarte w ślinie pajęczaka, może pojawić się odczyn zapalny przypominający swoją formą EM. W takich przypadkach diagnostyka molekularna może mieć rozstrzygające znaczenie w rozpoznaniu boreliozy [20, 25, 37].

Borrelial lymphocytoma jest rzadką postacią zakażenia *B. burgdorferi* s.l. W przypadku jego wystąpienia zalecane jest badanie serologiczne, jednak ze względu, iż BL pojawia się we wczesnej lub wczesnej rozsianej fazie boreliozy uzyskane wyniki mogą być niejednoznaczne. Zauważono również, iż BL może przybierać nietypową postać. W wyżej wymienionych przypadkach rekomenduje się wykonanie badań mających na celu bezpośrednią identyfikację krętków [10, 20, 37].

Podobne rekomendacje dotyczą pacjentów z zaniowym zapaleniem skóry. ACA jest postacią późnej

Tabela III
Rekomendacje towarzystw naukowych dotyczące wykorzystywania reakcji PCR
w rozpoznaniu boreliozy

Objaw	Warunek	Źródło
EM	Nietypowa postać (ciemnofioletowy kolor, brak centralnego przejaśnienia, średnica mniejsza niż 5 cm)	[20, 37]
NB	Wczesny etap choroby (< 6 tygodni)	[6, 33, 37]
BL	Nietypowa postać, niejednoznaczne wyniki badań serologicznych	[20, 37]
ACA	Nietypowa postać	[20, 37]
LA	Nieustąpienie objawów mimo antybiotykoterapii	[6, 37]

EM - rumień wędrujący; NB - neuroborelioza; BL - chłoniak limfocytowy;
ACA - zanikowe zapalenie skóry; LA - boreliozowe zapalenie stawów

boreliozy, dlatego też w większości przypadków rozpoznanie choroby opiera się na testach serologicznych. Jednak, w niektórych okolicznościach (nietypowy wygląd zmian skórnych, niski wzrost miana przeciwciał) zaleca się wykonanie dodatkowych testów diagnostycznych obejmujących badanie histopatologiczne oraz metodę PCR [20, 37].

W przypadku neuroboreliozy zgodnie z wytycznymi Europejskiej Federacji Towarzystw Neurologicznych wykrywanie *B. burgdorferi* s.l. w CSF ma uzasadnienie kliniczne jedynie w pierwszych 6 tygodniach NB, gdy swoiste przeciwciała nie są jeszcze obecne w surowicy pacjentów [33, 37].

Wykorzystanie metod molekularnych jest również dopuszczane w przypadkach, gdy pacjenci z podejrzeniem LA, mimo trwającej antybiotykoterapii, nadal odczuwają dolegliwości stawowe. Świadczyć to może o tym, iż rozwinęło się u nich antybiotykoooporne zapalenie stawów (AZS). W tym przypadku, w celu postawienia prawidłowej diagnozy, powinno się przeprowadzić detekcję DNA *B. burgdorferi* s.l. w płynie stawowym. Brak DNA krętka w próbce świadczy o AZS, co wiąże się z koniecznością wdrożenia innej metody leczenia [37].

10. Podsumowanie

Mimo, iż złotym standardem w rozpoznaniu boreliozy jest diagnostyka serologiczna, nie pozostaje ona wolna od wielu ograniczeń. Jednym z głównych problemów jest tzw. okienko serologiczne (trwające ok. 2–3 tygodnie), w czasie którego serodiagnostyka jest niewskazana.

Należy pamiętać, że najlepsze wyniki w leczeniu boreliozy otrzymuje się, gdy odpowiednia antybiotykoterapia zostanie wdrożona najszybciej jak to możliwe. Opóźnienie w diagnozie, związane z okienkiem serologicznym, może prowadzić do szerokiego zakresu problemów zdrowotnych dla pacjenta, takich jak zaburzenia neurologiczne, zapalenie mięśnia sercowego i zapalenie stawów. Z tego względu konieczne jest opracowanie nowych metod diagnostycznych umożliwiających roz-

poznanie boreliozy już w początkowych etapach infekcji. Innym problemem są pacjenci cierpiący z powodu dysfunkcji układu immunologicznego, u których produkcja swoistych przeciwciał może być zaburzona. Dodatkowo ze względu na wysokie wymagania wzrostowe *B. burgdorferi* s.l., długi czas oczekiwania na wynik oraz niską skuteczność, diagnostyka mikrobiologiczna nie może być alternatywą dla serodiagnostyki.

W tych przypadkach rozwiązaniem powyższych problemów wydają się być metody molekularne, charakteryzujące się prostotą wykonania oraz krótkim czasem oczekiwania na wynik. Umożliwiają one wykrycie DNA *B. burgdorferi* s.l. w organizmie człowieka jeszcze przed pojawieniem się we krwi swoistych przeciwciał. Pozwala to na bardzo wczesne wdrożenie leczenia, co uniemożliwia patogenom rozprzestrzenienie się w organizmie pacjenta.

O popularności idei wykorzystania reakcji PCR w diagnostyce boreliozy, świadczy duża liczba publikacji naukowych opisujących jej zastosowanie w detekcji DNA *B. burgdorferi* s.l. Szybki rozwój metod biologii molekularnej zaowocował opracowaniem nowych odmian reakcji PCR, które charakteryzują się wyższą czułością oraz pozwalają na dokładniejsze kontrolowanie specyficzności reakcji. Zalety te sprawiają, iż obecnie w większości doniesień naukowych wykorzystywane są nowocześniejsze metody amplifikacji DNA *B. burgdorferi* s.l., takie jak RT-PCR oraz wewnętrzny PCR. Dodatkowo, metody szybkiego i taniego sekwencjonowania DNA umożliwiły dokładne poznanie genomu wielu bakterii z rodzaju *Borrelia*. Dzięki temu można wytypować wysoko zakonserwowane fragmenty, pozwalające na detekcję wszystkich genogatunków *B. burgdorferi* s.l. lub takie, których różnice w sekwencji umożliwiają szybką ich identyfikację. Obecnie jako cele molekularne wykorzystywane są zarówno geny umiejscowione na chromosomie (wyższy stopień zakonserwowania), jak i te zlokalizowane na plazmidach (większa różnorodność).

Dotychczasowe doniesienia literaturowe udowadniają, iż diagnostyka molekularna charakteryzuje się

wysoką specyficznością (z wyjątkiem prób moczu) oraz stosunkowo dużą czułością. Niestety, pomimo tych niezaprzeczalnych zalet, testy diagnostyczne oparte na reakcji PCR muszą sprostać wielu wyzwaniom. Największym problemem jest brak wystandaryzowanych protokołów jasno opisujących poszczególne etapy testów. Testy molekularne opisane w pracach naukowych różnią się od siebie prawie w każdym aspekcie. Wykorzystują różne typy reakcji PCR (klasyczny PCR, Real-Time PCR, wewnętrzny PCR, PCR/ESI-MS), odmienne cele molekularne (*hbb*, *fla*, *rrs*, *rfl*, region międzygenowy *rfl-rrf*, *recA*, *bmpA*, *p66*, *ospA*, *ospC*, *dbpA*) oraz zróżnicowane rodzaje próbek klinicznych (wycinek skóry, płyn stawowy, CSF, krew, mocz). Brak standaryzacji metod molekularnych dotyczy również procedur mających miejsce bezpośrednio przed właściwym testem diagnostycznym tj. objętość pobieranej próbki, sposób jej przechowywania oraz metody izolacji materiału genetycznego. Mimo tego, iż wykazano wpływ przebiegu wyżej wymienionych czynności na czułość reakcji PCR [2, 3, 11], w wielu przypadkach autorzy publikacji nie zamieszczali w pracach ich opisu. Z powodu wspomnianych różnic i niedopowiedzeń uzyskane przez różne zespoły badawcze wyniki są często rozbieżne i niejednoznaczne. Konieczne wydaje się zatem przeprowadzenie wiarygodnych i rzetelnych badań porównawczych mających na celu opracowanie najbardziej optymalnego testu diagnostycznego opartego o reakcję PCR.

Prawdopodobnie właśnie z wyżej wymienionych powodów diagnostyka molekularna boreliozy stanowi obecnie jedynie wsparcie dla testów serologicznych. Jednakże, coraz więcej agencji ochrony zdrowia zaczyna dostrzegać jej potencjał i wprowadza w swoich wytycznych możliwość zastosowania testów diagnostycznych polegających na bezpośredniej detekcji DNA *B. burgdorferi* s.l. Jak na razie, rekomendacje te obejmują rzadkie przypadki nietypowych objawów EM, ACA, BL oraz wczesnych faz infekcji, jednakże jeszcze kilka, kilkanaście lat temu metody PCR nie były w ogóle uwzględnione w klinicznej diagnostyce boreliozy. Kolejną przeszkodą w powszechnym stosowaniu metod molekularnych w rozpoznaniu choroby z Lyme jest fakt, iż dostępne na rynku testy diagnostyczne, głównie oparte o reakcję RT-PCR (np. ViPrimePLUS Lyme disease qPCR Kit (Vivantis Technologies, Malezja), Lyme Disease genesig Advanced Kit (Primerdesign™, Wielka Brytania), Lyme Disease Real-time PCR Kit (NZYtech, Portugalia) w większości przypadków nie posiadają odpowiednich certyfikatów pozwalających na ich wykorzystanie w rutynowej diagnostyce pacjentów.

Na świecie nadal prowadzone są badania mające na celu opracowanie skutecznego testu do diagnostyki boreliozy opartego o reakcję PCR. Część z nich dotyczy

lepszego poznania genomu *B. burgdorferi* s.l. i ich zadaniem jest wyodrębnienie sekwencji DNA mogących być nowymi celami molekularnymi. Inne natomiast skupione są na poszukiwaniu nowych schematów diagnostycznych. Szczególnie interesująca wydaje się koncepcja łącząca reakcję PCR ze spektrometrią masową (PCR/ESI-MS), która pozwala na szybką i dokładną identyfikację patogenów. Metoda ta wykazała bardzo dużą przydatność w precyzyjnej identyfikacji szerokiej gamy patogenów we krwi, tkankach pacjentów oraz organizmach wektorowych [4, 14, 15, 22, 55]. Dlatego wydaje się, iż może stanowić ważny filar w diagnostyce boreliozy, szczególnie ze względu na swoją czułość i wysoki potencjał różnicujący.

Obecnie, mimo wielu obiecujących doniesień naukowych metody molekularne nie są wystarczająco wystandaryzowane by mogły zastąpić rutynowo stosowaną serodiagnostykę. Jednakże, szybki rozwój biologii molekularnej i intensywne badania mające na celu dokładne poznanie genomu *B. burgdorferi* s.l. dają nadzieję, iż w przyszłości diagnostyka molekularna będzie powszechnie stosowana w rozpoznaniu boreliozy.

Piśmiennictwo

1. Aguero-Rosenfeld M., Wang G., Scwartz I., Wormser G.: Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 484–509 (2005)
2. Bergmann A.R., Schmidt B.L., Derler A.M., Aberer E.: Importance of sample preparation for molecular diagnosis of Lyme borreliosis from urine. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4581–4584 (2002)
3. Brettschneider S., Bruckbauer H., Klugbauer N., Hofmann H.: Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2658–2665 (1998)
4. Brinkman C.L., Vergidis P., Uhl J.R., Pritt B.S., Cockerill F.R., Steckelberg J.M., Baddour L.M., Maleszewski J.J., Edwards W.D., Sampath R., Patel R.: PCR-electrospray ionization mass spectrometry for direct detection of pathogens and antimicrobial resistance from heart valves in patients with infective endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 2040–2046 (2013)
5. Brisson D., Drecktrah D., Eggers C.H., Samuels D.S.: Genetics of *Borrelia burgdorferi*. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 515–536 (2012)
6. Canadian Public Health Laboratory Network. The Laboratory Diagnosis of Lyme Borreliosis: Guidelines from the Canadian Public Health Laboratory Network. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **18**, 145–148 (2007)
7. Casjens S., Fraser C.M. i wsp.: A bacterial genome in flux: The twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **35**, 490–516 (2000)
8. Casjens S.R., Gilcrease E.B., Vujadinovic M., Mongodin E.F., Luft B.J., Schutzer S.E., Fraser C.M., Qiu W.G.: Plasmid diversity and phylogenetic consistency in the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *BMC Genomics*, **18**, 1–18 (2017)
9. Casjens S.R., Khouri H.M. i wsp.: Genome stability of Lyme disease spirochetes: comparative genomics of *Borrelia burgdorferi* plasmids. *Plos One*, **7**, e33280 (2012)

10. Colli C., Leinweber B., Müllegger R., Chott A., Kerl H., Ceroni L.: *Borrelia burgdorferi*-associated lymphocytoma cutis: clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular study of 106 cases. *J. Cutan. Pathol.* **31**, 232–240 (2004)
11. van Dam A.P.: Molecular diagnosis of *Borrelia* bacteria for the diagnosis of Lyme disease. *Expert Opin. Med. Diagn.* **5**, 135–149 (2011)
12. Dunaj J., Moniuszko A., Zajkowska J., Panacewicz S.: The role of PCR in diagnostics of Lyme borreliosis. *Przegl. Epidemiol.* **67**, 35–39 (2013)
13. Eldin C., Raffetin A., Bouiller K., Hansmann Y., Roblot F., Raoult D., Parola P.: Review of European and American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Med. Mal. Infect.* **49**, 121–132 (2019)
14. Eshoo M.W., Crowder C.C., Rebman A.W., Rounds M.A., Matthews H.E., Picuri J.M., Soloski M.J., Ecker D.J., Schutzer S.E., Aucott J.N.: Direct molecular detection and genotyping of *Borrelia burgdorferi* from whole blood of patients with early Lyme disease. *Plos One*, **7**, 3–8 (2012)
15. Eshoo M.W., Schutzer S.E., Crowder C.D., Carolan H.E., Ecker D.J.: Achieving molecular diagnostics for Lyme disease. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **13**, 875–883 (2013)
16. Ferdin J., Cerar T., Strle F., Ružič-Sabljic E.: Evaluation of real-time PCR targeting *hbb* gene for *Borrelia* species identification. *J. Microbiol. Methods.* **82**, 115–119 (2010)
17. Fraser C.M., Venter J.C. i wsp.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, 580–586 (1997)
18. Gąsiorowski J., Witecka-Knysz E., Knysz B., Gerber H., Gładysz A.: Diagnostyka boreliozy. *Med. Pr.* **58**, 439–447 (2007)
19. Grążlewska W., Holec-Gąsior L.: Antygeny rekombinantowe w diagnostyce serologicznej boreliozy. *Postępy Mikrobiol.* **58**, 399–413 (2019)
20. Hofmann H., Fingerle V., Hunfeld K.P., Huppertz H.I., Krause A., Rauer S., Ruf B., Consensus group C.: Cutaneous Lyme borreliosis: Guideline of the German Dermatology Society. *Ger. Med. Sci.* **15**, 1–31 (2017)
21. Jaulhac B., Chary-Valckenaere I., Sibia J., Javier R.M., Piémont Y., Kuntz J.L., Monteil H., Pourel J.: Detection of *Borrelia burgdorferi* by DNA amplification in synovial tissue samples from patients with Lyme arthritis. *Arthritis Rheum.* **39**, 736–745 (1996)
22. Kaleta E.J., Clark A.E., Johnson D.R., Gamage D.C., Wysocki V.H., Cherkaoui A., Schrenzel J., Wolk D.M.: Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 345–353 (2011)
23. Kondrusik M., Grygorczuk S., Skotarczak B., Wodecka B., Rymaszewska A., Pancewicz S., Zajkowska J., Świerżbińska R., Hermanowska-Szpakowicz T.: Molecular and serological diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection among patients with diagnosed erythema migrans. *Ann. Agric. Environ. Med.* **14**, 209–213 (2007)
24. Kotłowski R., Holec-Gąsior L.: Identification of evolutionary conserved DNA sequence and corresponding S21 ribosomal protein region for diagnostic purposes of all *Borrelia spirochetes*. *Acta Biochim. Pol.* **66**, 119–122 (2019)
25. Krzyczmanik D., Sińczuk-Walczak H., Wittczak T., Cyran A., Pałczyński C., Walusiak-Skorupa J.: Borreliosis in occupational medicine practice. *Med. Pr.* **63**, 483–492 (2012)
26. Lee S.H., Vigliotti V.S., Vigliotti J.S., Jones W., Pappu S.: Increased sensitivity and specificity of *Borrelia burgdorferi* 16S ribosomal DNA detection. *Am. J. Clin. Pathol.* **133**, 569–576 (2010)
27. Lohr B., Fingerle V., Norris D.E., Hunfeld K.P.: Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: Current state of the art and future perspectives. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **55**, 1–27 (2018)
28. Maraspin V., Ogrinc K., Ružič-Sabljic E., Lotrič-Furlan S., Strle F.: Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from blood of adult patients with borreliar lymphocytoma, Lyme neuroborreliosis, Lyme arthritis and acrodermatitis chronica atrophicans. *Infection*, **39**, 35–40 (2011)
29. Margos G., Kurtenbach K. i wsp.: MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 8730–8735 (2008)
30. Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H., Fish D.: Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 1545–1563 (2011)
31. Matyjasek A., Zdrojewski Z.: Borelioza — najnowsze rekomendacje w diagnostyce i leczeniu. *Forum Reumatol.* **2**, 58–64 (2016)
32. Mursic P.: Kill Kinetics of *Borrelia burgdorferi* and bacterial findings in relation to the treatment of Lyme borreliosis. *Infection*, **27**, 9–16 (1996)
33. Mygland Å., Ljøstad U., Fingerle V., Rupprecht T., Schmuthard E., Steiner I.: EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur. J. Neurol.* **17**, 8–16 (2010)
34. Nocton J.J., Dressler F., Rutledge B.J., Rys P.N., Persing D.H., Steere A.C.: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *New English J. Med.* **323**, 1120–1123 (1994)
35. Nowakowski J., Schwartz I., Liveris D., Wang G., Aguerro-Rosenfeld M.E., Girao G., McKenna D., Nadelman R.B., Cavaliere L.F., Wormser G.P.: Laboratory diagnostic techniques for patients with early Lyme disease associated with erythema migrans: a comparison of different techniques. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 2023–2027 (2002)
36. Ohnishi J., Piesman J., de Silva A.M.: Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 670–675 (2001)
37. Pancewicz S., Moniuszko-Malinowska A., Garlicki A., Czupryna P., Grygorczuk S., Dunaj J.: Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme. Standardy Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych. Polskie Towarzystwo Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych, <http://www.pteilchz.org.pl/informacje/rekomendacje> (2018)
38. Pancewicz S.A., Garlicki A.M., Moniuszko-Malinowska A., Zajkowska J., Kondrusik M., Grygorczuk S., Czupryna P., Dunaj J.: Diagnosis and treatment of tick-borne diseases recommendations of the Polish society of epidemiology and infectious diseases. *Przegl. Epidemiol.* **69**, 309–316 (2015)
39. Persing D.H., Rutledge B.J., Rys P.N., Podzorski D.S., Mitchell P.D., Reed K.D., Liu B., Fikrig E., Malawista S.E.: Target imbalance: Disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. *J. Infect. Dis.* **169**, 668–672 (1994)
40. Portnoi D., Sertour N., Ferquel E., Garnier M., Baranton G., Postic D.: A single-run, real-time PCR for detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, based on the *hbb* gene sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**, 35–40 (2006)
41. Priem S., Rittig M.G., Kamradt T., Burmester G.R., Krause A.: An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 685–690 (1997)
42. Rauter C., Oehme R., Diterich I., Engele M., Hartung T.: Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 36–43 (2002)

43. Reed K.D.: Laboratory testing for Lyme disease: possibilities and practicalities. *J. Clin. Microbiol.* **402**, 319–324 (2002)
44. Ružić-Sabljić E., Cerar T.: Progress in the molecular diagnosis of Lyme disease. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **17**, 19–30 (2017)
45. Saier M.H., Paulsen I.T.: Whole genome analyses of transporters in Spirochetes: *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 393–399 (2000)
46. Samuels D.S.: Gene Regulation in *Borrelia burgdorferi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 479–499 (2011)
47. Schmidt B.: PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 185–201 (1997)
48. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., John R.: PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 1014–1026 (2012)
49. Sicklinger M., Wienecke R., Neubert U.: In vitro susceptibility testing of four antibiotics against *Borrelia burgdorferi*: A comparison of results for the three genospecies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1791–1793 (2003)
50. Stanek G., Reiter M.: The expanding Lyme *Borrelia* complex – clinical significance of genomic species? *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 487–493 (2011)
51. Stanek G., Strle F.: Lyme borreliosis – from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**, 233–258 (2018)
52. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F.: Lyme borreliosis. *Lancet*, **379**, 461–473 (2012)
53. Theisen M., Frederiksen B., Lebech A.M., Vuust J., Hansen K.: Polymorphism in ospC gene of *Borrelia burgdorferi* and immunoreactivity of OspC protein: Implications for taxonomy and for use of OspC protein as a diagnostic antigen. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2570–2576 (1993)
54. Wodecka B., Leońska A., Skotarczak B.: A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia* spirochaetes in *Ixodes ricinus*. *J. Med. Microbiol.* **59**, 309–314 (2010)
55. Wu C.J., Chen T.Y. i wsp.: Identification of fungal pathogens from clinical specimens using multi-locus PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **78**, 141–143 (2014)



INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

Od ostatniej informacji o działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, zamieszczonej w zeszytach nr 3 z 2020 r. kwartalników Advancements of Microbiology – Postępy Mikrobiologii i Polish Journal of Microbiology, ZG PTM zajmował się następującymi sprawami:

1. PTM objął Honorowym Patronatem Konferencję Mikrobiologiczną organizowaną *on-line*, w ramach Ogólnopolskich Spotkań Mikrobiologów i Epidemiologów, w dniu 30 września 2020 r. Kierownik Naukowy: Pani prof. dr hab. Ewa Augustynowicz-Kopeć. Organizator: firma MediCare; <http://medicare.waw.pl/konferencje/>.
2. FEMS powiększył ofertę wydawanych czasopism

Oprócz:



<https://academic.oup.com/fems-journals>

Rozpoczęto wydawanie czasopism:



<https://academic.oup.com/femsmicrobes>

oraz



<https://academic.oup.com/microlife>

3. Z inicjatywy FEMS 17 września 2020 r. miało miejsce wydarzenie: International Microorganism Day. Zapraszaliśmy do uczestniczenia *on-line* w obchodach tego Międzynarodowego Mikrobiologicznego Świąta. Przez cały dzień – *live streaming* – można było śledzić na bezpośredniej stronie wydarzenia, jak i na kontach Twitter, Facebook i YouTube.
4. Sekretarz i Prezes PTM zostali poproszeni o zorganizowanie wydania specjalnego zeszytu prestiżowego czasopisma: International Journal of Molecular Sciences pt: „Multi-Drug Resistant Bacteria – A Global Problem”. Zapraszamy potencjalnych autorów do zgłoszenia prac doświadczalnych lub przeglądowych – do 31 marca 2021 r. Informacja na temat zeszytu znajduje się pod adresem:

https://www.mdpi.com/journal/ijms/special_issues/multi_drug_resistant_bacteria

**International Journal of
Molecular Sciences**
an Open Access Journal by MDPI

**IMPACT
FACTOR
4.556**

Multi - Drug Resistant Bacteria—A Global Problem

Guest Editors
Prof. Dr. Agnieszka E. Laudy

Co-Guest Editors
Prof. Dr. Stefan Tyski

Deadline
31 March 2021

Special Issue

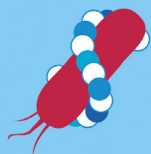
[mdpi.com/si/61316](https://www.mdpi.com/si/61316) **Invitation to submit**

5. PTM udzielił poparcia Polskiemu Towarzystwu Studentów Farmacji, największej w Polsce organizacji zrzeszającej studentów farmacji, w przeprowadzeniu ogólnopolskiej akcji „Antybiotyko-terapia pod Lupą Farmaceuty”, która odbyła się w dniach 2.11 – 8.11.2020. Pani dr Agnieszka Sulikowska (członek OT PTM w Warszawie) przeprowadziła webinar skierowany do dorosłych odbiorców, który skupiał się na zagadnieniach związanych z antybiotyko-terapią.
6. W dniu 30.10.2020 r. podjęto Uchwałę 22–2020 dotyczącą przedłużenia zatrudnienia Pani sekretarki ZG PTM do 31.10.2021 r., Uchwałę 24–2020 w sprawie przedłużenia zatrudnienia Pani księgowej PTM do 31.12.2021 r. oraz uchwałę nr 23–2020 dotyczącą przyjęcia dwóch nowych członków zwyczajnych PTM.
7. W dniu 10.11.2020 r. podjęto Uchwałę 25–2020 w sprawie objęcia patronatem konferencji on-line „II Ogólnopolskie Spotkanie Mikrobiologów i Epidemiologów” organizowanej w dniu 30.11.2020 r. przez Konsultanta Wojewódzkiego w dziedzinie Mikrobiologia Lekarska Panią prof. dr hab. Ewę Augustynowicz-Kopeć. <https://www.webinar-med.pl/osme/#program>
8. Pani dr Agnieszka Sulikowska została przedstawicielem PTM do zespołu, który przygotowuje opinię w sprawie uznania elementów programu specjalizacji i skrócenia okresu szkolenia lekarzom odbywającym specjalizację w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej.
9. Prowadzimy rozmowy z Panem Dawidem Ceculą dyrektorem firmy Exeley Co, wydającym czasopisma PTM on-line, w sprawie przedłużenia umowy wydawniczej obejmującej Polish Journal of Microbiology, na lata 2021 i 2022.
10. Rozważana jest kwestia udziału PTM w opłacaniu składki rocznej uczestnictwa Polski (czyli uczestnictwa kraju a nie konkretnego towarzystwa naukowego w European Union of Medical Specialists, Section of Medical Microbiology (<https://uems-smm.eu/uems-smm/>)).
11. Przypominamy o konieczności opłacenia składki członkowskiej w PTM za 2020 r.
12. Z okazji nadchodzących Świąt Bożego Narodzenia i roku 2021 dziękujemy wszystkim członkom PTM za współpracę w minionym okresie oraz życzymy dużo zdrowia, pomyślności, sukcesów oraz rychłego zakończenia pandemii COVID-19, co umożliwi nam spotkanie na XXIX Zjeździe PTM.

Warszawa, 07.12.2020 r.

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

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



XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
MIKROBIOLOGÓW
14-17 WRZEŚNIA 2021,
WARSZAWA



XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

14-17 WRZEŚNIA 2021,
WARSZAWA



Miejsce Zjazdu:

Sangate Hotel Airport
Warszawa, ul. Komitetu Obrony Robotników 32
(dawniej 17 Stycznia, róg ul. Żwirki i Wigury)

Główny Organizator Zjazdu:

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów
ul. Stefana Banacha 1b, 02-097 Warszawa
ptm.zmf@wum.edu.pl, www.microbiology.pl

CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM

Członek Wspierający PTM – Złoty
od 27.03.2017 r.



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

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

Członek Wspierający PTM – Srebrny
od 12.09.2017 r.



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

Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 12.09.2017 r.



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

Członek Wspierający PTM – Zwyczajny
od 06.06.2019 r.



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

Firma BART jest producentem i dystrybutorem surowców oraz dodatków dla przemysłu spożywczego i farmaceutycznego. Specjalizujemy się w probiotykach oraz surowcach uzyskiwanych metodami biotechnologicznymi.

Współpracujemy z renomowanymi producentami: Probiotal, Gnosis, Lesaffre

SPIS TREŚCI

K. Bulski – Znaczenie bioaerozolu w badaniach kryminalistycznych	331
S.M.A. Sulayman, R.S. Bora, J.S.M. Sabir, M.M.M. Ahmed – Brucelloza: aktualny stan epidemiologiczny i perspektywy na przyszłość	337
A.M. Banaś, A. Petrykowska, E.K. Jagusztyn-Krynicka – Generowanie mostków disiarczkowych w białkach – różnorodność strukturalna i funkcjonalna białek DsbA	345
A. Gęsicka, A. Henschke, Z. Barańska, A. Wolna-Maruwka – <i>Bacillus thuringiensis</i> – nowy potencjał aplikacyjny	357
PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY	
W. Grąźlewska, B. Ferra, L. Holec-Gąsior – Przydatność diagnostyczna reakcji PCR w rozpoznawaniu boreliozy	367
KOMUNIKATY, INFORMACJE	379

CONTENTS

K. Bulski – The importance of bioaerosol in forensic investigations	331
S.M.A. Sulayman, R.S. Bora, J.S.M. Sabir, M.M.M. Ahmed – Brucellosis: current status of the disease and future perspectives	337
A.M. Banaś, A. Petrykowska, E.K. Jagusztyn-Krynicka – Disulfide bonds formation in bacterial proteins – structural and functional diversity among DsbA proteins	345
A. Gęsicka, A. Henschke, Z. Barańska, A. Wolna-Maruwka – <i>Bacillus thuringiensis</i> – new application potential	357
METHODS AND STANDARDS	
W. Grąźlewska, B. Ferra, L. Holec-Gąsior – Diagnostic usefulness of PCR in the recognition of lyme disease	367
NEW REPORTS, INFORMATION	379

Warunki prenumeraty

Zapytania o warunki prenumeraty oraz zamówienia proszę kierować do Wydawcy
Roma Walendzewicz
tel. 22 115 38 10, 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com

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

Cena 1 zeszytu 40 zł + VAT 8%