

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# Postępy Mikrobiologii

Advancements of Microbiology

Kwartalnik

**Tom 61**

**Zeszyt 1•2022**

STYCZEŃ – MARZEC

CODEN:

PMKMAV 61 (1)

2022

Impact Factor = 0,947 (2020)

Punktacja MNiSW = 20,00 (2019)

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

#### RADA REDAKCYJNA

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

#### REDAKCJA

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

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

KAROLINA JAWORSKA (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-POPŁAWSKA (Uniwersytet Warszawski), GABRIELA BUGLA-PŁOSKOŃSKA (Uniwersytet Wrocławski),  
AGATA GORYLUK-SALMONOWICZ (Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie),  
TOMASZ JAGIELSKI (Uniwersytet Warszawski), HENRYK KRUKOWSKI (Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie),  
AGNIESZKA KWIATEK (Uniwersytet Warszawski), BOŻENA NEJMAN-FALEŃCZYK (Uniwersytet Gdański),  
RENATA MATLAKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), EDYTA PODSIADŁY (Uniwersyteckie Centrum Kliniczne WUM),  
ADRIANNA RACZKOWSKA (Uniwersytet Warszawski), KRZYSZTOF SKOWRON (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu),  
AGNIESZKA SZCZEPANKOWSKA (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN),  
PIOTR ZALESKI (Instytut Biotechnologii i Antybiotyków)

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

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

Glony *Prototheca bovis* – pękające sporangium uwalniające dwie komórki potomne  
Preparatyka: dr hab. Tomasz Jagielski, Zakład Mikrobiologii Medycznej, Instytut Mikrobiologii,  
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
Image Copyright Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

---

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

---

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

FYKOLOGIA MEDYCZNA  
– NOWA DYSCYPLINA MIKROBIOLOGII

Obecnie znanych jest wiele grup czynników etiologicznych chorób ludzi i zwierząt. W grupie czynników biologicznych, stanowiących przedmiot zainteresowania mikrobiologii medycznej, wyróżnia się wirusy (i wiroidy), bakterie, grzyby, a także atypowe czynniki zakaźne, takie jak białka prionowe. Wywołują one choroby zakaźne (infekcyjne) dla odróżnienia od chorób pasożytniczych (parazytoz), których źródłem są pierwotniaki, robaki (płazińce, nicienie, kolcogłowy) i stawonogi (m.in. owady i pajęczaki)<sup>1</sup>. Ten klasyczny już podział organizmów patogennych jest stale weryfikowany w świetle coraz to nowych badań filogenetycznych. I tak na przykład, gatunek *Rhinosporidium seeberi*, zaliczany wcześniej do grzybów, włącza się do wydzielonej grupy *Mesomycetozoea (Ichthyospora)* [5]. Z kolei patogenne tzw. pleśnie wodne lub lęgniowce (*Oomyces*) z rodzaju *Pythium* i *Lagenidium*, dawniej zaliczane do grzybów lęgniowych (*Oomycota*), klasyfikowane są obecnie w królestwie *Chromista* [16]. Pomijając jednak szczegóły taksonomiczne, wspólną cechą wszystkich wymienionych patogenów jest zdolność wywołania choroby w następstwie zakażenia (choroby zakaźne) lub inwazji (choroby pasożytnicze) tkanek ustroju przez czynnik chorobotwórczy, przy jednoczesnym przełamaniu barier immunologicznych gospodarza.

Wśród biologicznych czynników chorobotwórczych, osobne miejsce zajmują glony (algae). Ogólnie, stanowią one bardzo liczną i zróżnicowaną morfologicznie grupę ekologiczną, obejmującą kilka, filogenetycznie odległych linii ewolucyjnych. Do grupy, tradycyjnie nazywanej glonami, należą więc zarówno organizmy prokariotyczne (sinice, *Cyanobacteria*), jak i eukarionty, klasyfikowane w królestwach *Chromista*, *Plantae* i *Protozoa*.

Glony jako czynniki etiologiczne chorób wymienia się rzadko i niemal wyłącznie w opracowaniach specjalistycznych. Jest tak dlatego, że glony nie są prawie wcale kojarzone przyczynowo z wystąpieniem procesu chorobowego. A jednak istnieje bogata literatura dokumentująca przypadki wystąpienia objawów chorobowych jako bezpośredniego następstwa kontaktu z glonami. Przykładem są sezonowe zakwity sinic i morskich bruzdnic (*Dinoflagellata*), które mogą prowadzić do poważnych, a nawet śmiertelnych zatruc lokalnej fauny, a także człowieka. Wydzielane przez glony toksyny mogą powodować masowe śnięcie ryb, pomór

ptaków i ssaków morskich, a u człowieka wywoływać objawy ze strony układu pokarmowego, oddechowego oraz objawy neurologiczne. Toksyny niektórych gatunków alg są kumulowane w tkankach zwierząt morskich (gł. ryb, skorupiaków i mięczaków), a ich spożycie przez człowieka może powodować ciężkie zatrucia, którym towarzyszą biegunka, objawy porażenne lub zaburzenia amnestyczne [4, 8]. W wypadku niektórych glonów, toksyny mają głównie działanie drażniące na skórę i błony śluzowe. Wówczas, nawet krótkotrwały kontakt z drobnoustrojem może prowadzić do wystąpienia objawów zapalenia skóry [21]. Znane są też przypadki alergii wywołane inhalacją glonów występujących w kurzu domowym [7].

Jednak chorobotwórczość glonów dla człowieka i zwierząt nie ogranicza się do wytwarzania toksyn, a przez to wywoływania zatruc, czy też alergii wziewnych i kontaktowych. Wśród glonów opisano również zjawisko aktywnego parazytyzmu. Innymi słowy, niektóre glony, podobnie do innych patogenów bakteryjnych, grzybiczych, czy pierwotniaczych, mają zdolność kolonizacji i inwazji tkanek gospodarza, wewnątrzustrojowego rozsiewu, modulowania, a nawet unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza.

Wśród pierwszych glonów, u których wykryto pasożytniczy tryb życia były jednokomórkowe, fotosyntetyzujące glony z grupy zielenic (*Chlorophyta*), zaliczane do rodzaju *Coccomyxa*. Opisane na początku ub. w. jako pasożytujące na rozgwiazdach, były w późniejszym czasie izolowane z płaszcza różnych gatunków małży [3, 26]. Nieliczne mikroalgi, z grupy zielenic, opisano jako wywołujące zakażenia u kręgowców. W 1973 r. Cordy opisał pierwszy przypadek chlorellozy, czyli zakażenia wywołanego glonami z rodzaju *Chlorella* pod postacią nekrotycznego zapalenia wątroby u owcy [2]. W następnych latach, chorobę rozpoznano u kilku kolejnych owiec z objawami zakażenia rozsianego [22, 24], a także kilkunastu krów wykazujących cechy zapalenia węzłów chłonnych i otrzewnej [10, 20, 25]. Pojedyncze przypadki chlorellozy<sup>2</sup> odnotowano również u wielbłąda [18], gazeli [9] oraz psa [23]. W tym ostatnim przypadku, choroba miała najcięższy przebieg doprowadzając do śmierci zwierzęcia. Dotychczas odnotowano

<sup>1</sup> Podział ten nie jest stosowany konsekwentnie w piśmiennictwie fachowym. Nierzadko choroby pasożytnicze traktuje się jako choroby zakaźne.

<sup>2</sup> Termin chlorelloza nie jest precyzyjny, jako że czynnikami etiologicznymi choroby były nie tylko glony z rodzaju *Chlorella*, należące do klasy *Trebouxiophyceae*, ale też przedstawiciele takich rodzajów jak *Bracteacoccus*, *Chlorochytrium* i *Scenedesmus*, zaliczanych do tzw. zielenic właściwych (*Chlorophyceae*). Stąd propozycja, aby w miejsce nazwy „chlorelloza” stosować nazwę „chlorofytoza” [10].

sześć przypadków zakażeń u człowieka, których źródłem były fotosyntetyzujące zielenice. Co ciekawe, tylko trzy spośród tych przypadków były wywołane przez glony z rodzaju *Chlorella* [11, 15, 30]. W pozostałych przypadkach, jako czynnik etiologiczny wyizolowano glony z rodzaju *Desmodesmus* (*Chlorophyceae*) [6, 29]. U wszystkich sześciorga pacjentów, choroba miała postać infekcji skórnej, u co najmniej czworga poprzedzonej urazem mechanicznym w okolicy objętej zakażeniem. U żadnego z pacjentów, poza jednym, nie stwierdzono cech immunosupresji. U wszystkich chorych, z jednym wyjątkiem, uzyskano wyleczenie stosując zaopatrzenie chirurgiczne rany i konwencjonalne leczenie zachowawcze.

U glonów fotosyntetyzujących, pasożytnictwo rzadko stanowi strategię życiową. Dominuje autotrofizm, a mechanizmy konwersji parazytycznej nie są znane. Wydaje się, że znacznie łatwiej wytłumaczyć zjawisko parazytyzmu wśród glonów, które w trakcie swojej historii ewolucyjnej, utraciły aparat fotosyntetyczny i obrały heterotroficzny tryb życia. Szczególne miejsce w tej grupie zajmują przedstawiciele dwóch filogenetycznie bliskich rodzajów: *Helicosporidium* i *Prototheca*, sytuujących się w klasie *Trebouxiophyceae*. Helikosporidia to znane od lat 20. ub. w., obligatoryjne, wewnątrzkomórkowe patogeny bezkręgowców, takich jak przywry, skorupiaki, roztocza, ale przede wszystkim owadów, gł. z rzędu muchówek (*Diptera*), chrząszczy (*Coleoptera*) i łuskoskrzydłych (*Lepidoptera*) [27].

Glony z rodzaju *Prototheca* to najbardziej znane patogeny zwierząt o rodowodzie roślinnym (*Viridiplantae*) [12, 13]. Po raz pierwszy zostały opisane w 1894 r. przez Krügera, który wyizolował je z wycieków przyrannych drzew liściastych [17]. Inaczej niż helikosporidia, glony *Prototheca* spp. to organizmy saprofityczne, szeroko rozprzestrzenione w przyrodzie, i tylko w szczególnych wypadkach, zwykle w warunkach obniżonej odporności gospodarza, zdolne do wywoływania zakażeń. U ludzi, choroba (prototekoz) przyjmuje postać skórną, stawową lub uogólnioną, której towarzyszy zajęcie różnych narządów wewnętrznych (m.in. wątroby, otrzewnej, płuc, opon mózgowo-rdzeniowych) [13, 28]. Główną manifestacją prototekozy zwierzęcej jest zapalenie gruczołu mlekowego krów (mastitis). Choroba ma zwykle przebieg chroniczny, gdzie jedynym objawem jest drastyczny spadek wydajności mlecznej [13]. Zakażenia prototekowe u krów, po raz pierwszy opisane w połowie ub. w., są obecnie notowane na całym świecie, przy czym uwagę zwraca wyraźna tendencja wzrostowa zachorowań [14]. Choć w medycynie weterynaryjnej, główny problem zdrowotny stanowi prototekozą bydła mlecznego, przypadki choroby obserwuje się także u psów, kotów, a także innych zwierząt udomowionych (m.in. owiec, kóz, koni) i dzikich (m.in. bobry, nietoperze) [13, 19].

Na przestrzeni blisko sześciu dekad, które minęły od opisanego pierwszego przypadku prototekozy u człowieka (1964 r.), udokumentowano łącznie ponad 350 takich przypadków, na całym świecie [Jagielski, dane niepub.]. Co istotne, przegląd piśmiennictwa kazuistycznego wyraźnie pokazuje trend zwykły w liczbie zachorowań. Jeśli w pierwszym 30-leciu (1964–1996), odnotowano 75 nowych przypadków, to już w okresie ostatnich dwóch dekad (1997–2017), ich liczba wyniosła 135 [28]. Ten znaczący wzrost zachorowań należy przypisać z jednej strony powiększającej się populacji osób z obniżoną odpornością, skutkiem starzenia, a także chorób i zabiegów wymagających leczenia immunosupresyjnego, z drugiej zaś – większej świadomości klinicznej i osiągnięciom technologicznym w diagnostyce laboratoryjnej.

Przykład prototekozy ilustruje zjawisko, które już od pewnego czasu zaznacza się w dziedzinie infekcjologii. Chodzi o poszerzenie się spektrum etiologicznego chorób zakaźnych. Pojawianie się nowych patogenów ma różne uwarunkowania – środowiskowe (np. wywołane działalnością człowieka zmiany klimatyczne, transformacja i degradacja naturalnych ekosystemów), społeczne (np. ruchy migracyjne ludności, zmiany stylu życia, globalizacja, senilizacja społeczeństw) i gospodarcze (np. rozwój nowych technologii w diagnostyce i terapii). Procesy te istotnie wpływają na rozwój biologiczny mikroorganizmów, generując zmiany przystosowawcze pozwalające zasiedlać im nowe nisze ekologiczne, różnicować strategie troficzne, kształtować, w drodze ewolucji emergentnej, nowe formy lepiej przystosowane do życia w zmienionych warunkach.

Glony w funkcji czynników chorobotwórczych można postrzegać właśnie jako produkt wspomnianych procesów. Stale przyspieszające tempo przeobrażeń we współczesnym świecie pozwala przypuszczać, że rejestr drobnoustrojów, w tym także glonów, o potencjale chorobotwórczym wobec człowieka, będzie się stale powiększał.

W kontekście wzrastającego znaczenia glonów jako potencjalnych patogenów człowieka i zwierząt, cenne wydaje się, aby problematykę chorób wywoływanych przez te drobnoustroje, osadzić w odrębnej dziedzinie badawczej, rozumianej jako dział mikrobiologii, integrujący badania z obszaru medycyny, weterynarii, biologii i nauk pokrewnych. Uwagę na to zwrócił już w 1978 r. Casal proponując nazwę „Ficologia Médica” (hiszp. fykologia medyczna)<sup>3</sup> dla nowej dyscypliny naukowej poświęconej chorobom wywołanym przez

<sup>3</sup> Nazwa „fykologia” (gr. *phýkos*, wodorost; *lógos*, słowo, nauka) synonimizowana jest z „algologią” (łac. *alga*, wodorost). W medycynie, algologia oznacza również naukę zajmującą się leczeniem i badaniem bólu (gr. *álgos*, ból). Stąd, „fykologia” jako nazwa nauki o glonach wydaje się bardziej właściwa.

glony i organizmy grzybopodobne [1]. Propozycja ta przeszła niemal bez echa, a wrócili do niej dopiero w 2009 r. Matsumoto i Todd organizując sesję naukową pn. „Medical phycology: An emerging realm of microbiology” w ramach XVII. Kongresu „International Society of Human and Animal Mycology” (ISHAM). Niedługo potem, hasło „fykologii medycznej” stało się szyldem nowo utworzonej (2014 r.) sekcji „Medical Phycology: Chlorellosis and Protothecosis Working Group” w ramach ISHAM [28].

Otwarcie w Redakcji *Postępów Mikrobiologii* działu „fykologii medycznej” jest wyrazem docenienia tylko skrótowo nakreślonej tu problematyki badawczej, a także dostrzeżenia konieczności ugruntowania nazwy tej nowej dyscypliny w literaturze fachowej oraz jej promocji w środowisku naukowym i pozanaukowym.

Tomasz Jagielski\*

Redaktor działu  
FYKOLOGIA MEDYCZNA

## Piśmiennictwo

- Casal M.: The current importance of medical phycology. *Rev. Hig. San. Pub.* **52**, 1134–1141 (1978)
- Cordy D.R.: Chlorellosis in a lamb. *Vet. Pathol.* **10**, 171–176 (1973)
- Crespo C., Rodríguez H., Segade P., Iglesias R., García-Estévez J.M.: *Coccomyxa* sp. (Chlorophyta: Chlorococcales), a new pathogen in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) of Vigo estuary (Galicia, NW Spain). *J. Invertebr. Pathol.* **102**, 214–219 (2009)
- Dittmann E., Wiegand C.: Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, 7–17 (2006)
- Fredricks D.N., Jolley J.A., Lepp P.W., Kosek J.C., Relman D.A.: *Rhinosporidium seeberi*: a human pathogen from a novel group of aquatic protistan parasites. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 273–282 (2000)
- Fujimoto M., Inaba Y., Takahashi T., Nakanishi G., Muraosa Y., Yahiro M., Kamei K., Murata S.-I.: Image Gallery: Granulomatous dermatitis due to infection with the chlorophyllic green alga *Desmodesmus*. *Br. J. Dermatol.* **179**, e167 (2018)
- Genitsaris S., Kormas K.A., Moustaka-Gouni M.: Airborne algae and cyanobacteria: occurrence and related health effects. *Front. Biosci. E* **3**, 772–787 (2011)
- Grattan L.M., Holobaugh H.S., Morris J.G.: Harmful algal blooms and public health. *Harmful Algae* **57**, 2–8 (2016)
- Haenichen T., Facher E., Wanner G., Hermanns W.: Cutaneous chlorellosis in a gazelle (*Gazella dorcas*). *Vet. Pathol.* **39**, 386–389 (2002)
- Hafner S., Brown C.C., Zhang J.: Green algal peritonitis in 2 cows. *Vet. Pathol.* **50**, 256–259 (2013)
- Hart J., Mooney L., Arthur I., Inglis T.J., Murray R.: First case of *Chlorella* wound infection in a human in Australia. *New Microbes New Infect.* **2**, 132–133 (2014)
- Jagielski T., Bakula Z., Gawor J. i wsp.: The genus *Prototheca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) revisited: implications from molecular taxonomic studies. *Algal Res.* **43**, e101639 (2019)
- Jagielski T., Lagneau P.-E.: Protothecosis. A pseudofungal infection. *J. Mycol. Méd.* **17**, 261–270 (2007)
- Jagielski T., Krukowski H., Bochniarz M. i wsp.: Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy farms in Poland – a cross-country study. *Microb. Biotechnol.* **12**, 556–566 (2019)
- Jones J.W., McFadden H.W., Chandler F.W., Kaplan W., Conner D.H.: Green algal infection in a human. *Am. J. Clin.* **80**, 102–107 (1983)
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A.: Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 10<sup>th</sup> edn. CABI, Wallingford, UK (2008)
- Krüger W.: Kurze Charakteristik einiger Organismen des Saftflusses der Laubbäume, *Hedwigia* **33**, 241–266 (1894)
- Le Net J.L., Ahmed M.F., Saint-Martin G.: Granulomatous enteritis in a dromedary (*Camelus dromedarius*) due to green algal infection. *Vet. Pathol.* **30**, 370–373 (1993)
- Masuda M., Jagielski T., Danesi P., Falcaro C., Bertola M., Krockenberger M., Malik R., Kano R.: Protothecosis in dogs and cats – new research directions. *Mycopathologia* **186**, 143–152 (2020)
- Migaki G., Garner F.M., Imes G.D.: Bovine protothecosis: a report of three cases. *Pathol. Vet.* **6**, 444–453 (1969)
- Osborne N.J., Shaw G.R.: Dermatitis associated with exposure to a marine cyanobacterium during recreational water exposure. *BMC Dermatol.* **8**, e5 (2008)
- Philbey A.W., Links I.J., Morrice G.C.: Algal infection in sheep grazing irrigated pasture. *Aust. Vet. J.* **79**, 212–214 (2001)
- Quigley R.R., Knowles K.E., Johnson G.C.: Disseminated chlorellosis in a dog. *Vet. Pathol.* **46**, 439–443 (2009)
- Ramírez-Romero R., Rodríguez-Tovar L.E., Nevárez-Garza A.M., López A.: *Chlorella* infection in a sheep in Mexico and minireview of published reports from humans and domestic animals. *Mycopathologia* **169**, 461–466 (2010)
- Rogers R.J., Connole M.D., Norton J., Thomas A., Ladds P.W., Dickson J.: Lymphadenitis of cattle due to infection with green algae. *J. Comp. Pathol.* **90**, 1–9 (1980)
- Stevenson R.N., South G.R.: *Coccomyxa parasitica* sp. nov. (Coccomyxaceae, Chlorococcales), a parasite of giant scallops in Newfoundland. *Brit. Phycol.* **9**, 319–329 (1974)
- Tartar A.: The non-photosynthetic algae *Helicosporidium* spp.: emergence of a novel group of insect pathogens. *Insects*, **4**, 375–391 (2013)
- Todd J.R., Matsumoto T., Ueno R. i wsp.: Medical phycology 2017. *Med. Mycol.* **56**, S188–S204 (2018)
- Westblade L.F., Ranganath S., Dunne W.M., Burnham C.A., Fader R., Ford B.A.: Infection with a chlorophyllic eukaryote after a traumatic freshwater injury. *N. Engl. J. Med.* **372**, 982–984 (2015)
- Yu J., Li Z., Brand J.J.: Characterization of a green alga isolated from infected human external tissue. *Phycological Res.* **57**, 251–258 (2009)

\* Korespondencja: Dr hab. Tomasz Jagielski, Zakład Mikrobiologii Medycznej, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, I. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel./fax: 22 55 41 427/010; e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl



## VACCINES AGAINST ANTHRAX – SELECTED RESEARCH

Dorota Żakowska<sup>1\*</sup>, Bożena Wlizło-Skowronek<sup>1</sup>, Patrycja Wójcicka<sup>1</sup>,  
Małgorzata Stawecka-Hamerla<sup>2</sup>, Katarzyna Naylor<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Biological Threats Identification and Countermeasure Center of the General Karol Kaczkowski Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Puławy, Poland

<sup>2</sup>Department of Laboratory Diagnostics, Coagulology and Microbiology, Provincial Specialist Hospital, Lublin, Poland

<sup>3</sup>Lublin Medical University, Department of Didactics and Medical Simulation, Lublin, Poland

Received in May, accepted in December 2021

**Abstract:** New strategies in the development of anthrax vaccines and therapeutics have been presented. Recently, considerable progress has been made in the finding of new drugs and suitable therapy for anthrax. Very promising research considers the use of antimicrobials against selected bacteria species, including antibiotic-resistant strains. However, alternative therapeutic options should also be considered, among them vaccines. *Bacillus anthracis* spores are still the most dangerous weapon amongst pathogens which can be used in a bio-terror attack. In this case, research for new anti-anthrax preparations is of primary importance for the protection of humans and animals. The overview of the most recent data shows the many new and promising possibilities for effective strategies in the development of vaccines and anti-anthrax preparations. The most effective of them should be available in the National Stockpile in the event of a biological crisis.

1. Introduction. 2. *Bacillus anthracis* virulence factors. 3. Current anthrax vaccines. 4. Immunogenicity of anthrax vaccine candidates. 5. Bivalent vaccines. 6. Capsule conjugate vaccines. 7. Domain's and epitopes of PA. 8. Summary

---

**Key words:** antibiotics, *Bacillus anthracis*, protective antigen, recombinant, vaccines

---

### 1. Introduction

*Bacillus anthracis* is a gram-positive, aerobic, spore forming bacterium that is the etiological factor of anthrax, causing disease in animals and humans. Due to its health effects, this bacterium is included in the 3 categories of biological hazard. Among animals, ruminant infections are the most common. Human infections occur mainly through contact with infected animals or animal products. The main routes of infection are microtrauma, alveoli, and the gastrointestinal tract. There are three main forms of anthrax: cutaneous, pulmonary, and food [21]. *B. anthracis* can be transmitted to humans by direct contact, ingestion, aerosolization or injection of vegetative cells or spores. *B. anthracis* spores were used in a bioterrorist attack in 2001 [8]. The event prompted the issuing of recommendations concerning, among other things, diagnostics, treatment, and prevention in the event of a terrorist attack [17, 35]. Recommendations developed in 200 by a working group of 23 experts representing medical and military centers, scientists, and emergency response offices contain recommendations on the use of antibiotic therapy [13]. These recommendations refer to the use of ciprofloxacin and doxycycline in post-exposure prophylaxis [27].

Full post-exposure prophylaxis, in the case of the likelihood of inhalation of *B. anthracis* spores, lasts 60 days, the minimum duration of antibiotic therapy is 10 days. The authorized services decide about the necessity to extend the therapy to a full 60 days. The 60-day therapy is conditioned by the period of spore germination, after which time a full-blown disease may develop [8, 13]. Even though antibiotics were administered before or immediately after the exposure to spores, in case of exposure to dangerous spore aerosol, inhaled spores may dwell in dormancy in mediastinum lymph nodes or can germinate immediately and release toxin after interruption of antibiotic treatment, causing severe disease or death. It is estimated that about 70% of cases can be prevented if the mass distribution of antimicrobials was commenced during the six days of initial exposure [3].

For this reason, it is important to combine antibiotics with vaccination in post-exposure therapy [3]. The alternative to antibiotic treatment [2] may be pre and post-exposure prevention with the use of vaccines. Post-exposure use of vaccines may shorten the prophylaxis time required. Terrorist attacks have forced scientists to take steps to search for an effective, safe, easy-to-administer vaccine, the use of which

---

\* Corresponding author: Dorota Żakowska, Biological Threats Identification and Countermeasure Center of the General Karol Kaczkowski Military Institute of Hygiene and Epidemiology, Lubelska 4, 24-100 Puławy; phone: 261-519-826; e-mail: dzakowska@wihe.pulawy.pl

will provide long-term protection. Currently, the AVA vaccine is available on the US market and the UK AVP [8, 9, 12, 23].

## 2. Toxins in pathogenesis as a vaccine targets

The full virulence of *B. anthracis* is determined by the presence of the ternary toxin and the coat that protects bacterium against phagocytosis [11].

Anthrax spores enter the body, where they duplicate and transform into vegetative forms capable of producing a toxin consisting of three synergistically acting proteins: protective antigen (PA – 83 kDa); lethal factor (LF – 87 kDa) and edema factor (EF – 89 kDa). LF in combination with PA form lethal toxin and EF in combination with PA form edema toxin [8, 16, 39].

According to the latest research, PA binds to the ATR (anthrax toxin receptor), which is a cellular receptor encoded by the ANTXR1 gene present on the surface of the host cell and is digested by the protease resulting in the removal of 20 kDa fragment. The obtained C-terminal PA fragment (PA63 kDa) acquires the ability to polymerize by forming heptamer. The next step is binding of factors LF and EF. Once (PA63)<sub>7</sub> – LF and (PA63)<sub>7</sub> – EF complexes are formed, they penetrate via ATR-mediated endocytosis into the acid environment of the endosome. [39]. The acidic pH in the endosome induces the incorporation of the PA heptamer into the endosome membrane and translocation of the EF factor into the cytosol of the attacked cell [24].

## 3. Current vaccines

Presently, the vaccines against anthrax are produced in the Great Britain and in the USA. The British vaccine AVP (anthrax vaccine precipitated) and the American AVA (anthrax vaccine adsorbed) are licensed.

Both vaccines containing PA (protective antigen), a highly immunogenic protein and small amounts of LF (lethal factor) are culture filtrate with aluminum hydroxide [9, 12, 23].

The AVP vaccine was first licensed in the UK in 1979 and is administered in three doses every three weeks and fourth dose after six months with an additional boost dose every twelve months. The AVA vaccine was registered in 1970 in the USA, at the Michigan Biologic Products Institute, Lansing and it is a cell-free culture adsorbed on aluminum hydroxide. The vaccine was named Biothrax in 2002 [3, 7, 9, 22, 28].

AVA requires a long vaccination schedule which is troublesome to perform and it is marginally reactogenic. It is administered six times in three doses every two weeks, and then three additional doses after six,

twelve and eighteen months; plus yearly boosters. Up to 01.03.1999, around 590,000 doses of the anthrax vaccine were administered to American soldiers with no vaccine side effects noted [7, 14, 38].

In research on primates it was shown that administering two doses with two weeks between them, fully protected the animals from infection with air-suspended spores of *B. anthracis* in the 8<sup>th</sup> and 38<sup>th</sup> week from the vaccination, and after a hundred weeks the immunity was 88% [7, 14, 40].

In the future, post-exposure antibiotic therapy should be shortened and combined with vaccination which guarantee protection against bacteraemia. A study conducted by Williamson *et al.* on rabbits has shown the effectiveness of antibiotic therapy combined with the rPA vaccine. In this research rabbits were infected with *B. anthracis*. Rabbits without rPA inoculation, were treated with antibiotics. Survival rate amounted to 56% of rabbits, in addition 50% of rabbits had bacteria detected in their blood. The study shown that maintenance dose of antibiotic levofloxacin combined with reduced rPA vaccine, increased animals survival to 89% and 11% of animals which had bacteraemia [36].

The US Food and Drug Administration accepted AVA (Anthrax Vaccine Adsorbed BioThrax) as anthrax vaccine. In post-exposure prophylaxis (PEP) AVA is recommended to administered three times subcutaneously: zero, fourteen and twenty-eight days, in combination with sixty days of antibiotic therapy [28, 29].

The Advisory Committee on Immunisation Practices (ACIP) recommends that one combines antibiotic therapy followed by vaccine administration in two weeks in post-exposure regimen [3].

The Centre for Disease Control and Prevention provides Biothrax in 5 ml dose vials. as the cell-filtrate of strain *B. anthracis* cultures adsorbed on aluminium hydroxide in 0,85% saline [3].

A study by Sivko *et al.* was conducted in order to assess the potential for shortening the time of antibiotic treatment. Research indicated the efficacy AVA PEP vaccination against inhalational anthrax in NHP (non-human primates) after anthrax exposure.

Group of forty-eight cynomolgus macaques were randomized to five group. Next, the AVA vaccine was administered in various mixtures on days zero and fourteen. Then Ames spores of *B. anthracis* were used for exposure on day twenty-eight at the dose of 200 LD<sub>50</sub>. [29]. Subjects who survived were tested for the presence of anti-PA IgG and the levels of Toxin Neutralising Antibody (TNA). Survival increased from 24 to 100% and it was correlated with pre-challenge humoral response. Animals which survived and were vaccinated had increased levels anti-PA IgG and TNA [29]. They did not show any signs of infection. Bacterial cells were not found in the blood, but spores were discovered in



the lung tissues. The body's immune response consist of antibodies and the cellular immune response constituting a complex process. Antibodies are needed to defend the body against infection, and their level in the blood can be determined. However, their level does not reflect the body's resistance [15, 32]. Increasing the effectiveness of a new generation of vaccines will depend on the possibility of stimulating the cellular response together with inducing humoral response to the PA antigen [15].

#### 4. Immunogenicity of anthrax vaccine candidates

Ndumnego *et al.* conducted research to determine the level of humoral response of *B. anthracis* protective antigen in African goats to collagen protein similar to anthracis collagen, spores of *B. anthracis* strain inactivated in formaldehyde (FIS), and vegetative antigen prepared from a capsule and toxin deficient strain (CDC 1014). Booster vaccination gave a higher titer of anti-FIS, anti-rPA and also lethal toxin-neutralizing antibody titer than a single dose of vaccination. A single and double dose of SLSV vaccine (Sterne 34F2 Live Spore Vaccine) gave the highest level of anti-FIS IgG to the other analyzed rPA (recombinant protective antigen) and rBcIA (recombinant bacillus collagen – like protein of anthracis) antigens. A second dose of vaccination resulted in an increase in antibody titers of 350 in the case of anti-FIS and 300 antibodies against rPA. SLVS vaccine administration did not affect rBcIA antibodies. A single dose of vaccine increased the neutralizing lethal toxin titer by 80 and second dose by 700. Vaccination with SLVS protected most goats treated with 800 *B. anthracis* spores. These results suggest that a second dose of vaccination may be given less than three months after the first dose [25].

Animals susceptible to infection can be protected by an approved Sterne vaccine containing live *B. anthracis* spores. However, this vaccine causes side effects in sensitive species. During the outbreak of the epidemic does not provide full protection and it incompatibility with antibiotics.

New generation vaccines containing recombinant peptides can provide solutions to these problems. Recently, the proposed antigen was rPA, BcIA, FIS. The ability to elicit a cellular response by selected antigens was tested on goats and with using a mouse model *in vivo*. Goats that had been given all three antigens showed the highest antibody titers. One dose of recombinant peptides observed a weaker effect, while second vaccination effected highest increase antibodies titers. The survival of mice given the rPA, rBcIA antigen mix after exposure to *B. anthracis* was 73%, while 68% of the exposed mice survived when the combination of the two rPA and rBcIA antigens was administered.

A 5% increase in goat survival was observed when FIS was added to the rPA and rBcIA mixture. These results confirmed earlier studies in which goats were vaccinated with rPA and rBcIA as well as rPA, rBcIA with the addition of FIS. The vaccine consists of three antigens for greater protection against *B. anthracis* infection, and the survival rate was 80%, while the rPA and rBcIA vaccinated goats had a 50% survival rate [26].

New generation vaccines based on recombinant forms of anthrax toxin are unstable during storage. Research shows that the response to this type of vaccine is directed at non-functional, non-neutralizing sections of anthrax toxin. Neutralization of anthrax toxin occurs by blocking the functional regions and epitopes, antibodies that comprise the PA domain [22]. The AVA and rPA vaccines with Alhydrogel adjuvant used in phase I clinical studies in humans and animals gave similar levels of antibodies. [22].

As a result of these concerns, a lot of effort has been invested in production and testing of the immunological efficiency of rPA (recombinant PA protein).

The vaccine containing the recombinant PA protein elicited a strong immune response producing a high neutralizing antibody titer providing protection against attenuated *B. anthracis* strain A16R that was obtained by mutagenesis of wild-type *B. anthracis* A16 which can synthesize the exotoxin, but without a capsule [18].

The rPA protein can be used to produce anthrax vaccine due to its *in vivo* and *in vitro* biological activity. Solubility is another feature of this protein that supports its use in the vaccine. Vaccination with rPA mice two or three times provided 100% protection against 10 or 50 LD<sub>50</sub> doses of *B. anthracis* strain 16R [19, 20].

#### 5. Bivalent vaccines

Both inhalation anthrax and pneumonic plague can be prevented simultaneously using a new form of vaccine presented in another research publication. A new study reports the development of a vaccine which allows targeting three antigens, F1 and V from *Yersinia pestis* and PA from *B. anthracis*, using a triple antigen consisting single recombinant vaccine. The functionality and immunogenicity characteristics of all three antigens are combined in the triple antigen. Results present a comprehensive prevention against inhalational form anthrax and pneumonic plague, along with strong antibody response in animals (rats, mice and rabbits), by using two dosages of the immunogen along with an Alhydrogel adjuvant.

Tested animals proved a full protection from a simultaneous challenge with *Y. pestis* and the lethal toxin of *B. anthracis*. Finally, due to demonstrated strong immunogenicity proved in the human trials against two of

the bio-terrorist agents, the bivalent anthrax-plague injection becomes a promising nominee for further production [30].

Another example of a nanoparticle vaccine directed against both anthrax and plague is a product based on bacteriophage T4 as a platform. The strong immune response, which is specific for anthrax and plague, was triggered by virus particles. Moreover, nanoparticles tested on animal models such as rabbits, mice and rats, protected them against inhalational anthrax and pulmonary form of plague.

Despite administering simultaneously a lethal dose of both anthrax toxin and *Y. pestis* CO92 bacteria, the animals survived as a result of complete protection. Two doses of this vaccine tested in animal models allowed a full protection against both inhalational anthrax and pneumonic plague when tested on animal models of: BALB/c mice, brown Norway rats, and New Zealand white rabbits. The T4 bacteriophage nanoparticles elicit a strong immune response to the pneumonic plague and inhalational anthrax. Use of modern platforms of nanoparticles such as phage T4, allow for the development of multivalent vaccines that could fight high-risk pathogens and help in fighting potential bioterror attacks [31].

The mucosal and systemic compartments were tested for the immunological memory response by Sun-Je Woo et al., who have investigated intranasal immunisation of rPA of *B. anthracis*. Use of the cholera toxin (CT) paired with rPA in a form of intranasal immunisation, resulted in long-term (6 months) response of PA-specific antibodies in lung, nasal, washes and serum. After booster immunisation a strong PA-specific memory B cells induction was noticed in lung, spleen and cervical lymph nodes (CLNs).

Moreover, use of the mentioned intranasal immunisation of rPA and CT, resulted in formation of effector memory CD4<sup>+</sup> T cells in the lungs. As the result Th1 and Th17 – type cytokines in the lungs expanded their expression. However, this do not hold for the spleen or CLNs. From the results it can be assumed that the PA-mediated immunity through nasal route, may become an promising agent to protect from anthrax, as there is direct correlation between protective immunity and the PA-specific antibodies. In conclusion, nasal route appears to be the most promising platform for the vaccine delivery, and produces a long-term immunity against anthrax [37].

## 6. Capsule conjugated vaccines

Vaccination with the anthrax capsule – a naturally occurring component of the bacterium that causes the disease – completely protected monkeys from lethal anthrax infection. These results indicate that anthrax

capsule is a highly effective vaccine component that should be considered for incorporation in future generation anthrax vaccines [33].

Research concerning the new anti-capsule vaccine development becomes an interesting topic, judging by the current results. Significant antibody responses were observed for the outer membrane protein complex (OMPC) of *Neisseria meningitidis*, and partial for the anthrax challenge, by using the capsule conjugate vaccines where the outer membrane protein complex (OMPC) is connected to the capsule. Moreover, in a cutaneous infection model a full protection was observed for the capsule connected to peptidoglycan [5].

Currently most of the available anthrax vaccines work only against the single PA immunogen of *B. anthracis*. This led to the development of a vaccine that can work against possible resistant strains, which is composed of anthrax polyglutamic acid capsule being covalently conjugated to the *N. meningitidis* serotype B outer membrane protein complex (OMPC). The results showed that only partial protection of rhesus macaques against inhalational anthrax was achieved using two doses of 2.5 µg of the vaccine.

However, the higher dosage of 50 µg of the capsule conjugated vaccine resulted in a full protection of rhesus macaques against inhalation anthrax. Therefore, the promising results indicate that this conjugated capsule vaccine could become a promising drug in fighting anthrax challenge.

From the current studies, it can be observed that large doses of conjugate capsule-OMPC vaccine, can deliver a full protection in the rhesus macaques, animal model of inhalation anthrax. In fact, the promising results of the non-human primate model can suggest that the conjugated vaccine of immunogenic capsule with PA in prospect anthrax vaccines can possibly boost the effectiveness of PA-based vaccines [5, 6].

## 7. Domain's and epitopes of PA

Vaccines development, diagnostic assays and the post exposure therapy are the main areas PA antigen is targeted in research. It takes ten to eleven days from the first symptoms of cutaneous anthrax for the immune system reaction to be detectable, and it continues to be recognizable for the following eight to sixteen months.

Intoxication by anthrax toxin is a large process where each part of PA has a defined role. The second domain (PAD2), which is responsible for membrane insertion and heptamerisation of PA, generated the largest immune response. Another significant response was detected against domain 4 (PAD4), that has generally higher presence in the course of heptamerisation. However, the highest immune response was caused

by the domain 1 in a mouse model, in comparison to domains 2 and 4 which were significantly less efficient in triggering the larger antibody titer.

In conclusion, the individual domain 2 and 4 may become interesting targets for vaccine development through generating the chimeric protein with different applicable proteins, due to significant immunoreactivity observed on human cutaneous anthrax [34]. The results of the research of Gubbins *et al.* showed that the domain 2 of the PA protein as an immunogenic agent can neutralise the lethal *in vitro* toxin using monoclonal antibodies, which are a key factor in the response to *B. anthracis* infections [10]. The goal of the research of Gubbins *et al.* was to obtain PA specific monoclonal antibodies and the recognition of specific epitopes by these antibodies, where the epitopes protect the PA83 protein from being cleaved into PA63 and PA20. Brossier *et al.* created two monoclonal antibodies which, when bonded with domains 2 and 4 of PA83, neutralised anthrax toxin [4]. They obtained monoclonal antibodies 7.5 and 48.3 anti-PA, capable of both *in vitro* and *in vivo* neutralisation; the antibody 7.5 bonded with the domain 4 and protected it from being joined to the cell receptor. The antibody 48.3 bonded to the domain 2 and blocked the cleaving of PA83 into PA63 and PA20. The PA83 domains were, therefore, recognised by Mab 7.5 and 48.3 [4].

The main disadvantage of PA based vaccines is a short shelf life which restrains their usage, although they are currently the most efficient drug fighting against *B. anthracis*. Usage of ID II – ID III region of PA and the N-terminal region of LF in the development of an epitope-based chimeric vaccine (ID-LFn), was described in the research prepared by Aggarwal and colleagues. In contrast to well-known PA-based vaccines, use of the ID-LFn injection on mice model resulted in both high immunisation and longer shelf life. Therefore, the ID-LFn as the vaccine becomes a more promising candidate for a drug against *B. anthracis*, in contrast to standard subunit vaccines. Moreover, neutralisation of anthrax lethal toxin and elicitation of cytokine response, along with protective responses can be all mediated by immunodominant protective epitopes, namely ID I, ID II and ID III.

In conclusion, this study described the development of a new generation vaccine for fighting against anthrax, by chimeric protein fusion of immunodominant epitopes of PA and N-terminal domain of LF (LFn) [1].

## 8. Summary

The threat of *B. anthracis* spores use at a mass scale against humankind triggers the need to elaborate an effective countermeasure strategy. The research focuses

on numerous ways of protection including effective vaccination and methods that would insure protection even if we are faced with antibiotic – resistant *B. anthracis* strains. Anthrax is still a serious and often incurable disease, which requires fast and effective treatment methods. Due to a better understanding of the mechanisms of *B. anthracis* infection, new possibilities have emerged to solve important problems on the way to produce safe and effective formulations. Animal studies to date have shown that promising treatments to anthrax that include combination therapies with vaccines and new antibiotics that stimulate immunity against *B. anthracis* spores as well as toxins and vegetative forms.

## References

1. Aggarwal S., Somani V.K., Gupta S., Garg R., Bhatnagar R.: Development of novel multiepitope chimeric vaccine against anthrax. *Med. Microbiol. Immunol.* **208**, 185–195 (2019)
2. Altboum Z., Gozes Y., Barnea A., Pass A., White M. Kobilier D.: Postexposure prophylaxis against anthrax: Evaluation of various treatment regimens in intranasally infected guinea pigs. *Infect. Immun.* **70**, 6231–6241 (2002)
3. Bernstein D.I., Jackson L., Patel S.M.: Immunogenicity and safety of four different dosing regimens of anthrax vaccine adsorbed for post-exposure prophylaxis for anthrax in adults. *Vaccine*, **32**, 6284–6293 (2014)
4. Brossier F., Lévy M., Landier A., Lafaye P., Mock M.: Functional analysis of *Bacillus anthracis* protective antigen by using neutralizing monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **72**, 6313–6317 (2004)
5. Chabot D.J., Joyce J., Caulfield M., Cook J., Hepler R., Wang S., Vietri N.J., Ruthel G., Shoop W., Pitt L.: Efficacy of a capsule conjugate vaccine against inhalational anthrax in rabbits and monkeys. *Vaccine*, **30**, 846–852 (2012)
6. Chabot D.J., Ribot W.J., Joyce J., Cook J., Helper R., Nahas D., Chua J., Friedlander A.M.: Protection of rhesus macaques against inhalational anthrax with a *Bacillus anthracis* capsule conjugate vaccine. *Vaccine*, **34**, 4012–4016 (2016)
7. Chomiczewski K.: Szczepionki przeciwko wąglikowi. *Wakcynologia, Bielsko-Biała*: 394–397 (2005)
8. Doganay M., Demiraslan H.: Human anthrax as a re-emerging disease. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **10**, 10–29 (2015)
9. Friedlader A.M., Little S.F.: Advances in the development of next-generation anthrax vaccines. *Vaccine*, **27**, 28–32 (2009)
10. Gubbins M.J., Berry J.D., Corbett C.R., Mogridge J., Yuan X.Y., Schmidt L., Nicolas B., Kabani A., Tsang R.S.: Production and characterization of neutralizing monoclonal antibodies that recognize an epitope in domain 2 of *B. anthracis* protective antigen. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47**, 436–443 (2006)
11. Hanna P.: How anthrax kills. *Science*, **280** (5370):1671, 1673–1674 (1998)
12. Hicks C.W., Sweeney D.A., Cui X., Li Y., Eichacker P.Q.: An overview of anthrax infection including the recently identified form of disease in injection drug users. *Intensive Care Med.* **38**, 1092–1104 (2012)
13. Inglesby T.V., Tonat K. et al.: Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *JAMA*, **287**, 2236–2252 (2002)
14. Ivins B.E., Fellows P.F., Pitt M.L.M., Estep J.E., Welkos S.L., Worsham P.L., Friedlander A.M.: Efficacy of standard human

- anthrax vaccine against *Bacillus anthracis* aerosol spore challenge in rhesus monkeys. *Salisbury Med. Bull.* **87**, 125–126 (1996)
15. Ivins B.E., Welkos S.L.: Recent advances in the development of an improved, human anthrax vaccine. *Eur. J. Epidemiol.* **4**, 12–19 (1988)
  16. Leppla S.H.: The anthrax toxin complex. In: Alouf J., Freer J.H., (eds). Sourcebook of bacterial protein toxins. *London Academic Press.* 277–302 (1991)
  17. Liu S., Moayeri M., Leppla S.H.: Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends Microbiol.* **22**, 317–325 (2014)
  18. Liu X., Wang H. et al.: Genome sequence of *Bacillus anthracis* attenuated vaccine strain A16R used for human in China. *J. Biotechnol.* **210**, 15–16 (2015)
  19. Liu X., Wang D., Ren J., Tong Ch., Feng E., Wang X., Zhu L., Wang H.: Identification of the immunogenic spore and vegetative proteins of *Bacillus anthracis* vaccine strain A16R. *PLoS One.* **8**, e57959. DOI:10.1371/journal.pone.0057959. (2013).
  20. Ma Y., Yu Y.Z., Yu-Feng Z., Qing X., Zhi-Wei S.: In vitro and in vivo activities of recombinant anthrax protective antigen co-expressed with thioredoxin in *Escherichia coli*. *Hum. Vaccine Immunother.* **9**, 2371–2377 (2013)
  21. Manzulli V., Galante D. et al.: Evaluation of in vitro antimicrobial susceptibility of *Bacillus anthracis* strains isolated during anthrax outbreaks in Italy from 1984 to 2017. *J. Vet. Sci.* **20**, 58–62 (2019)
  22. McComb R.C., Martchenko M.: Neutralizing antibody and functional mapping of *Bacillus anthracis* protective antigen – The first step toward a rationally designed anthrax vaccine. *Vaccine*, **34**, 13–19 (2016)
  23. Moayeri M., Leppla S.H., Vrentas C., Pomeransteve A.P., Liu S.: Anthrax pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 185–208 (2015)
  24. Mourez M., Kane R.S., Mogridge J., Metallo S., Deschatelets P., Sellman B.R., Whitesides G. M., Collier R.J.: Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin, *Nat. Biotechnol.* **19**, 985–961 (2001)
  25. Ndumnego O.C., Köhler S.M., Crafford J., van Heerden H., Beyer W.: Comparative analysis of the immunogenic response induced by the Sterne 34F2 live spore *Bacillus anthracis* vaccine in ruminant model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **178**, 14–21(2016)
  26. Ndumnego O.C., Köehler S.M., Crafford J.E., Beyer W., van Heerden H.: Immunogenicity of anthrax recombinant peptides and killed spores in goats and protective efficacy of immune sera in A/J mouse model. *Sci. Rep.* **8**:16937. DOI: 10.1038/s41598-018-35382-8 (2018)
  27. Powell A.G., Crozier J.E., Hodgson H., Galloway D.J., A case of septicemic anthrax in an intravenous drug user. *BMC Infect Dis.* **11**, 21 (2011)
  28. Quinn C.P., Marano N. et al.: A three – dose intramuscular injection schedule of anthrax vaccine adsorbed generates sustained humoral and cellular immune responses to protective antigen and provides long-term protection against inhalation anthrax in rhesus macaques. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 1730–1745 (2012)
  29. Sivko G.S., Stark G.V., Tordoff K.P., Taylor K.L., Glaze E., Van Raden M., Schiffer J.M., Hewitt J.A., Quinn C.P., Nuzum E.O.: Evaluation of early immune response-survival relationship in cynomolgus macaques after anthrax vaccine adsorbed vaccination and *Bacillus anthracis* spore challenge. *Vaccine*, **34**, 6518–6528 (2016)
  30. Tao P., Mahalingam M., Zhu J., Moayeri M., Kirtley M.L.: A bivalent anthrax-plague vaccine that can protect against two tier-1 bioterror pathogens, *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis*. *Front. Immunol.* **8**, 687 (2017)
  31. Tao P., Mahalingam M., Zhu J., Moayeri M., Sha J., Lawrence W.S., Leppla S.H., Chopra A.K., Rao V.B.: A bacteriophage T4 nanoparticle-based dual vaccine against anthrax and plague. *mBio*, **9**, e01926-18 (2018)
  32. Turnbull P.C.B.: Anthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine*, **9**, 533–539 (1991)
  33. US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases: Anthrax capsule vaccine completely protects monkeys from lethal inhalational anthrax. 27.07.2016, <http://www.sciencedaily.com/releases/2016/06/160627125302.htm> (5.12.2021)
  34. Varshney A., Puranik N., Kumar M., Goel A.K.: The humoral immune response to various domains of protective antigen of *Bacillus anthracis* in cutaneous anthrax cases in India. *Defence Sci. J.* **66**, 645–650 (2016)
  35. Veitch J., Kansara A., Bailey D., Kustos I.: Severe systemic *Bacillus anthracis* infection in an intravenous drug user. *BMJ Case Rep.* **13**, doi:10.1136/bcr-2013-201921 (2014)
  36. Williamson E.D., Dyson E.H.: Anthrax prophylaxis: recent advances and future directions. *Front. Microbiol.* **6**, 1009 (2015)
  37. Woo S.J., Kang S.S., Park S.M., Yang J.S., Song M.K., Yan C.H., Han S.H.: Intranasal immunization with protective antigen of *Bacillus anthracis* induces a long-term immunological memory response. *Mol. Immunol.* **67**, 492–500 (2015)
  38. Wright J.G., Quinn C.P. et al.: Effect of reduced dose schedules and intramuscular injection of anthrax adsorbed on immunological response and safety profile: A randomized trial. *Vaccine*, **32**, 1019–1028 (2014)
  39. Żakowska D., Bartoszcze M., Kocik J. Nowe możliwości hamowania infekcji *B. anthracis*. *Medycyna Wet.* **67**, 665–668 (2011)
  40. Żakowska D., Kocik J., Bartoszcze M.: Wybrane kierunki badań nad szczepionkami przeciwko wąglikowi. *Przegl. Epidemiol.* **63**, 505–512 (2009)

## THE ROLE OF THE *BACTEROIDES* SPP. IN BACTERAEMIA

Mateusz Wysocki<sup>1</sup>, Marta Kierzkowska<sup>1, 2\*</sup>, Edyta Podsiadły<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology, Medical University of Warsaw

<sup>2</sup>Department of Laboratory Diagnostics and Clinical Immunology of Developmental Age, Paediatric Teaching Hospital

<sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Microbiology, Centre for Preclinical Research, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw

Received in May 2021, accepted in February 2022

**Abstract:** Anaerobic bacteraemia is not frequent (1.2–13.7%), but is associated with a high mortality rate of 16–27%. Anaerobic infections including bacteraemia nearly always arise from contamination by endogenous bacteria into contiguous or other sites like gastrointestinal tracts, genito-urinary tracts, abscesses etc. Factors leading to anaerobic bacteraemia are mainly surgical procedures, crush injuries, the presence of foreign bodies, tissue necrosis, tumours, diabetes. The most common infectious anaerobic agents are Gram-negative bacilli belonging to the *Bacteroides/Parabacteroides*, which under normal conditions constitute the natural human microflora. An important factor in the virulence of *B. fragilis* is the ability to form abscesses; a limited infection may progress to bacteraemia and then systemic inflammatory response syndrome and sepsis. Anaerobic bacteraemia mainly affects adults, with elderly patients over 65 years with underlying diseases. The importance of anaerobic bacteria in neonatal bacteraemia and sepsis is a relatively new phenomenon. In contrast the prevalence of anaerobes in bloodstream infections in children is extremely rare with children between 2 and 6 years of age having the least risk ranging 0–0.5% overall. The incidence of recovery of anaerobes in neonatal bacteraemia varies between 1.8% and 12.5%. The majority of cases reported in the literature were due to *Bacteroides* spp. (41%) other cultured anaerobes belonged to *Clostridium* spp. (32%), *Peptostreptococcus* spp. (20%).

Blood cultures remain the gold standard for detection of the etiologic both anaerobes and aerobes agent of bloodstream infection. In recent years significant progress has been made in the methods used in the diagnosis of anaerobes, which significantly reduced the time and cost of the examination. Currently, the mass spectrometry MALDI-TOF MS and 16S rRNA sequencing are increasingly used for anaerobic bacteria identification. In 2022, EUCAST published standardized disk diffusion method for the drug susceptibility testing of *Bacteroides* spp. and other 4 clinically significant anaerobes. Determining the sensitivity of anaerobes to antibiotics is important due to the increasing drug resistance in this group. Number of *B. fragilis* strains resistant to clindamycin and moxifloxacin is increasing. According to the published studies sensitivity to clindamycin and moxifloxacin is significantly rare and occurs in 64% and 68% of isolates and in 50.8% and 58.2% respectively. Carbapenems and metronidazole continue to be the most effective active antibiotics to be used in the empirical therapy of anaerobic bacteraemia. There are case reports of infections caused by multidrug-resistant strains of *Bacteroides* spp, meaning resistant to at least three antibiotics from different groups. Rapid microbial diagnosis, targeted therapy and surgical treatment of a possible source of infection are crucial in treatment of sepsis caused by anaerobic bacteria.

1. Introduction. 2. The genus *Bacteroides*. 3. Risk factors of anaerobic bacteraemia. 4. Microbiological diagnosis of anaerobic bacteraemia. 5. Treatment of anaerobic bacteraemia. 6. Development of resistance to recognised antimicrobial agents in strains of *Bacteroides* spp. 7. Summary

### ROLA *BACTEROIDES* SPP. W BAKTERIEMII

**Streszczenie:** Bakteriemia o etiologii beztlenowcowej nie jest częsta (1,2–13,7%), ale wiąże się z wysoką śmiertelnością, sięgającą 16–27%. Zakażenia bakteriami beztlenowymi, w tym bakteriemia, prawie zawsze powstają w wyniku zakażenia endogennego bakteriami bytującymi na przylegających tkankach lub innych miejscach, takich jak przewód pokarmowy, układ moczowo-płciowy, ropnie itp. Czynniki prowadzące do beztlenowej bakteriemii to głównie zabiegi chirurgiczne, zmiążdżenia, obecność ciał obcych, martwica tkanek, guzy nowotworowe, cukrzyca. Najczęstszymi bakteriami beztlenowymi powodującymi zakażenia krwi są pałeczki Gram-ujemne należące do rodzaju *Bacteroides/Parabacteroides*, które w normalnych warunkach stanowią naturalną mikroflorę człowieka. Ważnym czynnikiem zjadliwości *B. fragilis* jest zdolność do tworzenia ropni. Ta ograniczona infekcja może prowadzić do bakteriemii, a następnie do zespołu ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej i sepsy. Bakteriemia beztlenowa dotyka głównie dorosłych, w tym starszych pacjentów w wieku powyżej 65 lat z chorobami podstawowymi. W przeciwieństwie do tego, występowanie bakterii beztlenowych w zakażeniach krwi u dzieci jest niezwykle rzadkie, z najniższym poziomem ryzyka u dzieci w wieku od 2 do 6 lat wynoszącym 0–0,5%. Znaczenie bakterii beztlenowych w bakteriemii i posocznicy noworodków jest zjawiskiem stosunkowo nowym. Częstość wyhodowań beztlenowców z krwi u noworodków waha się od 1,8% do 12,5%. Za większość przypadków opisanych w piśmiennictwie odpowiada *Bacteroides* spp. (41%), inne hodowane beztlenowce należą do *Clostridium* spp. (32%), *Peptostreptococcus* spp. (20%).

Posiewy krwi pozostają złotym standardem w wykrywaniu czynnika etiologicznego zakażenia krwi, zarówno beztlenowego, jak i tlenowego. W ostatnich latach odnotowano znaczący postęp w metodach stosowanych w diagnostyce beztlenowców, co znacząco skróciło czas i koszt badania. Obecnie, coraz częściej do identyfikacji tych bakterii wykorzystuje się spektrometrię masową MALDI-TOF MS i sekwencjonowanie 16S rRNA. W 2022 EUCAST opublikował wytyczne dla znormalizowanej metody dyfuzyjno-krążkowej do badania lekowności *Bacteroides* spp. oraz innych 4 innych ważnych gatunków bakterii beztlenowych. Oznaczanie wrażliwości beztlenowców

\* Corresponding author: Marta Kierzkowska, Department of Medical Microbiology, Medical University of Warsaw, Chalubinskiego 5 Str, 02-004, Warsaw, Poland; tel. + 48 22 628 27 39; e-mail: marta.kierzkowska@wum.edu.pl

na antybiotyki jest ważne ze względu na rosnącą w tej grupie lekooporność. Najbardziej znaczące zmiany dotyczą wzrastającej liczby szczepów *B. fragilis* opornych na klindamycynę i moksycyflosacynę. Według opublikowanych badań wrażliwość na klindamycynę i moksycyflosacynę występuje tylko u odpowiednio 64–68% i 50,8–58,2% szczepów. Karbapenemy i metronidazol nadal pozostają najskuteczniejszymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi przeciwko tym bakteriom i mogą być stosowane w empirycznej terapii bakteriemii beztlenuj. Pojawiają się kazuistyczne doniesienia o zakażeniach wywołanych przez wielolekooporne szczepy *Bacteroides* spp tzn. oporne na co najmniej trzy antybiotyki z różnych grup. Szybka diagnostyka drobnoustrojów, chirurgiczne leczenie infekcji mają kluczowe znaczenie w terapii celowanej w przypadkach sepsy wywołanej przez bakterie beztlenuj.

1. Wprowadzenie. 2. Rodzaj *Bacteroides*. 3. Czynniki sprzyjające zakażeniom beztlenuj. 4. Diagnostyka mikrobiologiczna posiewów krwi w kierunku beztlenuj. 5. Leczenie bakteriemii o etiologii beztlenuj. 6. Rozwój oporności u szczepów *Bacteroides* spp. na uznawane środki przeciwko beztlenuj. 7. Podsumowanie

**Słowa kluczowe:** *Bacteroides fragilis*, bakteriemia, oporność na antybiotyki

**Keywords:** *Bacteroides fragilis*, bacteraemia, antimicrobial resistance

## 1. Introduction

Anaerobic bacteria are clinically significant pathogens in blood stream infections and septicaemia [15]. It is estimated that the consequence of bacteraemia of this aetiology has a high mortality rate of 16–27% [9, 28, 37, 41, 57, 62, 68]. Mortality is even higher when it comes to patients with antimicrobial empirical treatment not covering anaerobes – then the mortality rate increases to 45% [7, 37] or even to 63% [70]. *Bacteroides/Parabacteroides* anaerobic Gram-negative bacilli are the most commonly identified anaerobic bacteria causing bacteraemia and account for 1,2–13,7% of all positive blood samples from hospitalized patients [11, 13, 18, 28, 29, 62].

Anaerobic infections including bacteraemia nearly always arise from contamination by endogenous bacteria into contiguous or other sites. The most common sources of bacteraemia caused by anaerobes are: gastrointestinal tract, female genitourinary tract, abscesses and wound-/skin- and soft tissues and lower respiratory tract infections [14]. Postoperative gastrointestinal tract and genitourinary system patients and those with malignant tumours are at higher risk of bacteraemia caused by anaerobes [9, 57, 68]. Clinical significance of *Bacteroides* spp. bacilli is caused by the occurrence of numerous factors of virulence and increasing antibiotic resistance [69]. In the past decade the number of multidrug resistant isolates from the *Bacteroides/Parabacteroides* spp. has increased [11, 18, 36].

## 2. The genus *Bacteroides*

Among all species of genus *Bacteroides*, phenotypically similar species were identified to the *Bacteroides fragilis* group (BFG). This group consists of species of significant clinical importance: *Bacteroides caccae*, *B. eggerthii*, *B. fragilis*, *B. nordii*, *B. ovatus*, *B. salyersiae*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. vulgatus*. Within BFG, the number of newly-recognized species is increasing and several members have been

renamed to *Parabacteroides* group. They are the dominant component of the flora of the gastrointestinal tract and are also present on the genital tract and in the upper respiratory tract [20, 54, 66].

BFG is found in approximately 50% of all bacteraemia caused by anaerobes. One study shows that BFG was detected in 46.6% of all episodes, among which *B. fragilis* were responsible for 54.4% and *B. thetaiotaomicron* – 22% of the infections [11]. Similar results, with a significant dominance of *B. fragilis*, are presented by other researchers [24, 28, 34, 57, 60].

Bacteria of the genus *Bacteroides* have numerous virulence factors, with the adhesins among them, which are responsible for adhering to tissues [65]. Polysaccharide envelope protects the bacteria from the immune response of the host, both cellular and humoral. It is also responsible for initiating the formation of abscesses, which are an essential element of BFG-induced infections. Untreated abscesses can grow and cause intestinal obstruction, erosion of blood vessels or fistula formation, depending on location. Abscesses can break and cause scattered infections and bacteraemia. The envelope also performs an important function in the adhesion of bacteria to the host cells and tissues. Additionally these bacteria produce a variety of enzymes that mediate tissue destruction: neuraminidase, protease, collagenase, hyaluronidase or chondroitinsulfatase. As a result of metabolic processes, *Bacteroides* strains produce short-chain fatty acids, mainly succinic acid, which protect them from phagocytosis by inhibiting granulocyte chemotaxis. Like all Gram-negative bacteria, *Bacteroides* contain lipopolysaccharide (LPS) a component of outer membrane cell. But the biologic activity of this endotoxin is 100 to 1000 times lower than that of LPS from *Enterobacterales*. The LPS of *B. fragilis* contains a lipid A moiety, but there are structural and chemical composition differences that render this LPS less potent than the LPS of *Escherichia coli*. The inability of *B. fragilis* LPS to activate TLR2 may be responsible for this difference. A large number of anaerobic bacteria, including *B. fragilis* can tolerate exposure to oxygen but do not replicate in atmospheric

oxygen. The ability to survive exposure to oxygen is a different type of factor that facilitates the survival and thus pathogenicity of the organism [27, 39, 43, 65, 69].

### 3. Risk factors of anaerobic bacteraemia

Factors leading to anaerobic bacteraemia are mainly surgical procedures, crush injuries, the presence of foreign bodies, tissue necrosis, tumours, diabetes. In some cases, such as gastrointestinal perforation or aspiration pneumonia, sterile sites are exposed to large bacterial inoculum, which increases the chances of infection [62]. Finegold *et al.* [14] analysed 855 episodes of bacteraemia involving anaerobic microorganisms and identified abdominal cavity (52%), female genital tract (20%), lower respiratory tract (6%), upper respiratory tract (5%), and soft tissue infections (8%) as the main sources of disease [23]. The data presented by Tan *et al.* [57] are similar: abdominal infections (43%), followed by soft tissue infections (36%) and respiratory infections (5.5%) as a source of bacteraemia.

Other factors predisposing to anaerobic bacteraemia are: malignant tumours, haematological disorders, organ transplantation, alcoholism, drug addiction, immunosuppression, cytostatic therapy and corticosteroids [5, 11, 61]. Dumont *et al.* [11] analysed blood samples over a period of several months. Anaerobic aetiology has been shown in 5.8% of all cases of bacteraemia, most commonly in patients in abdominal and haematological surgery departments. In transplant departments in one of clinical hospitals in Warsaw, anaerobic bacteria were isolated from blood samples in 6.2% of cases of bacteraemia during the three-year follow-up period [25].

The elderly with comorbidities are definitely at higher risk of infection. Tan *et al.* [57] reported that 84% of anaerobic bacteraemia cases occurred in people over 60 years of age and the average age of affected patients was 73 years. Anaerobic bacteraemia mainly affects adults, with elderly patients over 65 years having high risk for developing bacteraemia. In contrast the prevalence of anaerobes in bloodstream infections in children is extremely rare with children between 2 and 6 years of age having the least risk ranging 0–0.5% overall [15]. An important aspect of anaerobe bacteraemia in children is that anaerobes frequently are present in cases of polymicrobial bacteraemia reflecting the fact that localized anaerobic infections are usually polymicrobial [5]. The importance of anaerobic bacteria in neonatal bacteraemia and sepsis is a relatively new phenomenon. The incidence of recovery of anaerobes in neonatal bacteraemia varies between 1.8% and 12.5%. The majority of cases reported in the literature were due to *Bacteroides* spp. (41%) other cultured anaerobes

belonged to *Clostridium* spp. (32%), *Peptostreptococcus* spp. (20%) [5]. Risk factors of anaerobic blood infections in new-borns are as following: prolonged birth, premature rupture of foetal membranes, premature birth and respiratory failure [4, 15]. Aerobic-anaerobic blood culture pairs are suggested as a routine in neonatal practice [32].

Infections caused by anaerobic bacteria may be facilitated by the use of antibacterial agents to which those organisms are naturally resistant, such as aminoglycosides, aztreonam, phosphomycin, trimethoprim and 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> generation fluoroquinolones (ciprofloxacin, levofloxacin) [6]. Nguyen *et al.* [37] demonstrated that the onset of highly resistant anaerobes infections correlates significantly with the previous treatment with beta-lactam antibiotics such as piperacillin, cefoxitin and cefotetan.

### 4. Microbiological diagnosis of anaerobic bacteraemia

Clinical characteristics of anaerobic bloodstream infections do not differ from bacteraemia caused by aerobic pathogens, but due to their longer generation time and rigorous growth requirements, it usually takes longer to establish the aetiology of infection [15]. In addition to identifying the pathogen present in the blood, the diagnosis should include the detection of the primary source of infection. Anaerobic bacteraemia carries a risk of developing systemic inflammatory response syndrome (SIRS), which presents with fever, tachycardia, tachypnoea, leukocytosis or leukopenia with neutrophilia [14, 62].

Blood cultures remain the gold standard for detection of the etiologic both anaerobes and aerobes agent of bloodstream infection. Blood culture for anaerobic bacteria is routinely carried out in all adult patients and in paediatric patients who have or are suspected of having such infection. Some authors suggest that anaerobic blood cultures should only be used selectively, if anamnestic data or clinical signs and symptom are suggestive of anaerobic bacteraemia. The opposite argument for this proceeding is the fact that routine use of anaerobic blood cultures gives opportunity of quick and effective culture of facultative anaerobes [15].

Blood samples collected to blood culture medium is cultivated on continuously monitored automated blood culture systems. Advances in contemporary blood culture media include use of resin-based media that absorb antibiotics and other inhibitory substances in the specimen to increase the detection rate. Additional advances to promote faster time to positivity include automation of workflow steps including loading bottles and measurement of blood volume, optimization

of temperature stabilization within the instrument. Contemporary systems of blood culture are as follows: BacT/Alert Virtuo (bioMérieux, France), BD Bactec FX (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ), Versa Trek (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Routinely blood is collected to two bottles: an aerobic one allowing preferential growth of aerobic and facultative anaerobic microorganisms, and an anaerobic one allowing preferential growth of strict and facultative anaerobic bacteria [18, 67].

Previously, the identification of strict anaerobes in positive blood culture and other clinical samples mainly relied on in-house, classical biochemical testing, biochemical strips e.g. API ID 32A Kit, Rapid ID ANA II Systems or automated systems e.g. VITEK ANC Card and gas-liquid chromatography. These methods were available in only a few diagnostics laboratories and provided identification results only 48–72 hours later, mostly on the genus level. Introduction of novel technological modalities, most importantly MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry) and 16S rRNA sequencing, into the routine diagnostics workflow sped up and modernized diagnostics of anaerobes. Continuous developments in improving and complementing databases of bacterial spectra for MALDI-TOF MS analysis enables detection of rarely occurring or taxonomically close microorganisms. As a result of these developments several “new” or so far unknown anaerobic species have been described as causative agents in bacteraemia e.g. *Solobacterium moorei*, *Actinotignum schaalii* [15].

*In vitro* susceptibility tests are usually not done by clinical laboratories for anaerobes because of technical difficulties and the length of examination time to have impact on antibiotic decisions. However, resistance patterns of many anaerobes have changed significantly over the last decades. It forced some clinical laboratories to perform anaerobic susceptibility testing. International guidelines suggest that susceptibility testing of anaerobes is indicated for isolates from blood and other normally sterile body sites for e.g.: brain abscess, endocarditis, osteomyelitis, joint infection and vascular graft. Susceptibility testing is obligatory in case of isolation of highly virulent strains or strains which have unpredictable susceptibility patterns. By 2021 routinely used method of determination antibiotic susceptibility of anaerobes was minimal inhibitory concentration (MIC) performed by standardized gradient strips (E-test) or agar and broth microdilution methods used by reference laboratories [20, 35]. Testing by gradient strips is relatively simple but costly. Recently, a standardized disc diffusion method for the susceptibility testing of *Bacteroides* spp. and other 4 important anaerobic species and genera has been compiled and published by EUCAST in EUCAST Clinical Breakpoint

Tables v. 12.0. The present recommendation do not split anaerobes on Gram positive and Gram negative but determines clinical breakpoints in species-specific way. The most critical factor for this method is the time of incubation which cannot exceed 18+/-2 h [12].

What is worth noticing, anaerobic bacteria from blood samples do not always grow in monoculture. Tan et al. [57] reports that 57% of anaerobic bacteraemia were caused by a combination of microbes. Most frequently, other anaerobes (29%) and *Enterobacterales* bacilli (25%) were isolated. Other researchers report that in about 13–38% of cases, aerobic microorganisms were also present [11, 24, 28, 36, 57, 62].

## 5. Treatment of anaerobic bacteraemia

Carbenicillin, piperacillin, and ticarcillin are generally active against anaerobes but are considered suboptimal for infections involving *B. fragilis*. The  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combination class of antibiotics still remains very active against *B. fragilis*. An exception is *P. distasonis* which is resistant to ampicillin/sulbactam [56]. Carbapenems have very good activity against BFG and other anaerobes. Tigecycline and tetracycline antibiotics are slightly less active than carbapenems and the  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor agents against *B. fragilis* [46].

Clindamycin was once a preferred antimicrobial agent for anaerobic infections including *B. fragilis* bacteraemia, but resistance has emerged with some *B. fragilis* strains. According to Sanford Guide clindamycin is a non-recommended agent, as resistance is likely to be present [46]. The same situation refers to moxifloxacin which was previously the preferred agent in the fluoroquinolone class for infections involving BFG. Recently resistance rates of 57 % to *B. fragilis* have been reported [55]. As for the fluoroquinolone only delafloxacin is active against BFG [46]. Metronidazole continue to be the most active agents against BFG [56].

Therefore, metronidazole, carbapenems and  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations are still recommended to empirical therapy of anaerobic infections [55]

Antibiotic selection in anaerobic infections including bacteraemia is generally made empirically based on susceptibility test results from sentinel laboratories or literature reports. Empirical therapy in these infections depends on the clinical condition of the patient and the location of potential primary infection. When the source of bacteraemia is an extravascular site, surgical intervention and drainage are necessary to prevent the continuance of bacteraemia and to reduce the time of therapy. The location also depends on the duration of treatment, ranging from 10 days to 3 months. Knowledge of the antibiotic sensitivity profiles of anaerobic



infections in individual hospitals/wards may be crucial in the choice of empirical therapy. Tan et al. [57] describe that the most commonly used empirical antibiotic therapy in *Bacteroides* bacteraemia were  $\beta$ -lactam with  $\beta$ -lactam inhibitor (amoxicillin/clavulanic acid or piperacillin/tazobactam) (44%), metronidazole (10%) and carbapenems (8.8%). Treatment of the majority of patients (72.65%) started with an appropriate initial antibiotic therapy. Sixteen percent of patients received antibiotics without anti-anaerobic activity.

Nguyen et al. [37] conducted a prospective observational study of 128 cases of bacteraemia involving BFG and presented that, in view of the increasing antibiotic resistance in these microbes. The conclusion of the study points that antibiotics traditionally used in empirical treatment, such as piperacillin with tazobactam or metronidazole, may be proven ineffective. They presented that clinical failure and mortality were more common in patients who did not receive a properly selected antibacterial agent.

## 6. Development of resistance to recognised antimicrobial agents in strains of *Bacteroides* spp.

The problem of antibiotic resistance, which is on the rise also among anaerobes, is particularly pronounced in BFG and makes it difficult to choose a reliable empirical therapy. Although ineffectiveness of metronidazole against *Bacteroides* spp. bacilli is rare, cases of resistance are reported increasingly. Essentially, non-prudent use of metronidazole can be held responsible for this phenomenon. One of the mechanisms of resistance is the production of 5-nitroimidazole nitroreductases, encoded by genes *nim*, which can be present in a “silent genes” form, which may not undergo expression [1, 3, 10, 31].

Clindamycin resistance of *Bacteroides* spp. is mainly associated with the production of adenylyl-N-methyltransferase 23S rRNA, encoded by *erm* genes. The proportion of clindamycin-resistant strains has steadily increased over the past few decades [26, 33, 45, 47, 65].

As regards resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics, the production of different classes of  $\beta$ -lactamases (cephalosporinase, carbapenemase) is of the greatest importance. The  $\beta$ -lactamase most commonly found in *Bacteroides* spp. is CepA (Cephalosporinase of class A), encoded by the chromosomal *cep* gene, and CfxA cephamycinase (Cefoxitin resistance class A), a product of the *cfxA* gene [40, 52]. Sometimes the bacilli produce CfiA carbapenemase encoded by the *cfiA* gene [16, 44, 52, 58], but not all strains with the *cfiA* gene are resistant to carbapenems. Similarly to the *nim* genes, those are also “silent” and are not always expressed. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics may also be associ-

ated with a decrease in the permeability of these drugs through the outer membrane, as well as changes in the qualitative and quantitative composition of penicillin-binding proteins (PBPs) [47, 53]. Some authors suggest that when choosing carbapenems for empirical treatment, imipenem should be preferred, as its MICs were lower than MIC of doripenem and meropenem [22, 50].

Infections caused by multidrug-resistant (MDR) strains of *Bacteroides* spp. are still rare, but can cause serious therapeutic problems and are often fatal. The definition of MDR strains refers to aerobic bacteria resistant to at least three antibiotics from different groups. This condition may lead to overuse of this term when referring to anaerobes because *Bacteroides* isolates are often resistant to antibiotics from several groups, e.g. moxifloxacin, clindamycin and various beta-lactams. As Dumont et al. [11] suggest, the criteria for MDR for bacteria of the genus *Bacteroides* should be established with a distinction between less (e.g. to moxifloxacin, clindamycin) and greater resistance (to metronidazole, carbapenems). The literature describes cases of MDR infections [21]. The first publication on the MDR strain of *B. fragilis* dates back to 1995 from the United Kingdom (a patient with complications after gynaecological surgery) [59]. Since then, many researchers have described cases of bacteraemia caused by MDR-*Bacteroides* with different phenotypes and genotypes of antibiotic resistance. Most of the cases involved primary infections in the abdominal cavity, e.g. pancreatitis [64], a condition after gastric resection [23] or colorectal cancer [2, 8, 19, 49].

Ogane et al. [38] presented the antimicrobial susceptibility of 50 isolates of *B. fragilis* originated from blood samples from patients hospitalized in two hospitals in Japan between 2014 and 2019. Isolates were more sensitive to piperacillin with tazobactam (94% susceptible) than ampicillin/sulbactam (70% susceptible). Ninety six percent of isolates were sensitive to imipenem, while 90% were sensitive to meropenem and doripenem.

In Dumont et al. [11], BFG isolates were sensitive to piperacillin with tazobactam (97%), amoxicillin with clavulanic acid (92.5%) and imipenem (98.5%). According to the published studies sensitivity to clindamycin and moxifloxacin is significantly rare and occurs in 68% and 64% of isolates [38] and in 50.8% and 58.2% [11] respectively. Similar results are presented by other researchers [30, 57, 63]. Increasing resistance to clindamycin is observed in Europe [17, 42] including Poland [26]. The results were confirmed in study covering 8 medical centres. In the study 1957 isolates collected for 4 years (2008–9) were analysed. Resistance rates ranging 60% have been found for clindamycin and even higher above 80% to moxifloxacin, resistance for tigecycline was on the level 5.4%. For carbapenems, resistance of *B. fragilis* was 1.1–2.5%. *B. fragilis* isolate

resistant to all antibiotics, with the exception of metronidazole, was also identified [57]. It was shown in one study, that among 67 *Bacteroides* spp. isolates only one, *B. fragilis* was resistant to metronidazole (1.5%) [11] and in a pool of 116 isolates also one, *Parabacteroides distasonis*, was resistant to metronidazole (1%). Alarming reports come from Pakistan including metronidazole resistance rate of 17.5% d [48].

To sum up, carbapenems and metronidazole should be considered the most active drugs to be used in the empirical therapy of anaerobic bacteraemia. The importance of the problem of strain resistance into these two antibiotics is even greater since the occurrence of such resistance is particularly related to the outcome of treatment and mortality in anaerobic bacteraemia [51]. Therefore, the collection of epidemiological data at local and global level, before treating patients with bacteraemia, can play an important role not only in public health but also in improving treatment outcomes [37].

## 7. Summary

Anaerobic bacteria remain an important cause of blood infections, mainly when it comes to elderly people with comorbidities. Most of them are caused by Gram-negative bacilli of the *Bacteroides* genus, which are a part of the natural human microflora. The increasing resistance to antibiotics among anaerobic bacteria prompts monitoring of the drug sensitivity profile in individual hospitals and wards. The development of MDR is worrying as it also affects broad-spectrum antibiotics. Therefore, in the case of bacteraemia, the determination of drug sensitivity should be a necessity. Rapid microbial diagnosis, targeted therapy and surgical treatment of a possible source of infection are crucial for prognosis improvement.

### Conflict of Interests

Edyta Podsiadły is a member of Advancements of Microbiology editorial team. Editor E. Podsiadły declares that she did not exert any influence on decision-making process of the editorial committee during the preparation of this work.

## References

- Alauzet C., Lozniewski A., Marchandin H.: Metronidazole resistance and *nim* genes in anaerobes: A review. *Anaerobe*, **55**, 40–53 (2019)
- Ank N., Sydenham T.V., Iversen L.H., Justesen U.S., Wang M.: Characterisation of a multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* isolate recovered from blood of a patient in Denmark using whole-genome sequencing. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **46**, 117–120 (2015)
- Baaity Z., Jamal W., Rotimi V.O., Burián K., Leitsch D., Somogyvári F., Nagy E., Sóki J. Molecular characterization of metronidazole resistant *Bacteroides* strains from Kuwait. *Anaerobe*, doi: 10.1016/j.anaerobe.2021.102357 (2021)
- Brook I.: Bacteraemia due to anaerobic bacteria in newborns. *J. Perinatol.* **10**, 351–356 (1991)
- Brook I.: The role of anaerobic bacteria in bacteraemia. *Anaerobe*, **16**, 183–189 (2010)
- Brook I.: Spectrum and treatment of anaerobic infections. *J. Infect. Chemother.* **22**, 1–13 (2016)
- Brook I., Wexler H.M., Goldstein E.J.C.: Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum and Susceptibility Testing. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 526–546 (2013)
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*-Seattle, Washington, 2013. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **62**, 694–696 (2013)
- Cobo F., Aliaga L., Expósito-Ruiz M., Navarro-Mari J.M.: Anaerobic bacteraemia: A score predicting mortality. *Anaerobe*, **64**, doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102219 (2020)
- Diniz C.G.: Differential gene expression in a *Bacteroides fragilis* metronidazole-resistant mutant. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 100–108 (2004)
- Dumont Y., Bonzon L., Michon A.L., Carriere C., Didelot M.N., Laurens C., Renard B., Veloo A.C.M., Godreuil S., Jean-Pierre H.: Epidemiology and microbiological features of anaerobic bacteraemia in two French University hospitals. *Anaerobe*, **64**, doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102207 (2020)
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Clinical breakpoints – breakpoints and guidance v 12.0 January 1, 2022, <https://www.eucast.org> (01.02.2022)
- Fenner L., Widmer A.F., Straub C., Frei R.: Is the incidence of anaerobic bacteraemia decreasing? Analysis of 114,000 blood cultures over a ten-year period. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2432–2434 (2008)
- Finegold S.M., George W.L., Mulligan M.E.: Anaerobic infections part II. *Dis. Mon.* **31**, 1–97 (1985)
- Gajdács M., Urbán E.: Relevance of anaerobic bacteremia in adult patients: A never-ending story? *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **5**, 64–75 (2020)
- Gao Q., Wu S., Xu T., Zhao X., Huang H., Hu F.: Emergence of carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis* in China. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **53**, 859–863, (2019)
- Genzel G.H., Stubbings W., Stingu C.S., Labischinski H., Schumann R.: Activity of the investigational fluoroquinolone fleroxacin and seven other antimicrobial agents against 114 obligately anaerobic bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **44**, 420–423 (2014)
- Grohs P., Mainardi J.L., Podglajen I., Hanras X., Eckert C., Buu-Hoi A., Varon E., Gutmann L.: Relevance of Routine Use of the Anaerobic Blood Culture Bottle. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2711–2715 (2007)
- Hartmeyer G.N., Sóki J., Nagy E., Justesen U.S.: Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* group on the rise in Europe? *J. Med. Microbiol.* **61**, 1784–1788 (2012)
- Ho P.L., Yau C.Y., Ho L.Y., Lai E.L., Liu M.C., Tse C.W., Chow K.H.: Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group organisms in Hong Kong by the tentative EUCAST disc diffusion method. *Anaerobe*, **47**, 51–56 (2017)
- Kaeuffer C., Ruge T., Diancourt L., Romain B., Ruch Y., Jaulhac B., Boyer P.H. First Case of Bacteraemia Due to Carbapenem-Resistant *Bacteroides faecis*. *Antibiotics (Basel)*. **19**, doi: 10.3390/antibiotics10030319 (2021)
- Karlowsky J.A., Walkty A.J., Adam H.J., Baxter M.R., Hoban D.J., Zhanel G.G.: Prevalence of Antimicrobial Resistance among Clinical Isolates of *Bacteroides fragilis* Group in Canada in 2010–2011: CANWARD Surveillance Study. *Antimicrob. Chemother.* **56**, 1247–1252 (2012)

23. Katsandri A., Papaparaskevas J., Pantazatou A., Petrikkos G.L., Thomopoulos G., Houhoula D.P., Avlami A.: Two Cases of Infections Due to Multidrug-Resistant *Bacteroides fragilis* Group Strains. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3465–3467 (2006)
24. De Keukeleire S., Wybo I., Naessens A., Echahidi F., Van der Beken M., Vandoorslaer K., Vermeulen S., Piérard D.: Anaerobic bacteraemia: A 10-year retrospective epidemiological survey. *Anaerobe*, **39**, 54–59 (2016)
25. Kierzkowska M., Majewska A., Dobrzaniecka K., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk A., Chmura A., Durlik M., Deborska-Materkowska D., Paczek L., Młynarczyk G.: Blood Infections in Patients Treated at Transplantation Wards of a Clinical Hospital in Warsaw. *Transplant. Proc.* **46**, 2589–2591 (2014)
26. Kierzkowska M., Majewska A., Młynarczyk G.: Trends and Impact in Antimicrobial Resistance Among *Bacteroides* and *Parabacteroides* Species in 2007–2012 Compared to 2013–2017. *Microb. Drug Resist.* **26**, 1452–1457 (2020)
27. Kierzkowska M., Majewska A., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk G.: Pałeczki gram-ujemne beztlenuowo rosnące – diagnostyka i znaczenie kliniczne. *Post. Mikrobiol.* **55**, 91–98 (2016)
28. Kim J., Lee Y., Park Y., Kim M., Choi J.Y., Yong D., Jeong S.H., Lee K.: Anaerobic Bacteraemia: Impact of Inappropriate Therapy on Mortality. *Infect. Chemother.* **48**, 91–98 (2016)
29. Lassmann B., Gustafson D.R., Wood C.M., Rosenblatt J.E.: Reemergence of anaerobic bacteraemia. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 895–900 (2007)
30. Lee Y., Park Y.J., Kim M.N., Uh Y., Kim M.S., Lee K.: Multicenter study of antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in Korea in 2012. *Ann. Lab. Med.* **35**, 479–786 (2015)
31. Löfmark S., Edlund C., Nord Carl E.: Metronidazole Is Still the Drug of Choice for Treatment of Anaerobic Infections. *Clin. Infect. Dis.* **50**, (2010)
32. Mukhopadhyay S., Puopolo K.M.: Relevance of Neonatal Anaerobic Blood Cultures: New Information for an Old Question. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* **17**, 126–127 (2018)
33. Nagy E.: Anaerobic infections: update on treatment considerations. *Drugs*, **70**, 841–858 (2010)
34. Nagy E., Urbán E.: Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 371–379 (2011)
35. Nagy E., Boyanova L., Justesen U.S.: ESCMID Study Group of Anaerobic Infections. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 1139–1148 (2018)
36. Ngo J.T., Parkins M.D., Gregson D.B., Pitout J.D.D., Ross T., Church D.L., Laupland K.B.: Population-based assessment of the incidence, risk factors, and outcomes of anaerobic bloodstream infections. *Infection*, **41**, 41–48 (2013)
37. Nguyen M.H., Yu V.L., Morris A.J., McDermott L., Wagener M.W., Harrell L., Snyderman D.R.: Antimicrobial Resistance and Clinical Outcome of *Bacteroides* Bacteraemia: Findings of a Multicenter Prospective Observational Trial. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 870–876 (2000)
38. Ogane K., Maeda T. et al: Antimicrobial susceptibility and prevalence of resistance genes in *Bacteroides fragilis* isolated from blood culture bottles in two tertiary care hospitals in Japan. *Anaerobe*, **64**, doi: 10.1016/j.anaerobe.2020.102215 (2020)
39. Patrick S., Duerden B.I.: Non-Sporing Gram-Negative Anaerobes (in) Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Second Edition, Eds. Stephen H. Gillespie S.H., Hawkey P.M., John Wiley & Sons, 2006, 541–556
40. Philippon A., Slama P., Dény P., Labia R.: A Structure-Based Classification of Class A  $\beta$ -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 29–59 (2016)
41. Robert R., Deraignac A., Le Moal G., Ragot S., Grollier G.: Prognostic factors and impact of antibiotherapy in 117 cases of anaerobic bacteraemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 671–678 (2008)
42. Rodloff A.C., Dowzicky M.J.: In vitro activity of tigecycline and comparators against a European collection of anaerobes collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) 2010–2016. *Anaerobe*, **51**, 78–88 (2018)
43. Rodrigues C., Siciliano R.F., Zeigler R., Strabelli T.M.: *Bacteroides fragilis* endocarditis: A case report and review of literature. *Braz. J. Infect. Dis.* **16**, 100–104 (2012)
44. Roh K.H., Kim S., Kim C.K., Yum J.H., Kim M.S., Yong D., Jeong S.H., Lee K., Kim J.M., Chong Y.: New *cfiA* variant and novel insertion sequence elements in carbapenem-resistant *Bacteroides fragilis* isolates from Korea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **66**, 343–348 (2010)
45. Rong S.M.M., Rodloff A.C., Stingl C.S.: Diversity of antimicrobial resistance genes in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains isolated in Germany. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **24**, 328–334 (2021)
46. Sanford Guide: Antibacterial agents: Spectra of Activity, <https://webedition.sanfordguide.com/en> (01.02.2022)
47. Schuetz A.N.: Antimicrobial Resistance and Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Clin. Infect. Dis.* **59**, 698–705 (2014)
48. Shafquat Y., Jabeen K., Farooqi J., Mehmood K., Irfan S., Hasan R., Zafar A.: Antimicrobial susceptibility against metronidazole and carbapenem in clinical anaerobic isolates from Pakistan. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* **14**, doi: 10.1186/s13756-019-0549-8 (2019)
49. Sherwood J.E., Fraser S., Citron D.M., Wexler H., Blakely G., Jobling K., Patrick S.: Multi-drug resistant *Bacteroides fragilis* recovered from blood and severe leg wounds caused by an improvised explosive device (IED) in Afghanistan. *Anaerobe*, **17**, 152–155 (2011)
50. Shimura S., Wada Y. et al: Antimicrobial susceptibility surveillance of obligate anaerobic bacteria in the Kinki area. *J. Infect. Chemother.* **25**, 837–844 (2019)
51. Snyderman D.R., Jacobus N.V., McDermott L.A., Goldstein E.J.C., Harrell L., Jenkins S.G., Newton D., Patel R., Hecht D.W.: Trends in antimicrobial resistance among *Bacteroides* species and *Parabacteroides* species in the United States from 2010–2012 with comparison to 2008–2009. *Anaerobe*, **43**, 21–26 (2017)
52. Sóki J.: Extended role for insertion sequence elements in the antibiotic resistance of *Bacteroides*. *World J. Clin. Infect. Dis.* **3**, 1–12 (2013)
53. Sóki J., Gonzalez S.M., Urban E., Nagy E., Ayala J.A.: Molecular analysis of the effector mechanisms of cefoxitin resistance among *Bacteroides* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2492–500 (2011)
54. Song Y.L., Liu C.X., McTeague M., Finegold S.M.: “*Bacteroides nordii*” sp. nov. and “*Bacteroides salyersae*” sp. nov. Isolated from Clinical Specimens of Human Intestinal Origin. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5565–5570 (2004)
55. Snyderman D.R., Gorbach S.L. et al: Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005–2007). *Clin. Infect. Dis.* **50**, 26–33 (2010)
56. Snyderman D.R., Hecht D.W. et al: Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006–2009. *Anaerobe*, **17**, 147–151 (2011)
57. Tan T.Y., Ng L.S.Y., Kwang L.L., Rao S., Eng L.C.: Clinical characteristics and antimicrobial susceptibilities of anaerobic bacteraemia in an acute care hospital. *Anaerobe*, **43**, 69–74 (2017)
58. Toprak N.U., Uzunkaya O.D., Sóki J., Soyletir G.: Susceptibility profiles and resistance genes for carbapenems (*cfiA*) and

- metronidazole (*nim*) among *Bacteroides* species in a Turkish University Hospital. *Anaerobe*, **18**, 169–171 (2012)
59. Turner P., Edwards R., Weston V., Ispahani P., Greenwood D., Gazis A.: Simultaneous resistance to metronidazole, co-amoxiclav, and imipenem in clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. *The Lancet*, **345**, 1275–1277 (1995)
  60. Umemura T., Hamada Y., Yamagishi Y., Suematsu H., Mikamo H.: Clinical characteristics associated with mortality of patients with anaerobic bacteraemia. *Anaerobe*, **39**, 45–50 (2016)
  61. Urbán E.: Five-year retrospective epidemiological survey of anaerobic bacteraemia in a University Hospital and Review of the Literature. *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*, **2**, 140–147 (2012)
  62. Vena A., Muñoz P., Alcalá L., Fernandez-Cruz A., Sanchez C., Valerio M., Bouza E.: Are incidence and epidemiology of anaerobic bacteraemia really changing? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 1621–1629 (2015)
  63. Wang F.D., Liao C.H., Lin Y.T., Sheng W.H., Hsueh P.R.: Trends in the susceptibility of commonly encountered clinically significant anaerobes and susceptibilities of blood isolates of anaerobes to 16 antimicrobial agents, including fidaxomicin and rifaximin, 2008–2012, northern Taiwan. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 2041–2052 (2014)
  64. Wareham D.W., Wilks M., Ahmed D., Brazier J.S., Millar M.: Anaerobic Sepsis Due to Multidrug-Resistant *Bacteroides fragilis*: Microbiological Cure and Clinical Response with Linezolid Therapy. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 67–68 (2005)
  65. Wexler H.M.: *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 593–621 (2007)
  66. Wexler H.M.: The Genus *Bacteroides* (in) *The Prokaryotes*, eds. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F., Springer, Berlin, 2014, 459–484
  67. Yarbrough M.L., Wallace M.A., Burnham C.D.: Comparison of microorganism detection and time to positivity in pediatric and standard media from three major commercial continuously monitored blood culture systems. *J. Clin. Microbiol.* **59**, e00429–21 (2021)
  68. Yoshino Y., Kitazawa T., Ikeda M., Tatsuno K., Yanagimoto S., Okugawa S., Ota Y., Yotsuyanagi H.: Clinical features of *Bacteroides* bacteraemia and their association with colorectal carcinoma. *Infection*, **40**, 63–67 (2012)
  69. Zafar H., Saier M.H. Jr. Gut *Bacteroides* species in health and disease. *Gut Microbes*, **13**, 1–20 (2021)
  70. Zahar J.R., Farhat H., Chachaty E., Meshaka P., Antoun S., Nitenberg G. Incidence and clinical significance of anaerobic bacteraemia in cancer patients: a 6-year retrospective study. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**, 724–729 (2005)

## BAKTERIE MODYFIKOWANE GENETYCZNIE – PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA W PROFILAKTYCE, DIAGNOSTYCE I TERAPII

Barbara Macura<sup>1</sup>, Aneta Kiecka<sup>2\*</sup>, Marian Szczepanik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Nauk o Zdrowiu, Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa, Zakład Biologii Rozwoju Człowieka

<sup>2</sup>Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Wydział Nauk o Zdrowiu, Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa, Katedra Biologii Medycznej

Wpłynęło w czerwcu, zaakceptowano we wrześniu 2021 r.

**Streszczenie:** Prawidłowy stan mikrobioty warunkuje wiele efektów prozdrowotnych w organizmie człowieka. Zaburzenia w równowadze mikrobioty mogą być regulowane poprzez dostarczanie do organizmu probiotyków. Niestety, ich podawanie wiąże się z pewnymi ograniczeniami. Probiotyki są głównie wykorzystywane w profilaktyce wielu schorzeń, a w terapii wykazują jedynie działanie wspomagające. Ponadto probiotyki w czasie obróbki technologicznej oraz w czasie przechodzenia przez przewód pokarmowy mogą tracić swoją biologiczną aktywność. Ograniczenia te mogą zostać pokonane dzięki wprowadzeniu modyfikacji genetycznych do komórek bakteryjnych. Aktualne badania wykazują, że takie modyfikacje mogą zmienić właściwości biologiczne bakterii i znacznie rozszerzyć zakres ich wykorzystania w medycynie o właściwości diagnostyczne i terapeutyczne.

1. Wprowadzenie. 2. Rola prawidłowej mikrobioty w organizmie człowieka. 3. Probiotyki naturalne w profilaktyce i terapii. 4. Probiotyki naturalne – korzyści i ograniczenia. 5. Modyfikacje genetyczne bakterii – perspektywy i zagrożenia. 6. Bakterie modyfikowane genetycznie w diagnostyce i terapii. 7. Wykorzystanie bakterii modyfikowanych genetycznie w medycynie. 8. Podsumowanie

### GENETICALLY MODIFIED BACTERIA – THE PERSPECTIVE OF APPLICATION IN PREVENTION, DIAGNOSTICS AND THERAPY

**Abstract:** The microbiota plays an important role in human health. Disturbance in microbiota composition can be compensated by administration of probiotic microorganisms. However, their application is associated with some constraints. Probiotics are commonly used in disease prevention, whereas they play only a supportive role in disease therapy. Moreover, probiotics during technological processes and gastrointestinal tract passage may lose their beneficial properties. These constraints can be overcome by genetic modification of bacteria. The current research shows that genetically modified bacteria can have new biological properties and can be used in diagnostics and therapy.

1. Introduction. 2. The role of microbiota in human body. 3. Natural probiotics in disease prevention and therapy. 4. Natural probiotics – advantages and limitations. 5. Engineering bacteria – prospects and threats. 6. Genetically modified bacteria in diagnostics and therapy. 7. Usage of genetically modified bacteria in medicine. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** bakterie modyfikowane genetycznie, farmabiotyki, mikrobiota, probiotyki

**Keywords:** genetically modified bacteria, pharmabiotics, microbiota, probiotics

## 1. Wprowadzenie

Biologia syntetyczna to nowa dziedzina nauki, w której organizmy żywe są genetycznie programowane do wykonywania określonych zadań. Organizmy takie planuje się zastosować między innymi w medycynie, rolnictwie, energetyce, przemyśle oraz badaniach podstawowych w biologii. Modyfikacje genetyczne mogą dotyczyć zarówno bakterii, powszechnie uznanych za posiadające właściwości probiotyczne (na przykład bakterii z rodzaju *Lactobacillus*), aby wzmocnić to działanie lub bakterii, które takich właściwości nie posiadają, ale dzięki modyfikacjom genetycznym mogą uzyskać pożądane właściwości prozdrowotne. Co więcej, planuje się wykorzystać bakterie modyfikowane

genetycznie w profilaktyce, diagnostyce i terapii wielu chorób, między innymi tych związanych z zaburzeniami funkcjonowania przewodu pokarmowego oraz w chorobach nowotworowych [13, 24, 51, 52].

## 2. Rola prawidłowej mikrobioty w organizmie człowieka

Terminem mikrobiota określa się wszystkie drobnoustroje występujące w organizmie ludzkim w rejonach pokrytych komórkami nabłonkowymi – w obrębie błon śluzowych oraz na skórze człowieka [15, 48]. Szczególnie dużo drobnoustrojów bytuje w przewodzie pokarmowym i w kobiecej pochwie [6, 44]. Drobnoustroje

\* Autor korespondencyjny: mgr Aneta Kiecka, Katedra Biologii Medycznej, Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa, Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kopernika 7a, 31-034; tel. 12 422 99 49; e-mail: aneta.kiecka@uj.edu.pl

w jelicie grubym to w większości bakterie bezwzględnie beztlenowe z rodzaju *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Butyrovibrio*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* oraz *Bifidobacterium*. W jelicie grubym zidentyfikowano także bakterie tlenowe i względnie beztlenowe: Gram-ujemne pałeczki należące do rodziny *Enterobacteriaceae*, pałeczki Gram-dodatnie *Lactobacillus*, ziarniaki z rodzaju *Enterococcus* i *Streptococcus* oraz nieliczne grzyby *Candida* spp. [15]. Skład ilościowy i jakościowy mikrobioty u poszczególnych osób może znacznie się różnić, jednak główne rodzaje bakterii jelitowych, obecne u wszystkich ludzi, stanowią około 30% całej mikrobioty jelit [29]. Warto zaznaczyć, iż w początkowym odcinku przewodu pokarmowego, jamie ustnej, wykryto około 700 gatunków z 9 typów bakterii, a w jelicie grubym około 800 gatunków z 9 typów bakterii. Liczba mikroorganizmów w jamie ustnej wynosi około  $10^8$  jtk (jednostka tworząca kolonię) na 1 gram treści i przeważają bakterie z rodzajów *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* oraz *Fusobacterium*. Z kolei bakteriami dominującymi w pochwie są bakterie z rodzaju *Lactobacillus* [29]. Fizjologiczna rola mikrobioty jest szeroka i obejmuje wiele aspektów funkcjonowania organizmu człowieka. Najważniejsze efekty zdrowotne wynikające z oddziaływania prawidłowej mikrobioty na organizm człowieka przedstawiono w tabeli I [15, 20, 23, 29, 40].

Określenie „dysbioza” oznacza zaburzenie składu, proporcji oraz funkcji drobnoustrojów tworzących mikrobiotę [8]. Konsekwencją dysbiozy jest rozluźnienie połączeń ścisłych między enterocytami i zwiększenie przepuszczalności nabłonka jelitowego (leaky gut syndrome), co może sprzyjać między innymi chronicznym stanom zapalnym bezpośrednio pod warstwą komórek nabłonkowych (mikrozapalenie), endotoksemii, jak również zmianom chorobowym w odległych obszarach ustroju, zaliczanym do grupy chorób niezakaźnych (non-communicable diseases) [2]. Zatem dysbioza oraz uszkodzenie bariery nabłonkowej stanowią czynnik sprzyjający rozwojowi takich schorzeń jak: nieswoiste choroby zapalne jelit (IBD, z ang. inflammatory bowel disease), zaburzenia czynnościowe przewodu pokarmowego (biegunki, zaparcia, wzdęcia), zespół jelita drażliwego, choroby alergiczne, choroby autoimmunizacyjne, cukrzyca typu drugiego (T2D), otyłość, zespół metaboliczny, choroba tłuszczeniowa wątroby, miażdżyca, choroby neurodegeneracyjne, depresja, zaburzenia ze spektrum autyzmu, choroba Parkinsona, choroba Alzheimera oraz schizofrenia [2]. Najważniejsze czynniki, sprzyjające rozwojowi dysbiozy to dieta, niektóre choroby oraz stosowane leki [4, 34, 49].

Jednym ze sposobów utrzymania równowagi w składzie mikrobioty człowieka jest stosowanie probiotyków. Probiotyki to żywe mikroorganizmy, które podawane

Tabela I  
Efekty prozdrowotne prawidłowej mikrobioty człowieka

Zjawisko	Efekt prozdrowotny
normalizacja mikrobioty jelita	• ochrona przed kolonizacją patogenami
	• zapobieganie infekcjom jelit
	• zapobieganie bieguncce
	• przyspieszenie wymiany enterocytów
	• stabilizacja bariery jelitowej
normalizacja mikrobioty pochwy	• ochrona przed kolonizacją patogenami
	• zapobieganie zakażeniom pochwy w tym również infekcjom wirusowym (HIV/HPV)
efekty metaboliczne	• ułatwienie metabolizmu laktozy
	• synteza krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) i niektórych witamin
	• trawienie długołańcuchowych węglowodanów i błonnika pokarmowego
	• uczestnictwo w przemianach kwasów żółciowych i ich wydaleniu
	• wpływ na pasaż jelitowy
	• detoksykacja/usuwanie ksenobiotyków i kancerogenów
	• obniżenie poziomu toksycznych i mutagennych substancji w jelicie
	• redukcja ryzyka rozwoju otyłości, cukrzycy typu 2 i zespołu metabolicznego oraz raka jelita grubego
immunomodulacja	• zapewnienie prawidłowego rozwoju układu odpornościowego
	• regulacja odpowiedzi immunologicznej
wpływ na funkcjonowanie centralnego układu nerwowego	• produkcja neurotransmiterów i neuromodulatorów [kwas gamma-aminomasłowy (GABA), norepinefryna, serotonina, dopamina, acetylocholina, kynurenina]
	• zapobieganie nieprawidłowościom w funkcjonowaniu układu nerwowego (oś jelitowo-mózgowa)

w odpowiedniej ilości wywierają korzystny wpływ na zdrowie gospodarza. Metody sprzyjające uzyskaniu bioróżnorodności mikrobioty obejmują nie tylko stosowanie probiotyków, ale również wykorzystanie prebiotyków, synbiotyków i postbiotyków. Prebiotyki to składniki żywności, między innymi fruktooligosacharydy, inulina czy skrobia oporna, które wspierają rozwój bakterii probiotycznych, przykładowo bakterii kwasu mlekowego (*Lactobacillus*), w przewodzie pokarmowym. Probiotyki i prebiotyki podawane łącznie określa się jako synbiotyki [15, 40]. Terminem postbiotyki określamy substancje, które posiadają korzystne właściwości biologiczne dla gospodarza, stanowiące konkretne metabolity bakteryjne (np. kwas mlekowy), składowe ścian komórkowych określonych mikroorganizmów, które mogą promować odpowiedź immunologiczną, jak również niektóre białka obecne w lizatach probiotycznych szczepów [17, 37].

### 3. Probiotyki naturalne w profilaktyce i terapii

Właściwości prozdrowotne probiotyków w profilaktyce i terapii wielu schorzeń są powszechnie znane. Do najczęściej stosowanych drobnoustrojów probiotycznych należą bakterie z rodzajów *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* oraz niepatogenne grzyby drożdżopodobne *Saccharomyces boulardii* [15].

Zgodnie z wytycznymi ISAPP (The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) wyróżniono trzy główne mechanizmy działania probiotyków pod względem częstości ich występowania wśród badanych szczepów. Powszechnie występujące mechanizmy (dotyczą rodzaju bakterii) obejmują ochronę przed kolonizacją przez patogeny, wytwarzanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA, short chain fatty acids), stabilizację i normalizację mikrobioty jelitowej, wpływ na zwiększoną wymianę enterocytów oraz regulację pasażu jelitowego. Często występujące mechanizmy (dotyczą gatunku bakterii) polegają na wytwarzaniu witamin, stabilizacji bariery jelitowej, antagonizmie w stosunku do patogenów, metabolizmie soli kwasów żółciowych, aktywności enzymatycznej i neutralizacji karcynogenów. Rzadko występujące mechanizmy (dotyczą szczepu bakterii) to modulacja odpowiedzi immunologicznej, wytwarzanie specyficznych substancji bioaktywnych oraz działanie endokrynne i neurogenne. Różne szczepy bakterii wykazują nieco inne właściwości probiotyczne, a więc należy dobrać konkretny szczep probiotyczny do leczenia konkretnego schorzenia [11, 15, 40].

Probiotyki naturalne, będące niezmodyfikowanymi genetycznie drobnoustrojami (PN), są wykorzystywane między innymi w zapobieganiu i leczeniu biegunki poantybiotykowej, zapobieganiu biegunce spowod-

wanej *Clostridium difficile* oraz wspomaganiu leczenia w chorobie Leśniowskiego-Crohna, a także w zaburzeniach czynnościowych układu pokarmowego (np. zaparcia), zespole jelita drażliwego, niektórych schorzeniach wątroby, leczeniu i zapobieganiu atopowemu zapaleniu skóry, jak również profilaktyce infekcji układu moczowo-płciowego. PN są również wykorzystywane w zapobieganiu i wspomaganiu leczenia chorób o częściowym podłożu immunologicznym (na przykład atopowe zapalenie skóry czy nieswoiste zapalenie jelit) i nowotworowych, głównie poprzez regulację działania układu odpornościowego [15, 20, 40, 45]. Niektóre bakterie, takie jak np. niepatogenne szczepy *Escherichia coli* oraz *Enterococcus* ssp., również występujące naturalnie w przewodzie pokarmowym, biorą udział w „treningu” immunologicznym w tkance limficznej przewodu pokarmowego (GALT, gut-associated immune system), która stanowi część układu odpornościowego błon śluzowych (MALT, mucosa-associated immune system) [15]. Wykazano, że probiotyki i ich antygeny stymulują mechanizmy odporności wrodzonej oraz nabytej. Postuluje się także znaczenie PN w zapobieganiu i wspomaganiu leczenia stanów lękowych, depresji i innych zaburzeń psychiatrycznych, poprzez produkcję substancji neuroaktywnych [15, 20, 40, 45]. PN są również wykorzystywane we wspomaganiu leczenia takich schorzeń jak otyłość, cukrzyca typu 2 oraz dyslipidemia, poprzez produkcję substancji modyfikujących metabolizm pacjenta [20, 46].

W literaturze coraz częściej pojawia się również pojęcie probiotyków następnej generacji (NGP, next generation probiotics). Są to mikroorganizmy, dotychczas nie stosowane jako probiotyki, jednak wykazujące obiecujące właściwości zdrowotne dla człowieka. Do takich mikroorganizmów zalicza się obecnie między innymi *Prevotella copri* i *Christensenella minuta* – stwarzające możliwość wykorzystania ich w leczeniu oporności na insulinę, *Parabacteroides goldsteinii*, *Akkermansia muciniphila* i *Bacteroides thetaiotaomicron* – wskazujące na możliwość wykorzystania ich w leczeniu otyłości i oporności na insulinę, *Faecalibacterium prausnitzii* – wykazujący właściwości ochronne przed rozwojem chorób jelit, co wykazano u myszy, czy też *Bacteroides fragilis* – wykazujący działanie przeciwzapalne i antynowotworowe [9, 35, 38, 56].

### 4. Probiotyki naturalne – korzyści i ograniczenia

Korzyści płynące ze stosowania probiotyków naturalnych są wielorakie. W odróżnieniu od tradycyjnych leków podawanych doustnie PN dostarczają lokalnie substancje biologicznie aktywne bezpośrednio do zmienionych chorobowo tkanek, co skutkuje zwiększoną ich skutecznością przy jednoczesnym zmniejszeniu

ogólnoustrojowych skutków ubocznych. PN wytwarzają substancje biologicznie aktywne „na miejscu”, co eliminuje potrzebę stosowania kosztownych etapów oczyszczania leku po jego syntezie i umożliwia użycie niższej jego dawki [21, 24]. Przykładem są substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, takie jak: kwasy organiczne (obniżają pH), nadtlenek wodoru, związki systemu laktoperoksydazy, diacetyl czy bakteriocyny, a także witaminy z grupy B i K, hydrolazy (wpływające na metabolizm tłuszczów w wątrobie) czy SCFA i maślan (pełniące funkcje odżywcze w stosunku do komórek nabłonka jelita) [29].

Stosowanie PN wiąże się jednak z pewnymi ograniczeniami. PN charakteryzują się wysoką wrażliwością na czynniki fizyko-chemiczne. Większość szczepów probiotycznych ginie w temperaturze 60–85°C. Klasyczne metody uodparniania szczepów na trudne warunki procesów technologicznych polegają na poddaniu ich uprzedniemu działaniu sub-letalnego czynnika stresowego. Może to jednak prowadzić do uszkodzenia komórek i utraty żywotności kultur probiotycznych, prowadząc tym samym do zmniejszenia aktywności podawanego probiotyku [16, 19, 28]. Ponadto doustne przyjmowanie probiotyków jest związane z koniecznością ich przejścia przez żołądek i dwunastnicę, gdzie są narażone na działanie kwasu żołądkowego oraz enzymów trawiennych i żółci. Dopiero w jelicie krętym i okrężnicy panują korzystne dla nich warunki bytowe. Korzyści zdrowotne po zastosowaniu probiotyku w wielu przypadkach uzyskuje się tylko wtedy, gdy szczep probiotyczny dotrze do jelit w stanie metabolicznie aktywnym i w wystarczającej dawce. Trudno jest jednak określić, jaka dawka probiotyku dostaje się do jelit oraz czy jest ona wystarczająca dla osiągnięcia efektu biologicznego [3, 7, 28, 47, 54]. Wskaźniki przeżywalności dla wybranych szczepów oszacowano na 20–40%, przy czym głównymi przeszkodami w ich przeżyciu jest obecność kwasu solnego w żołądku i działanie soli żółciowych [7].

Cały czas poszukuje się nowych rozwiązań biotechnologicznych, które zapewnią ochronę probiotykom przed niekorzystnymi warunkami środowiska zewnętrznego i wewnętrznego oraz rozszerzą zakres ich wykorzystania [28, 47].

## 5. Modyfikacje genetyczne bakterii – perspektywy i zagrożenia

Próby modyfikacji genetycznych znanych probiotyków, jak i innych bakterii, które mogłyby w przyszłości pełnić szeroko pojętą rolę prozdrowotną, stają się obecnie jedną z dróg rozwoju nowoczesnej medycyny.

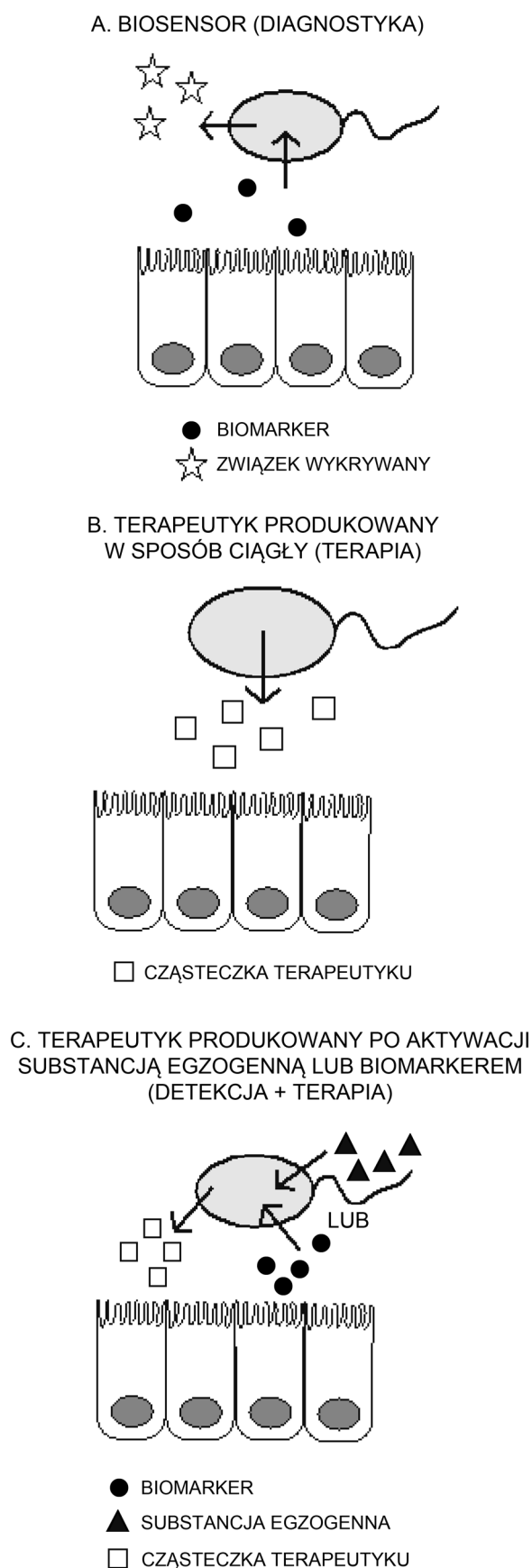
Wprowadzenie modyfikacji genetycznych do komórek bakterii probiotycznych umożliwia zdecydowane

podwyższenie ich odporności na warunki fizyko-chemiczne panujące podczas procesów technologicznych oraz w środowisku przewodu pokarmowego.

Przykładowo dowiedziono, że gen *betL* obecny u *Listeria monocytogenes*, warunkujący przetrwanie szczepów patogennych w trudnych warunkach, wprowadzony do genomu szczepu probiotycznego *Lactobacillus salivarius* UCC118, znacząco poprawia jego odporność na biotechnologiczne czynniki stresowe, jak na przykład wysoka temperatura. Gen *betL* koduje system transportu betainy. Betaina, która należy do grupy związków, zwanych osmoprotektantami, chroni cytozol przed utratą wody i stabilizuje białka. Podobne wyniki uzyskano po analogicznej modyfikacji genetycznej szczepu *Lactobacillus paracasei* [10, 19, 39]. Ponadto modyfikacja szczepu *Bifidobacterium breve* UCC2003 genem *betL* pozwoliła osiągnąć jego wysoką przeżywalność w kwaśnym środowisku żołądka. Uzyskane wyniki potwierdzono w podobnych doświadczeniach, klonując geny odpowiedzialne za przeżywalność dzikich szczepów w przewodzie pokarmowym, na przykład gen warunkujący odporność na żółć (*bile*), występujący naturalnie u *Listeria monocytogenes* [19, 39, 41].

W przyszłości modyfikacje genetyczne bakterii, nie tylko tych o obecnie znanych właściwościach probiotycznych, pozwolą również na rozszerzenie mechanizmów ich biologicznego działania i, co za tym idzie, rozszerzenie możliwości ich zastosowania w diagnostyce oraz terapii. Dobrze zdefiniowane szlaki genetyczne i sieci regulacyjne genów, mają spowodować niezawodność zmodyfikowanych bakterii w produkcji ściśle zdefiniowanych związków biologicznie aktywnych. Bakterie modyfikowane genetycznie (BMG) mogą produkować kilka substancji biologicznie aktywnych, w czasie, dawce i sekwencji możliwej do kontrowania. W przypadku PN mamy do czynienia raczej z nieokreśloną mieszaniną związków bioaktywnych, których efekty działania są trudne do oceny. Ciągłe modyfikacje BMG umożliwiają ich udoskonalanie, a co za tym idzie, ich skuteczność oraz liczba chorób, w leczeniu których można je stosować, również wzrośnie [24, 32, 42]. Ponadto BMG mogą docierać do miejsc w organizmie, które są nieosiągalne dla PN. Może to z kolei umożliwiać stosowanie niższych dawek leku i obniżyć prawdopodobieństwo wystąpienia skutków ubocznych u pacjenta [21]. Wreszcie BMG mogą być wykorzystywane do produkcji szczepionek. Po podaniu doustnym bakterii zmodyfikowanych genetycznie, zawierających w swym genomie gen kodujący określony antygen, dochodzi do jego ekspresji i rozwinięcia procesu immunizacji w organizmie gospodarza. Ten typ szczepionki jest odporny na warunki transportu i przechowywania, łatwy i higieniczny do podania pacjentowi, a raz wytworzony staje się stosunkowo tani w produkcji [14].





**Rys. 1. Funkcje bakterii modyfikowanych genetycznie**

(A) BMG pełniąca funkcję diagnostyczną. (B) BMG pełniąca funkcję terapeutyczną. (C) BMG pełniąca funkcje diagnostyczną i terapeutyczną (na podstawie [5]).

O ile bezpieczeństwo stosowania PN jest powszechnie uznane, to bezpieczeństwo stosowania BMG w diagnostyce i terapii chorób nie jest jednak już tak oczywiste. Jednym z postulowanych niebezpieczeństw jest wydostanie się BMG z przewodu pokarmowego pacjenta do środowiska zewnętrznego, gdzie mogłyby wywołać trudne do przewidzenia skutki. Mechanizmem zabezpieczającym przed takim zdarzeniem może być wprowadzenie do genomu BMG genów, których produkt białkowy kieruje komórkę na szlak apoptozy („automatyczne włączniki śmierci”). Gen ten ulega ekspresji po zmianie warunków środowiska, w którym znajdują się zmodyfikowane bakterie. Próbuje się również tak zmodyfikować genetycznie bakterie, aby nie były w stanie przeżyć w środowisku zewnętrznym, w którym brakuje określonej, niezbędnej dla ich przetrwania substancji (zjawisko auktotrofii). Pomimo, że skomplikowane układy genetyczne umożliwiają uwalnianie terapeutyku w odpowiednim organie, w stosownym do stanu zdrowotnego tkanki czasie i stężeniu, to jednak istnieje pewne niebezpieczeństwo rozregulowania tego systemu i związanych z tym komplikacji [5, 25]. BMG muszą cechować się określoną czułością i selektywnością w stosunku do wykrywanych substancji, być stabilne w różnych typach środowiska (m.in. dieta, mikrobiota gospodarza) oraz być niepodatne na mutacje [26, 36]. Poszukiwanie procedur i rozwiązań mających zapewnić maksymalne bezpieczeństwo stosowania farmabiotyków w medycynie jest czasochłonne i kosztowne [1].

## 6. Bakterie modyfikowane genetycznie w diagnostyce i terapii

Obecnie duże nadzieje w diagnostyce i terapii wiąże się z BMG. Posługując się metodami inżynierii genetycznej możliwe stały się różnorodne modyfikacje materiału genetycznego takie jak dodawanie, usuwanie czy przenoszenie fragmentów DNA pomiędzy organizmami. W ten sposób otrzymuje się genetycznie modyfikowane organizmy (GMO), posiadające pożądane cechy. Najczęściej wykorzystywane bakterie modyfikowane genetycznie o znaczeniu medycznym stanowią bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, wchodzące w skład grupy bakterii kwasu mlekowego (LAB, lactic acid bacteria), a także bakterie *Bacteroides*, *Escherichia coli* czy *Salmonella* spp. Aktualnie większość badań znajduje się na etapie testowania skuteczności BMG na mysich modelach i niewiele z nich osiągnęło etap badań klinicznych [14, 26, 32, 50, 51, 52, 57].

Trzy główne rodzaje BMG to bakterie pełniące funkcje diagnostyczne (tak zwane biosensory), bakterie produkujące terapeutyk w sposób ciągły oraz bakterie produkujące terapeutyk w odpowiedzi na określony bodziec zewnętrzny tzw. „inteligentny” probiotyk (IP) (Rys. 1, na podstawie [5]).

BMG pełniące funkcje diagnostyczne posiadają zdolność detekcji różnego typu biomarkerów, na przykład biomarkerów stanu zapalnego. Biomarker ten aktywuje ekspresję genu, który koduje białko, na przykład o właściwościach fluorescencyjnych, wykrywane następnie w kale. Z kolei BMG pełniące funkcje terapeutyczne posiadają zdolność ciągłej produkcji leku, który jest uwalniany w miejscu toczącego się procesu chorobowego. Rozwiązanie przyszłości to IP, czyli probiotyk łączący w sobie cechy BMG o działaniu diagnostycznym i terapeutycznym. IP wykrywa jeden lub kilka związków chemicznych, analizuje ich obecność i kombinacje, a następnie reaguje, dostarczając precyzyjną dawkę jednego lub większej liczby odpowiednich leków do chorego narządu. Zasadę działania IP można określić jako ciąg zdarzeń: detekcja(D)/analiza(A)/odpowiedź(O). Opis szczegółowych biotechnologicznych zasad konstruowania obwodów genetycznych można znaleźć między innymi w pracach Landry' i wsp., Yadav i wsp. lub Rottinghaus i wsp. [24, 36, 52]. Związkami chemicznymi, ulegającymi detekcji, mogą być zarówno czynniki zewnętrzne, dodawane do wody lub pożywienia, jak i określone biomarkery produkowane *in situ*. Aktualnie przydatność IP jest badana w takich schorzeniach jak: zapalenie okrężnicy, cukrzyca oraz zakażenie *Pseudomonas aeruginosa* [5, 24].

## 7. Wykorzystanie bakterii modyfikowanych genetycznie w medycynie

Bakterie modyfikowane genetycznie mogą zostać wprowadzone do organizmu doustnie, dożylnie, do-odbytniczo, dopochwowo czy poprzez bezpośrednie wstrzyknięcie do konkretnej tkanki, na przykład do guza nowotworowego. Następnie bakterie docierają do pożądanego miejsca w organizmie, co związane jest z preferencyjnym gromadzeniem się określonych szczepów bakterii w różnych tkankach, na przykład w obrębie tkanki nowotworowej [26].

W diagnostyce chorób przewodu pokarmowego przeprowadza się próby wykorzystania BMG, które posiadają zdolność przekształcania substancji, charakterystycznych dla stanu zapalnego w jelicie, w substancje będące biomarkerami, łatwo ulegającymi detekcji w kale, na przykład w postaci związku dającego sygnał fluorescencyjny. Prowadzone są próby nad wykryciem jonów  $S_4O_6^{2-}$  i  $S_2O_3^{2-}$ , a także detekcją  $NO$ ,  $H_2S$ ,  $H_2O_2$  i innych związków w kale osób cierpiących na stany zapalne jelit. Z kolei krwawienia w jelicie próbuje się diagnozować dzięki wykrywaniu obecności hemu. Na podobnej zasadzie opiera się wykrycie związków i substancji pochodnych w kale, które pełnią rolę biomarkerów infekcji charakterystycznych dla określonych patogenów (na przykład *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*) [21, 55].

W doświadczeniach związanych z wykorzystaniem BMG w terapii dominują schorzenia zlokalizowane w obrębie przewodu pokarmowego. Choroby zapalne jelit, obejmujące wrzodziejące zapalenie jelita grubego i chorobę Leśniowskiego-Crohna, są wywołane nieprawidłowym funkcjonowaniem układu immunologicznego w obrębie przewodu pokarmowego. Związki o charakterze przeciwzapalnym, takie jak kortykosteroidy, tiopuryny czy przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko czynnikowi martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor) są stosowane w leczeniu tej grupy schorzeń. Przeciwciała anty-TNF- $\alpha$  charakteryzują się wysoką skutecznością w łagodzeniu objawów chorób zapalnych jelit, ale również znacznymi efektami ubocznymi oraz wysokim kosztem leczenia. Genetycznie modyfikowane LAB, które produkują przeciwciała skierowane przeciwko TNF- $\alpha$ , mogą stanowić terapię alternatywną w stosunku do terapii konwencjonalnej. Skuteczność tej terapii została potwierdzona przy wykorzystaniu zwierzęcych modeli chorób zapalnych jelit. Zaobserwowano, że doustne podanie *Lactobacillus lactis*, wydzielających przeciwciała przeciwko TNF- $\alpha$ , nie wywołuje efektów ubocznych, obserwowanych po dożylnym podaniu wspomnianych przeciwciał. Inne eksperymenty, wykorzystujące bakterie kwasu mlekowego, obejmują neutralizację takich cytokin prozapalnych jak: IL-6, IL-17 oraz IL-23. Zmodyfikowane genetycznie LAB można także wykorzystać do podawania cytokin przeciwzapalnych, takich jak IL-10 lub IL-27 w celu leczenia zapalenia okrężnicy u myszy. Rekombinowane bakterie *Lactobacillus lactis* mogą również produkować białka wiążące chemokiny o działaniu prozapalnym, co potwierdzono w hodowli komórek nabłonkowych *in vitro*, a także syntetyzować peptydy TFF (trefoil factor family) występujące głównie w przewodzie pokarmowym i pełniące funkcje ochronne w stosunku do jego nabłonka. Inne próby dotyczą podawania enzymów np. dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy, które ograniczają ilość reaktywnych form tlenu w zmienionej zapalnie błonie śluzowej jelita, inhibitora proteazy serynowej lub insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 [5, 26, 27, 30, 33, 43]. Pojawiły się również próby dostarczania do przewodu pokarmowego za pomocą BMG interferującego RNA (iRNA), który blokuje syntezę enzymu COX-2, odpowiedzialnego za katalizowanie reakcji syntezy substancji prozapalnych [5]. Ukazały się także doniesienia o zmodyfikowanych bakteriach *Streptococcus*, wykazujących działanie przeciwróżnicze w jamie ustnej [14].

Rekombinowane LAB mogą również posłużyć do dostarczania antygenów typowych dla wirusów, bakterii, grzybów oraz pasożytów w celu uzyskania odpowiedzi immunologicznej na błonach śluzowych. Celem tak podanej szczepionki jest wywołanie produkcji przeciwciał klasy IgA w układzie MALT, jednak ogólnie-

ustrojowa odpowiedź immunologiczna również została zaobserwowana. Rozważane jest skonstruowanie takiej szczepionki między innymi przeciwko wirusowi ptasiej grypy, rotawirusom, wirusowi HIV oraz wirusowi zapalenia wątroby typu A [1, 33]. W badaniach na myszach wykazano, że doustne podanie zrekombinowanej bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, wykazującej ekspresję antygeny wirusa ptasiej grypy – hemaglutyniny HA 1, spowodowało wytworzenie przeciwciał, których obecność wykryto w błonie śluzowej (przeciwciała IgA anti-HA1) oraz w surowicy (przeciwciała IgG anti-HA1). Bakterie, przeciwko którym podejmowane są próby konstruowania szczepionek w oparciu o powyższą technologię to między innymi: *Clostridium tetani*, *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Helicobacter pylori* i *Clostridium perfringens*. Porównano także nasilenie odpowiedzi immunologicznej u myszy, którym podano, doustnie lub donosowo, zmodyfikowane genetycznie *L. lactis*, które posiadały zdolność produkcji fragmentu toksyny bakterii *C. tetani*. Wyższy poziom przeciwciał zaobserwowano w wyniku donosowej drogi podania antygeny [1, 33]. Można również podać bakterie wykazujące ekspresję określonej onkoproteiny. Prowadzone są badania nad wprowadzeniem tego typu szczepionki zapobiegającej rozwojowi raka szyjki macicy [33].

Obecnie leczenie wielu infekcji staje się coraz trudniejsze, głównie ze względu na wzrastającą oporność bakterii na antybiotyki. Podejmowane są próby zastosowania BMG w leczeniu infekcji, poprzez wykorzystanie ich wysokiej specyficzności oraz braku równoczesnego, negatywnego wpływu na mikrobiotę gospodarza. W warunkach *in vitro* i mysich modelach wykazano przeciwbakteryjne działanie wielu substancji, syntetyzowanych przez BMG. Ponadto BMG mogą posiadać zdolność wykrywania patogenów i wydzielania związków, hamujących ich wzrost [1, 18, 30, 55]. Obecnie są prowadzone również badania nad BMG, produkującymi białka o charakterze przeciwwirusowym [30].

Spośród chorób metabolicznych, w których najczęściej wskazuje się na możliwość wykorzystania BMG, wymienia się fenylketonurię oraz hiperamonemię. Jest to możliwe dzięki dostarczeniu do organizmu enzymów zaangażowanych w przemiany szkodliwych substancji [1, 55]. Kolejnym sposobem na wykorzystanie BMG jest leczenie schorzeń alergicznych, cukrzycy typu I, otyłości oraz nadciśnienia [26, 30, 53, 55].

Szczególne nadzieje wiąże się z wykorzystaniem właściwości BMG w terapii przeciwnowotworowej. Niektóre bakterie np. atenuowane szczepy *Salmonella* spp. oraz *Listeria* spp. posiadają zdolność preferencyjnej penetracji i proliferacji wewnątrz guzów nowotworowych. Mikroorganizmy te nie tylko wykazują działanie przeciwnowotworowe, ale także w środowisku guza mogą pobudzać odpowiedź immunolo-

giczną gospodarza przeciw komórkom nowotworowym. W przyszłości tą strategię leczniczą można by wykorzystywać zarówno w monoterapii, jak i w kombinacji z innymi terapiami przeciwnowotworowymi. BMG o osłabionej wirulencji stanowią również alternatywę w leczeniu chorób nowotworowych; należy jednak zwrócić uwagę, by osłabienie wirulencji jednocześnie nie spowodowało osłabienia działania przeciwnowotworowego. Omawiane modyfikacje genetyczne można również wykorzystać do nasilenia migracji bakterii do komórek nowotworowych, na przykład poprzez ekspresję na ich powierzchni ligandów, specyficznych dla określonego typu nowotworu, co umożliwi redukcję skutków ubocznych związanych z toksycznym oddziaływaniem na zdrowe komórki organizmu. Dalsza modyfikacja genetyczna bakterii umożliwia wzmocnienie ich przeciwnowotworowego działania poprzez produkcję substancji cytotoksycznych, enzymów konwertujących proleki do leków, substancji immunomodulujących, czynników antyangiogennych lub niekodujących cząsteczek RNA. Ekspresja określonych genów może być wyzwalana specyficznymi warunkami, panującymi w obrębie guza (np. hipoksja, niskie pH, nasilona nekroza) lub poprzez podanie specyficznych substancji egzogennych, na przykład dożylnie lub dootrzewnowo. Próby kliniczne skuteczności tego typu terapii dotyczą między innymi leczenia czerniaka, raka szyjki macicy oraz nowotworów jelita grubego, wątroby i trzustki [12, 22, 26, 31]. Ciekawym pomysłem terapeutycznym jest również równoczesne podawanie kilku rodzajów genetycznie zmodyfikowanych bakterii [33] oraz ich „molekularne spersonalizowanie”, w zależności od typu nowotworu [1, 30].

## 8. Podsumowanie

Szybki rozwój narzędzi inżynierii genetycznej i biologii syntetycznej umożliwia konstruowanie coraz skuteczniejszych i bezpieczniejszych farmabiotyków, pełniących zarówno funkcje diagnostyczne, jak i terapeutyczne. Bakterie modyfikowane genetycznie stanowią jedną z możliwości rozwoju medycyny spersonalizowanej, która zakłada indywidualne zastosowanie ściśle dobranej substancji leczniczej do stanu chorobowego każdego pacjenta. Taki wysoki poziom personalizacji jest możliwy do osiągnięcia poprzez stosowanie „inteligentnych probiotyków”. Co więcej, farmabiotyki umożliwiają również leczenie miejscowe, co ogranicza efekty uboczne, widoczne w czasie leczenia ogólnoustrojowego. Pomimo tak obiecujących perspektyw trudno jest określić, kiedy bakterie zmodyfikowane genetycznie znajdą powszechne zastosowanie w praktyce klinicznej. Liczba badań znajdująca się w fazie klinicznej jest ograniczona, co w dużej mierze jest związane

z ograniczeniami i obawami związanymi z wykorzystaniem organizmów zmodyfikowanych genetycznie w medycynie [1, 26, 32].

## Piśmiennictwo

- Aggarwal N., Breedon A.M.E., Davis C.M., Hwang I.Y., Chang M.W.: Engineering probiotics for therapeutic applications: recent examples and translational outlook. *Curr. Opin. Biotechnol.* **65**, 171–179, doi: 10.1016/j.copbio.2020.02.016 (2020)
- Akdis C.A.: Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions? *Nat. Rev. Immunol.* doi: 10.1038/s41577-021-00538-7 (2021)
- Andrade J.C., Almeida D., Domingos M., Seabra C.L., Machado D., Freitas A.C., Gomes A.M.: Commensal obligate anaerobic bacteria and health: production, storage, and delivery strategies. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, doi:10.3389/fbioe.2020.00550 (2020)
- Bae H.R., Leung P.S.C., Hodge D.L., Fenimore J.M., Jeon S.M., Thovarai V., Dzutsev A., Welcher A.A., Boedigheimer M., Damore M.A., Choi M.S., Fravell R.A., Trinchieri G., Gershwin M.E., Young H.A.: Multi-omics: differential expression of IFN- $\gamma$  results in distinctive mechanistic features linking chronic inflammation, gut dysbiosis, and autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* **111**, 102436, doi: 10.1016/j.jaut.2020.102436 (2020)
- Barra M., Danino T., Garrido D.: Engineered probiotics for detection and treatment of inflammatory intestinal diseases. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 265, doi: 10.3389/fbioe.2020.00265 (2020)
- Barrientos-Durán A., Fuentes-López A., de Salazar A., Plaza-Díaz J., García F.: Reviewing the composition of vaginal microbiota: inclusion of nutrition and probiotic factors in the maintenance of eubiosis. *Nutrients*, **12**, 419, <https://doi.org/10.3390/nu12020419> (2020)
- Bezkorovainy A.: Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 399–405, <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.399s> (2001)
- Brüssow H.: Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis. *Microb. Biotechnol.* **13**, 423–434, doi:10.1111/1751-7915.13479 (2020)
- Chang C.J., Lin T.L., Tsai Y.L., Wu T.R., Lai W.F., Lu C.C., Lai H.C.: Next generation probiotics in disease amelioration. *J. Food Drug Anal.* **27**, 615–622, doi: 10.1016/j.jfda.2018.12.011 (2019)
- Corcoran B.M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Dockery P., Stanton C.: Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under stressful conditions induced by drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5104–7, doi: 10.1128/AEM.02626-05 (2006)
- Da Silva T.F., Casarotti S.N., de Oliveira G.L.V., Penna A.L.B.: The impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics on the biochemical, clinical, and immunological markers, as well as on the gut microbiota of obese hosts. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **61**, 337–355, doi: 10.1080/10408398.2020.1733483 (2021)
- Duong M.T., Qin Y., You S.H., Min J.J.: Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy. *Exp. Mol. Med.* **51**, 12, 1–15, doi: 10.1038/s12276-019-0297-0 (2019)
- Eun-Sook L., Eun-Ji S., Young-Do N., So-Young L.: Probiotics in human health and disease: from nutraceuticals to pharmabiotics. *J. Microbiol.* **56**, 773–782 doi: 10.1007/s12275-018-8293-y (2018)
- Ferreira A.K., Mambelli L.I., Pillai S.Y.: Intervening in disease through genetically-modified bacteria. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **31**, 693–697 (2017)
- Galecka M., Basińska A. M., Bartnicka A. Probiotyki – implikacje w praktyce lekarza rodzinnego. *Forum Med. Rodz.* **12**, 170–182 (2018)
- Gardiner G.E., O’Sullivan E., Kelly J., Auty M.A., Fitzgerald G.F., Collins J.K., Ross R.P., Stanton C.: Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2605–2612, doi: 10.1128/aem.66.6.2605-2612.2000 (2000)
- Giron F., Quigley E.M.M.: Pharmabiotic manipulation of the microbiota in gastrointestinal disorders: a clinical perspective. *J. Neurogastroenterol. Motil.* **24**, 355–366, doi: 10.5056/jnm18004 (2018)
- Hwang I.Y., Koh E., Wong A., March J.C., Bentley W.E., Lee Y.S., Chang M.W. Engineered probiotic *Escherichia coli* can eliminate and prevent *Pseudomonas aeruginosa* gut infection in animal models. *Nat. Commun.* **8**, 15028 doi: 10.1038/ncomms15028 (2017)
- Jach M., Łoś R., Maj M., Malm A.: Probiotyki – aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Post. Mikrobiol.* **52**, 161–170 (2013)
- Kali A.: Human microbiome engineering: the future and beyond. *J. Clin. Diagn. Res.* **9**, DE01–4, doi: 10.7860/JCDR/2015/14946.6570 (2015)
- Kang M., Choe D., Kim K., Cho B.K., Cho S.: Synthetic biology approaches in the development of engineered therapeutic microbes. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8744, doi: 10.3390/ijms21228744 (2020)
- Kramer M.G., Masner M., Ferreira F.A., Hoffman R.M.: Bacterial therapy of cancer: promises, limitations and insights for future directions. *Front. Microbiol.* **9**, 16 doi: 10.3389/fmicb.2018.00016 (2018)
- Kumar M., Yadav A.K., Verma V., Singh B., Mal G., Nagpal R., Hemalatha R.: Bioengineered probiotics as a new hope for health and diseases: an overview of potential and prospects. *Future Microbiol.* **11**, 585–600 doi: 10.2217/fmb.16.4. (2016)
- Landry B.P., Tabor J.J. Engineering diagnostic and therapeutic gut bacteria. *Microbiol. Spectr.* **5**, doi: 10.1128/microbiolspec. BAD-0020-2017 (2017)
- Lee J.W., Chan C.T.Y., Slomovic S., Collins J.J. Next-generation biocontainment systems for engineered organisms. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 530–537, doi: 10.1038/s41589-018-0056-x (2018)
- Lim D., Song M.: Development of bacteria as diagnostics and therapeutics by genetic engineering. *J. Microbiol.* **57**, 637–643, doi: 10.1007/s12275-019-9105-8 (2019)
- Mazhar S.F., Afzal M., Almatroudi A., Munir S., Ashfaq U.A., Rasool M., Raza H., Munir H.M.W., Rajoka M.S.R., Khurshid M.: The prospects for the therapeutic implications of genetically engineered probiotics. *J. Food Qual.* article ID 9676452 <https://doi.org/10.1155/2020/9676452> (2020)
- Moloko G.M., Mapitsi S.T.: Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut Pathog.* **9**, 28, doi: 10.1186/s13099-017-0178-9 (2017)
- Mroczyńska M., Libudzisz Z., Gałęcka M., Szachta P.: Mikroorganizmy jelitowe człowieka i ich aktywność metaboliczna. *Prz. Gastroenterol.* **4**, 218–224 (2016)
- Ozdemir T., Fedorec A.J.H., Danino T., Barnes C.P.: Synthetic biology and engineered live biotherapeutics: toward increasing system complexity. *Cell Syst.* **7**, 5–16, doi: 10.1016/j.cels.2018.06.008 (2018)
- Paton A.W., Morona R., Paton J.C. Bioengineered microbes in disease therapy. *Trends Mol. Med.* **18**, 417–425, doi: 10.1016/j.molmed.2012.05.006 (2012)
- Pedrolli D.B., Ribeiro N.V., Squizzato P.N., de Jesus V.N., Cozetto D.A.: Team AQA Unesp at iGEM 2017. Engineering

- microbial living therapeutics: the synthetic biology toolbox. *Trends Biotechnol.* **37**, 100–115, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.09.005 (2019)
33. Plavec T.V., Berlec A.: Engineering of lactic acid bacteria for delivery of therapeutic proteins and peptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 2053–2066, doi: 10.1007/s00253-019-09628-y (2019)
34. Pongking T., Haonon O., Dangtakot R., Onsurathum S., Jusakul A., Intuyod K., Sangka A., Anutrakulchai S., Chaon U., Pinlaor S., Pinlaor P.: A combination of monosodium glutamate and high-fat and high-fructose diets increases the risk of kidney injury, gut dysbiosis and host-microbial co-metabolism. *PLoS One*, **15**, 4, e0231237, doi:10.1371/journal.pone.0231237 (2020)
35. Ropot A.V., Karamzin A.M., Sergeyev O.V.: Cultivation of the next-generation probiotic *akkermandsia muciniphila*, methods of its safe delivery to the intestine, and factors contributing to its growth *in vivo*. *Curr. Microbiol.* **77**, 8, 1363–1372, doi: 10.1007/s00284-020-01992-7 (2020)
36. Rottinghaus A.G., Amroffell M.B., Moon T.S.: Biosensing in smart engineered probiotics. *Biotechnol. J.* **15**, e1900319, doi: 10.1002/biot.201900319 (2020)
37. Ruskowski J., Szewczyk A., Witkowski J. M.: Przegląd doustnych prebiotyków, probiotyków, synbiotyków i postbiotyków dostępnych na polskim rynku aptecznym. *Farm. Pol.* **74**, 2, 114–122 (2018)
38. Sharma R., Gupta D., Mehrotra R., Mago P.: Psychobiotics: the next-generation probiotics for the brain. *Curr. Microbiol.* **78**, 2, 449–463, doi: 10.1007/s00284-020-02289-5 (2021)
39. Sheehan V.M., Sleator R.D., Fitzgerald G.F., Hill C.: Heterologous expression of BetL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3, 2170–2177, doi: 10.1128/AEM.72.3.2170-2177.2006 (2006)
40. Skrzydło-Radomańska B., Wronecki J.: Czy mikrobiotę jelitową można skutecznie modyfikować? *Varia Medica*, **3**, 1, 18–26 (2019)
41. Sleator R.D., Hill C.: Rational design of improved pharmabiotics. *J. Biomed. Biotechnol.* 275287, doi: 10.1155/2009/275287 (2009)
42. Sola-Oladokun B., Culligan E.P., Sleator R.D.: Engineered probiotics: applications and biological containment. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **28**, 8, 353–370, doi: 10.1146/annurev-food-030216-030256 (2017)
43. Tan Y., Shen J., Si T., Ho C.L., Yinqing Li Y., Dai L.: Engineered live biotherapeutics: progress and challenges. *Review Biotechnol. J.* **15**, 10, e2000155, doi: 10.1002/biot.202000155 (2020)
44. Thursby E., Juge N.: Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* **474**, 1823–1836, doi: https://doi.org/10.1042/BCJ20160510 (2017)
45. Tyagi P., Tasleem M., Prakash S., Chouhan G.: Intermingling of gut microbiota with brain: exploring the role of probiotics in battle against depressive disorders. *Food Res. Int.* **137**, 109489, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109489 (2020)
46. Vallianou N., Stratigou T., Christodoulatos G.S., Tsigalou C., Dalamaga M.: Probiotics, prebiotics, synbiotics, postbiotics, and obesity: current evidence, controversies, and perspectives. *Curr. Obes. Rep.* **9**, 179–192, https://doi.org/10.1007/s13679-020-00379-w (2020)
47. Vandenplas Y., Huys G., Daube G.: Probiotics: an update. *J. Pediatr. (Rio J.)*, **91**, 6–21, doi: 10.1016/j.jpeds.2014.08.005. Epub 2014 Oct 23. (2015)
48. Wieërs G., Belkhir L., Enaud R., Leclercq S., Philippart de Foy J.M., Dequenne I., de Timary P., Cani P.D.: How probiotics affect the microbiota. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **9**, 454, doi:10.3389/fcimb.2019.00454 (2020)
49. Wilkins L.J., Monga M., Miller A.W.: Defining dysbiosis for a cluster of chronic diseases. *Sci. Rep.* **9**, 12918, doi:10.1038/s41598-019-49452-y (2019)
50. Wu C., Huang J., Zhou R.: Genomics of lactic acid bacteria: current status and potential applications. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**, 393–404, doi: 10.1080/1040841X.2016.1179623 (2017)
51. Yadav R., Kumar V., Baweja M., Shukla P.: Gene editing and genetic engineering approaches for advanced probiotics: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **58**, 1735–1746, doi: 10.1080/10408398.2016.1274877 (2018)
52. Yadav M., Shukla P.: Efficient engineered probiotics using synthetic biology approaches: a review. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **67**, 22–29, doi: 10.1002/bab.1822 (2020)
53. Yadav M., Shukla P.: Recent systems biology approaches for probiotics use in health aspects: a review. *3 Biotech.* **9**, 448, doi: 10.1007/s13205-019-1980-5 (2019)
54. Yao M., Xie J., Du H., McClements D.J., Xiao H., Li L.: Progress in microencapsulation of probiotics: a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **19**, 2, 857–874, doi: 10.1111/1541-4337.12532 (2020)
55. Zhou Z., Chen X., Sheng H., Shen X., Sun X., Yan Y., Wang J., Yuan Q.: Engineering probiotics as living diagnostics and therapeutics for improving human health. *Microb. Cell Fact.* **19**, 56, doi: 10.1186/s12934-020-01318-z (2020)
56. Zou Y., Chen T.: Engineered *akkermandsia muciniphila*: a promising agent against diseases. *Exp. Ther. Med.* **20**, 285, doi: 10.3892/etm.2020.9415 (2020)
57. Zuo F., Chen S., Marcotte H.: Engineer probiotic bifidobacteria for food and biomedical applications – current status and future prospective. *Review Biotechnol. Adv.* **45**, 107654, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107654 (2020)



## POTENCJALNE MOŻLIWOŚCI WYKRYWANIA DNA HPV W PŁYNNY BIOPSIJ I DIAGNOSTYCE RAKA GŁOWY I SZYI

Barbara Masarczyk<sup>1</sup>, Tomasz W. Rutkowski<sup>2</sup>, Agnieszka M. Mazurek<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów,  
Narodowy Instytut Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie, Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Gliwicach

<sup>2</sup> Zakład Radioterapii, Narodowy Instytut Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie,  
Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Gliwicach

Wpłynęło w listopadzie 2021 r., zaakceptowano w lutym 2022 r.

**Streszczenie:** Płynna biopsja polega na badaniu krążącego we krwi, pozakomórkowego DNA (cfDNA, circulating cell-free DNA) pochodzącego z komórek prawidłowych lub nowotworowych. Analiza małej ilości krwi może być bogatym źródłem informacji o stanie zdrowia pacjenta chorującego na nowotwór. Płynna biopsja może być alternatywą do biopsji z guza, ale przedstawia szczególną wartość w przypadkach niedostępności materiału tkankowego oraz możliwości wielokrotnego jej powtarzania. Frakcja cfDNA pochodząca z guza nazywana jest w onkologii ctDNA (circulating tumor DNA). Przykładem ctDNA mogą być sekwencje genomu wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV, *Human Papillomavirus*), który jest czynnikiem etiologicznym niektórych raków regionu głowy i szyi (RRGiSz), a w szczególności gardła środkowego (RGŚ). Najczęstszym genotypem występującym w RGŚ jest HPV16. Bezinwazyjne i częste oznaczanie DNA HPV16 we krwi (ctHPV16, circulating tumor HPV type 16) daje możliwość monitorowania przebiegu choroby w trakcie leczenia i po jego zakończeniu. Bardzo dobrymi narzędziami do detekcji DNA HPV są techniki bazujące na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), do których należy ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (qPCR, quantitative polymerase chain reaction) i cyfrowy emulsyjny PCR (ddPCR, digital droplet PCR). Użycie tych technik do oznaczania DNA wirusa daje wysoką specyficzność i czułość badania. Wykrywanie ctHPV16 po zakończonym leczeniu może być pomocne w rozpoznaniu choroby resztkowej, którą trudno ocenić w obrazowaniu radiologicznym. Biomarker jakim jest ctHPV16 można z powodzeniem zastosować do diagnostyki efektów leczenia chorych na RGŚ, który w przyszłości może być pomocny w podejmowaniu decyzji terapeutycznych.

1. Wprowadzenie. 2. Proces onkogenezy z udziałem ludzkiego wirusa brodawczaka (HPV). 3. Płynna biopsja i pozakomórkowy nowotworowy DNA we krwi. 4. Metody detekcji krążącego DNA HPV we krwi. 5. Krążące DNA HPV w monitorowaniu przebiegu chemioradioterapii i wczesnej ocenie stanu wyleczenia chorych na raka gardła środkowego. 6. Podsumowanie

### POTENTIAL POSSIBILITIES OF HPV DNA DETECTION IN LIQUID BIOPSY FOR DIAGNOSIS OF PATIENTS WITH HEAD AND NECK CANCER

**Abstract:** Liquid biopsy involves testing extracellular DNA (cfDNA – circulating, cell-free DNA) circulating in the blood and deriving from normal or cancer cells. Analysis of a small amount of blood can be a rich source of information about the health status of cancer patient. Liquid biopsy may be an alternative to tumor biopsy, but it presents particular value in cases of inaccessibility of tissue samples and the possibility of repeating it many times. The tumor-derived cfDNA fraction is called circulating tumor DNA (ctDNA) in oncology. An example of ctDNA may be the genome sequences of the *Human Papillomavirus* (HPV), which is the etiological factor of some head and neck cancers (HNC), in particular of the oropharyngeal cancer (OPC). HPV16 is the most common genotype found in OPC. Non-invasive and frequent determination of HPV16 DNA (ctHPV16) in the blood gives the opportunity to monitor the course of the disease during and after treatment. Very good tools for HPV DNA detection are techniques based on polymerase chain reaction (PCR) like quantitative real-time PCR (qPCR) and digital droplet PCR (ddPCR). The use of these techniques for virus DNA detection in the blood gives high specificity and sensitivity of the analysis. Determination of ctHPV16 after treatment may be helpful in diagnosis of residual disease, which is difficult to assess in radiological imaging. The ctHPV16 biomarker can be successfully used to diagnose the effects of treatment of patients with OPC, which in the future may be helpful in making therapeutic decisions.

1. Introduction. 2. The process of oncogenesis involving the human papillomavirus (HPV). 3. Liquid biopsy and tumor cell-free DNA in the blood. 4. Methods of ctHPV detection in blood. 5. ctHPV in monitoring of chemoradiotherapy and early assessment of treatment results of patients with oropharyngeal cancer. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** krążący nowotworowy DNA, płynna biopsja, wirus brodawczaka ludzkiego, rak gardła środkowego

**Keywords:** circulating tumor DNA, liquid biopsy, *Human Papillomavirus*, oropharyngeal cancer

\* Autor korespondencyjny: dr hab. n. med. Agnieszka M. Mazurek, Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie, Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Gliwicach, Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-102 Gliwice, Polska; tel. Tel: 48 322 789 647; Fax: 48 322 789 840; e-mail: Agnieszka.Mazurek@io.gliwice.pl; ORCID <https://orcid.org/0000-0001-6545-4095>

## 1. Wprowadzenie

Płynna biopsja to zabieg diagnostyczny polegający na pobraniu krwi od chorego w celu diagnostyki nowotworu. Próbkę krwi poddaje się analizie pod kątem obecności krążących komórek nowotworowych lub kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA – deoxyribonucleic acid) pochodzącego z nowotworu [1–3]. Pozakomórkowy krążący we krwi DNA nazywany jest cfDNA (circulating free DNA) i wykazuje te same zmiany genetyczne, które istnieją w guzach nowotworowych [4–6]. Krew może być zatem bogatym źródłem informacji o zmianach genetycznych czy epigenetycznych w nowotworze. Płynna biopsja jest badaniem mało inwazyjnym w porównaniu do innych metod diagnostycznych. Będąc alternatywą do biopsji z guza, przedstawia szczególną wartość nie tylko w przypadkach niedostępności materiału tkankowego, ale również ze względu na możliwość wielokrotnego jej powtarzania np. na różnych etapach leczenia czy po jego zakończeniu [7–9]. Płynna biopsja stwarza unikalną możliwość śledzenia obecności ocenianej cechy genetycznej w aspekcie skuteczności terapii czy też wczesnego wykrycia wznowy nowotworu. U części chorych na raka regionu głowy i szyi (RRGiSz) za kancerogenne działanie odpowiadają wirusy HPV (*Human Papillomavirus*), nazywane wirusami wysokiego ryzyka. HPV aż w 70% jest czynnikiem etiologicznym raka gardła środkowego [10–12]. Ocenę obecności DNA wirusa HPV w płynnej biopsji (circulating tumor HPV, ctHPV) można zatem wykorzystać do potwierdzenia etiologii nowotworu HPV-zależnego oraz do określenia stopnia remisji choroby podczas leczenia.

## 2. Proces onkogenezy z udziałem ludzkiego wirusa brodawczaka (HPV)

Wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) to wirus o ikosaedralnej symetrii, którego materiałem genetycznym jest dwuniciowa cząsteczka DNA. W swoim genomie liczącym ok. 8000 pz zawiera dwa regiony kodujące, składające się z sześciu genów wczesnych (E – early) i dwóch późnych (L – late), które rozdzielone są regionem regulatorowym (UPR – upstream regulatory region) [13, 14]. HPV wykazuje tropizm do różnicujących się komórek nabłonkowych, które są niezbędne do przejścia pełnego cyklu rozwojowego [15, 16]. Wirus ma ponad 100 wariantów genetycznych, które zostały podzielone na typy wysokiego ryzyka, np. HPV16 (nawet do 93,6% pozytywnych guzów), 18 (do 18%), 35 (do 7,6%), 33 (do 4%), 45 (ok. 4%) 39 (ok. 0,6%), 52 (3,2%), 51 (11,4%), 31 (7,1%) i niskiego ryzyka, np. HPV 6 i 11 [13, 17–20]. Typy o niskim potencjale onkogennym (niskiego ryzyka) mogą powodować wzrost

nieprawidłowych komórek, ale tylko typy o wysokim potencjale onkogennym (wysokiego ryzyka) prowadzą do rozwoju nowotworu, ponieważ posiadają gen kodujący białko E7, które umożliwia immortalizację ludzkich komórek nabłonkowych, co oznacza, że komórki ulegają niekontrolowanym, ciągłym podziałom [21–23]. Dłuższe narażenie na tego wirusa, występujące podczas chronicznej infekcji oraz współtowarzysząca niesprawność układu odpornościowego mogą doprowadzić już po ok. 10 latach do rozwoju nowotworu [24–26]. Kluczową rolę w kancerogenezie odgrywają białka kodowane przez geny wczesne E, natomiast produkty genów późnych L pełnią funkcję strukturalną wirusa [27–30]. Kodowane przez genom wirusa onkoproteiny E6 i E7 powodują degradację i inaktywację białek supresorowych pRb i p53, które w prawidłowych warunkach są odpowiedzialne za kontrolę cyklu komórkowego, poprzez indukcję naprawy DNA lub indukcję apoptozy [31–33]. Przy braku aktywności białka Rb często dochodzi do amplifikacji centrosomów, co powoduje zaburzenie rozchodzenia się chromosomów do komórek potomnych czyli aneuploidię, co z kolei generuje niestabilność genetyczną komórki [34]. Degradacja białka p53 za pośrednictwem ubikwityny, powoduje blokadę apoptozy, przez co komórki ulegają niekontrolowanym podziałom, co przyczynia się do kumulacji mutacji, promocji transformacji nowotworowej oraz powstawania raka [35–38].

Wirus brodawczaka ludzkiego może znajdować się w komórce w formie episomalnej (pozachromosomowej, niezintegrowanej) lub zintegrowanej z chromosomem gospodarza [39]. Obserwacja obecności formy episomalnej w zmianach przednowotworowych oraz dominacji formy zintegrowanej w zmianach o wysokim stopniu zaawansowania doprowadziła do ogólnego stwierdzenia wpływu integracji na progresję nowotworową [40, 41]. Nie ma ściśle określonego miejsca, w którym zachodzi integracja, choć zauważono, że występuje ona w pobliżu miejsc bardziej dostępnych i wrażliwych na pęknięcia [42–45]. Badania nad RRGiSz wykazały obecność bardzo wielu miejsc integracji, przy czym najczęściej HPV wbudowuje się do chromosomów 1, 3, 8, 9, 17 i 21, a zjawisku temu mogą dodatkowo towarzyszyć rearanżacje chromosomowe, takie jak translokacja, delecja lub duplikacja [45, 47, 48]. Integracja zachodzi zarówno w regionach międzygenowych, jak również w regionach kodujących geny. Dotychczas zidentyfikowano kilkanaście genów zaburzonych integracją HPV, a które mogą oddziaływać na szlaki związane z onkogenezą. W grupie tych genów są *DIAPH2*, *TP63* i *NAP14*, *BCL2*, *BRE*, *EPHA7*, *FANCC*, *HDAC2*, *INO80C*, *LEPREL1*, *SYNPO2*, *TRAF3*, *TUBD1*, *ERC2*, *GARS*, *SLC7A1*, *SYN3*, *ZMAT4*, *CUX1*, *CSMD1*, *EBF3*, *FOXX2*, *CDH11*, *DNAJB6*, *FOXP2*, *EPHA3*, *PTEN* [45, 47, 48]. Przy czym, region kodujący



gen *TP63* wskazano jako najczęstsze miejsce integracji wirusa [45, 47–49].

W przypadku nowotworów RGiSz zaobserwowano dominowanie formy episomalnej w zaawansowanych guzach. Badania na materiale biopsyjnym wykazały obecność formy episomalnej w 61% RGiSz [45]. W innych badaniach wykazano obecność formy episomalnej we wszystkich biopciach (wycinkach) raka migdałka [50]. Z kolei badania na różnych liniach komórkowych (wyprowadzonych z raka podstawy języka, jamy ustnej) pokazują, że w większości z nich obecne są postacie zintegrowane lub mieszanka zintegrowanej i episomalnej formy wirusa [47]. Natomiast najnowsze badania sekwencjonowania całego genomu wykazały integrację DNA HPV w 70% guzów (rak podstawy języka lub rak migdałka) [48]. Wynika z tego, że w nowotworach regionu głowy i szyi forma episomalna występuje również w zaawansowanych guzach. Skutek kliniczny obecności formy episomalnej nie jest dobrze poznany, choć Nulton i wsp. w swoich badaniach wykazali, że pacjenci chorzy na RRGiSz i guzami ze zintegrowaną formą wirusa mieli gorszy współczynnik przeżycia niż pacjenci z formą episomalną [51].

### 3. Płynna biopsja i pozakomórkowy nowotworowy DNA we krwi

Pozakomórkowy DNA – cfDNA (circulating cell-free DNA), [52, 53] odnosi się do całkowitej ilości DNA we krwi [54]. Okres półtrwania cfDNA we krwi może wynosić od kilkunastu minut do kilku godzin i zależy od konformacji lub długości cząsteczek cfDNA [55–57]. Dłużej w krwiobiegu utrzymuje się dwuniciowa niż jednoniciowa forma, a dodatkowo stwierdzono, że mniejsze cząsteczki cfDNA są usuwane szybciej z organizmu niż te większe [56, 57]. Główna frakcja całkowitego cfDNA pochodzi z komórek prawidłowych, a jedynie tylko jego część (od ok. 3% do 63%) pochodzi z komórek nowotworowych guza [58–60].

Funkcjonujące w onkologii pojęcie krążącego nowotworowego DNA, w skrócie ctDNA (circulating tumor DNA) odnosi się właśnie do frakcji nowotworowej. Obecne w ctDNA zmiany genetyczne lub epigenetyczne są identyczne z tymi znajduwanymi w komórce nowotworowej guza [7, 61–63]. Mechanizm uwalniania kwasów nukleinowych do krwi nie jest dokładnie znany. Jeden z postulatów utrzymuje, że ctDNA pochodzą z rozpadu, krążących we krwi komórek nowotworowych. Innym mechanizmem jest samorzutne wydzielanie DNA do krwi w wyniku oddziaływania proliferujących komórek nowotworowych z limfocytami. Do możliwych procesów, w wyniku których dochodzi do uwalniania DNA guza do krwi zalicza się również zjawiska martwicy i apoptozy [64, 65].

W przypadku nowotworów o etiologii wirusowej, część całkowitej puli cfDNA będzie miała sekwencje wirusowe. Wykrywanie cząsteczek genomu wirusa w całkowitej puli cfDNA pacjentów z rakiem zależnym od HPV stał się podstawą koncepcji, że DNA HPV pochodzi z komórki nowotworowej, a wobec faktu wykrywania go w krwiobiegu nazywany jest krążącym DNA HPV (w skrócie ctHPV) [66, 67, 68]. ctHPV odnosi się do frakcji pochodzącej z komórek guza zawierających HPV i w tym znaczeniu jest odpowiednikiem funkcjonującego ogólnego terminu ctDNA w onkologii. Czulość tego biomarkera we krwi chorych na RGŚ do wykrywania nowotworu wynosi ok 80%, natomiast specyficzność mieści się w zakresie od 95% do 98% [69, 70]. Natomiast zastosowanie go do wykrywania wznowy po zakończonym leczeniu odznacza się czulością 73% i swoistością 100% [70]. Ze względu na niewielką inwazyjność pobrania płynnej biopsji czyli pobrania krwi w celu pozyskania cfDNA, jest on pożądanym materiałem dla diagnostyki molekularnej ctHPV i umożliwia monitorowanie jego poziomu we krwi. Rutynowa diagnostyka ctHPV u pacjentów z RGŚ zależnym od HPV zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia nowotworu, a włączenie diagnostyki ctHPV opartej na osoczu do obecnych protokołów i standardów może zwiększyć zdolność klinicysty do oceny stanu pacjenta [71, 72].

### 4. Metody detekcji krążącego DNA HPV we krwi

Powszechnie stosowaną metodą badania ctHPV jest badanie PCR. Do badania wystarcza zwykle pobranie 5–10 ml krwi z żyły. Separacja osocza wymaga powszechnie dostępnego sprzętu jak wirówki, ekstrakcję DNA z osocza można przeprowadzić komercyjnie dostępnymi zestawami do izolacji manualnej lub automatycznej, a badanie PCR przeprowadza się przy użyciu termocyklera z detektorem i pomiarem w czasie rzeczywistym [73, 74]. Początkowe doniesienia wskazywały na niską czulość klasycznej metody PCR [75], która w następnych badaniach została zastąpiona qPCR (quantitative polymerase chain reaction), z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych do sekwencji E6 lub E7, wykazując znacznie wyższą czulość wykrywania ctHPV w osoczu, sięgającą ok. 65% [76, 77]. Technika qPCR to jedna z najpopularniejszych metod do ilościowego określania DNA, która w laboratorium diagnostycznym jest przeprowadzana przez diagnostę laboratoryjnego. Metoda qPCR jest czułym, nieskomplikowanym badaniem do oznaczania małej ilości kwasów nukleinowych we krwi, a wynik analizy można uzyskać już po kilku godzinach. W jednym z pierwszych doniesień o wykorzystaniu tej techniki w oznaczaniu DNA w płynach ustrojowych, grupa badaczy Cao i wsp. pokazali, że

zwiększenie czułości qPCR można osiągnąć poprzez zwiększenie objętości osocza użytego do izolacji cfDNA [76]. W badaniach Cao i wsp. należy jednak zwrócić uwagę na dużą rozpiętość w liczbie kopii u poszczególnych pacjentów w zakresie od ok. 100 kopii/ml do ok. 6000 kopii/ml. Na podstawie tego, można wnioskować, że liczba kopii DNA HPV jest osobniczo charakterystyczna, a wyjściowa ilość kopii w guzie koreluje z ilością we krwi, co pokazuje badanie Mazurek i wsp. [77]. W pracy wykazano także, że mała liczba kopii w guzie istotnie wpływa na wykrywalność wirusa we krwi [77]. Spośród wszystkich pacjentów z wykrytym DNA wirusa HPV16 w guzie za pomocą techniki qPCR, u 27% mediana kopii wynosiła 63 kopii/genom i w tej grupie ctHPV nie był wykrywany we krwi, natomiast u 72% pacjentów z większą ilością DNA wirusa HPV w guzie (mediana 463 kopii/genom) ctHPV był wykrywany we krwi [77]. Należy tu wspomnieć, że spośród wszystkich RRGiSz najmniejsze ilości DNA HPV w guzie zaobserwowano w rakach krtani, nosogardła, zatok czy jamy ustnej, a w rakach gardła dolnego wirusa nie stwierdza się, co przekłada się na fakt niewykrywalności ctHPV we krwi tej grupy chorych [badania własne].

W badaniach Ahn i wsp., których celem było zwiększenie czułości i specyficzności, do oznaczania miana wirusa wykorzystano nie tylko osocze ale również ślinę jako źródło cfDNA [78]. Badacze zastosowali kombinację próbek osocza i śliny do zwiększenia czułości statusu HPV16 przed leczeniem jako narzędzia do badania przesiewowego w kierunku raka gardła środkowego (RGŚ) zależnego od HPV [78]. Czułość łączonego badania śliny i osocza pobranych przed leczeniem wynosiła 76%, podczas gdy czułość samej śliny wynosiła 52,8%, a samego osocza 67,3%. Dołączenie zatem badania z wykorzystaniem śliny do badania osocza zwiększyło czułość wykrywania pacjentów z pozytywnym wynikiem HPV16 o 9%, przy czym specyficzność wynosiła 100% w łączonym jak i oddzielnych badaniach śliny lub osocza [78]. Grupa badaczy Ahn i wsp. przeprowadziła również badania korelacji wyniku testu HPV ze stanem klinicznym po leczeniu, ale czułość metody opartej na ślinie okazała się znacznie niższa (18%) w porównaniu do trzykrotnie wyższej czułości opartej na badaniu osocza (55%) [78].

Inną metodą wykorzystaną do wykrywania HPV u chorych na RGŚ może być ddPCR (digital droplet PCR), który umożliwia wykrywanie i ocenę ilościową niskich poziomów ctHPV [79]. W badaniach Chera i wsp. wykazano, że czułość techniki ddPCR do wykrywania ctHPV w osoczu jest wysoka i wynosi 89%, choć swoistość w tej technice jest już nieco niższa i wynosi 97% (w porównaniu do ww. badań z wykorzystaniem qPCR) [80]. W innym badaniu wykazano silną korelację ilości kopii ctHPV w osoczu za pomocą ddPCR a całkowitym obciążeniem guza (TTB – total tumor burden) [81]. TTB to suma największej średnicy wszystkich wykrywalnych zmian w obrazowaniu obliczana przed leczeniem. Badania pokazały, że mediana miana ctHPV była najniższa u pacjentów z chorobą lokoregionalną (5 kopii/ml), wyższa u chorych z przerzutami do płuc (163 kopii/ml), a najwyższy poziom był u pacjentów z rozsianą chorobą (452 kopii/ml) [81].

W większości badań źródłem pozakomórkowego nowotworowego DNA jest osocze, a nie surowica. Biorąc pod uwagę fakt rozpadu białych krwinek podczas procesu krzepnięcia wydaje się logiczne, że surowica może zawierać więcej DNA pochodzącego z komórek prawidłowych pojawiającego się podczas krzepnięcia. W naszych badaniach oszacowaliśmy, że w surowicy jest znacznie więcej całkowitego cfDNA i powstający produkt endogennej kontroli (np. genu globiny, który jest wewnętrzną kontrolą obecności DNA) może zaburzać wykrywanie ctHPV [dane niepublikowane]. Dlatego należy z ostrożnością podejść do badań opierających się na surowicy jako źródła cfDNA. Przykładem takich niepewnych wyników mogą być badania Dahlstroma i wsp., w których wykorzystana jest też surowica, a autorzy poddają wątpliwości wykorzystania ctHPV jako biomarkera wznowy ponieważ nie zostaje on wykryty u niektórych pacjentów [82].

Ostatecznie do badania wykorzystywane są różne ilości materiału wyjściowego i najczęściej jest to osocze. Do izolacji DNA wykorzystuje się różne metody, manualne z wykorzystaniem zestawów lub automatyczne. Wykrywanie ctHPV oparte jest na technologii PCR i dominują dwie metody detekcji qPCR oraz ddPCR. W tabeli I przedstawiono przegląd metodologii badania ctHPV we krwi u chorych na raka gardła środkowego.

Tabela I  
Przegląd metodologii ilościowego pomiaru ctHPV we krwi

Metoda izolacji DNA	Materiał do badania (ml)	Metoda oznaczania	Specyficzność	Czułość metody	Cytowanie
Genomic Mini AX Body Fluids (A&A Biotechnology)	Osocze (1 ml)	qPCR/TaqMan	100%	72%	[77]
QIAamp circulating nucleic acid Kit (Qiagen)	Osocze (2–5 ml)	ddPCR/TaqMan	97%	89%	[80]
QIAamp Blood Kit (Qiagen)	Surowica (0,5 ml)	qPCR/TaqMan	66%	60%	[82]
Manualna fenol-chloroform	Osocze (ml nie podano)	qPCR/TaqMan	100%	67%	[78]
QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen)	Osocze (0,6 ml)	qPCR/TaqMan	100%	65%	[76]

## 5. Krążące DNA HPV w monitorowaniu przebiegu chemioradioterapii i wczesnej ocenie stanu wyleczenia chorych na raka gardła środkowego

Leczenie zaawansowanych nowotworów regionu głowy i szyi radioterapią samodzielną (RT) bądź w skojarzeniu z chemioterapią (CHRT) jest leczeniem z wyboru [83, 84]. Jest to leczenie pozwalające oszczędzić organy do zachowania podstawowych funkcji życiowych jak np. gardło [83]. Ponieważ około 70% RGŚ ma etiologię wirusową, to w tej grupie chorych HPV może być markerem wykorzystanym do monitorowania postępów CHRT. W jednym z pierwszych doniesień literaturowych, dotyczących przydatności biomarkera ctHPV w monitorowaniu, wykazano stopniowy spadek kopii ctHPV we krwi podczas CHRT, aż do całkowitego zaniku [76]. U kilku chorych, u których wykryto przerzuty do płuc lub węzłów chłonnych, ctHPV był wykrywany również we krwi. U jednego chorego ctHPV wykryto 4 miesiące przed wykryciem przerzutów do płuc, a obecność guza w płucu (przerzut) zostało potwierdzone za pomocą tomografii komputerowej klatki piersiowej [76].

W badaniu Chera i wsp., za pomocą techniki ddPCR pokazano profil spadku (klirens) liczby kopii ctHPV podczas CHRT pacjentów chorych na RGŚ [80]. W pracy pokazano, że szybkość klirensu ctHPV16 (circulating tumor HPV type 16) koreluje z efektem CHRT. Pacjenci, u których po 4 tygodniu leczenia nie stwierdzono ctHPV16 we krwi mieli doskonały czas przeżycia wolny od wznowy węzłowej i miejscowej (100% po 18 miesiącach). Wśród pacjentów z niekorzystnym profilem klirensu ctHPV16, który ciągle utrzymywał się we krwi po 4 tygodniu, zaobserwowano wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia choroby resztkowej lub nawrót regionalnej choroby węzłowej (35% po 18 miesiącach) [80]. W badaniach Hanna i wsp., w których wykorzystywano ślinę oraz krew pacjentów jako źródła cfDNA zaobserwowano korelację ctHPV ze wznową lokoregionalną (miejscową), natomiast u pacjentów z przerzutami odległymi taka korelacja nie występowała [85]. Z kolei, Ahn i wsp. stwierdzili, że badanie samej śliny jest stosunkowo niespecyficznym markerem prognostycznym i dopiero w połączeniu z osoczem pozwala na wyciągnięcie prawidłowych wniosków [78].

Największym atutem płynnej biopsji jest możliwość monitorowania choroby nowotworowej podczas leczenia oraz zaraz po jego zakończeniu umożliwiając wczesne wykrycie choroby resztkowej lub nawrotu choroby. Tradycyjnie zaleca się chirurgiczne leczenie ratunkowe po badaniu klinicznym i obrazowaniu wykonanym 10–12 tygodni po leczeniu, ale taka wczesna interpretacja może być trudna ze względu na zmiany związane z leczeniem, które ograniczają radiologiczne obrazowanie choroby resztkowej [86]. W naszych naj-

nowszych badaniach śledzenie poziomu ctHPV16 po CHRT pomogło w rozpoznaniu choroby resztkowej, która nie była widoczna w obrazowaniu radiograficznym. Wynik badania ctHPV16 okazał się bardzo pomocny w podjęciu decyzji dotyczącej przeprowadzenia operacji ratującej [87]. U innego chorego wykazaliśmy, że wykryty ctHPV16 kilka tygodni po leczeniu był sygnałem do przeprowadzenia dokładnego badania pozytonowej tomografii emisyjnej, umożliwiając wykrycie przerzutu [87].

Podczas chemioterapii badanie obecności HPV we krwi może być wykonane przed przystąpieniem do wykonania każdego wlewu (podanie dożylnie leku). Badanie molekularne poziomu ctHPV w osoczu nie stwarza żadnego dodatkowego ryzyka dla pacjenta, a przeprowadzenie tego badania podczas leczenia stwarza możliwość szybkiej identyfikacji oceny stopnia wyleczenia miejscowego i węzłowego u chorych na RGŚ zależnego od HPV. Wykorzystując potencjalne narzędzie jakim jest płynna biopsja, badanie ctHPV może mieć wpływ na ocenę radiologiczną a następnie na dobór metody leczenia.

## 6. Podsumowanie

Badanie DNA HPV we krwi, skrótowo ctHPV, jako specyficznego biomarkera tylko dla chorego z rakiem zależnym od HPV, jest nowatorską metodą diagnostyczną, która:

- jest przykładem zastosowania płynnej biopsji do diagnostyki RGŚ,
- bazuje na qPCR lub ddPCR jako bardzo czułych i prostych technikach,
- podczas leczenia umożliwia obserwację efektów leczenia pacjenta,
- podczas wczesnej oceny stanu wyleczenia pomaga w rozróżnieniu między chorobą resztkową a zmianami związanymi z leczeniem,
- podczas obserwacji po leczeniu umożliwia wykrycie nowotworu przed wystąpieniem objawów klinicznych.

### Finansowanie

Publikację przygotowano w wyniku realizacji projektu badawczego TANGO2/340829/NCBR/2017 finansowanego z środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, Polska.

### Piśmiennictwo

1. Peck K., Sher Y.P., Shih J.Y., Roffler S.R., Wu C.W., Yang P.C.: Detection and quantitation of circulating cancer cells in the peripheral blood of lung cancer patients. *Cancer Res.* **58**, 2761–2765 (1998)

2. Schwarzenbach H., Alix-Panabières C., Müller I., Letang N., Vendrell J.P., Rebillard X., Pantel K.: Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 1032–1038 (2009)
3. Punnoose E.A., Lackner M.R. i wsp.: Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2391–2401 (2012)
4. Kidess-Sigal E., Jeffrey S.S. i wsp.: Enumeration and targeted analysis of KRAS, BRAF and PIK3CA mutations in CTCs captured by a label-free platform: Comparison to ctDNA and tissue in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*, **7**, 85349–85364 (2016)
5. Higgins M.J., Park B.H. i wsp.: Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin. Cancer Res.* **18**, 3462–3469 (2012)
6. Zhu G., Ye X., Dong Z., Lu Y. C., Sun Y., Liu Y., McCormack R., Gu Y., Liu X.: Highly Sensitive Droplet Digital PCR Method for Detection of EGFR-Activating Mutations in Plasma Cell-Free DNA from Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Mol. Diagn.* **17**, 265–272 (2015)
7. Thierry A.R., Ychou M. i wsp.: Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat. Med.* **20**, 430–435 (2014)
8. Yang Y., Shen X., Li R., Shen J., Zhang H., Yu L., Liu B., Wang L.: The detection and significance of EGFR and BRAF in cell-free DNA of peripheral blood in NSCLC. *Oncotarget*, **8**, 49773–49782 (2017)
9. Mazurek A.M., Rutkowski T., Fiszer-Kierzkowska A., Małusecka E., Składowski K.: Assessment of the total cfDNA and HPV16/18 detection in plasma samples of head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* **54**, 36–41 (2016)
10. D'Souza G., Kreimer A.R., Viscidi R., Pawlita M., Fakhry C., Koch W.M., Westra W.H., Gillison M.L.: Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1944–1956 (2007)
11. Lohavanichbutr P., Chen C. i wsp.: Genomewide gene expression profiles of HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer: potential implications for treatment choices. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **135**, 180–188 (2009)
12. Mehanna H., Beech T., Nicholson T., El-Hariry I., McConkey C., Paleri V., Roberts S.: Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer-systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head & Neck*, **35**, 747–755 (2013)
13. Ganguly N., Parihar S.P.: Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J. Biosci.* **34**, 113–123 (2009)
14. Faridi R., Zahra A., Khan K., Idrees M.: Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virol. J.* **8**, 1–8 (2011)
15. Mack D.H., Laimins L.A.: A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP-1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9102–9106 (1991)
16. Yoon C.S., Kim K.D., Park S.N., Cheong S.W.: alpha(6) Integrin is the main receptor of human papillomavirus type 16 VLP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 668–673 (2001)
17. Walline H.M., Carey T.E. i wsp.: High-risk human papillomavirus detection in oropharyngeal, nasopharyngeal, and oral cavity cancers: comparison of multiple methods. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.* **139**, 1320–1327 (2013)
18. Lont A.P., Kroon B.K., Horenblas S., Gallee M.P., Berkhof J., Meijer C.J., Snijders P.J.: Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int. J. Cancer*, **119**, 1078–1081 (2006)
19. Kulasingam S.L., Hughes J.P., Kiviat N.B., Mao C., Weiss N.S., Kuypers J.M., Koutsky L.A.: Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA*, **288**, 1749–1757 (2002)
20. Lee S.A., Song Y.S. i wsp.: Multiple HPV infection in cervical cancer screened by HPVDNA Chip. *Cancer Lett.* **198**, 187–192 (2003)
21. Mürger K., Yee C.L., Phelps W.C., Pietenpol J.A., Moses H.L., Howley P.M.: Biochemical and biological differences between E7 oncoproteins of the high- and low-risk human papillomavirus types are determined by amino-terminal sequences. *J. Virol.* **65**, 3943–3948 (1991)
22. Havre P.A., Yuan J., Hedrick L., Cho K.R., Glazer P.M.: p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res.* **55**, 4420–4424 (1995)
23. Hiller T., Poppelreuther S., Stubenrauch F., Iftner T.: Comparative analysis of 19 genital human papillomavirus types with regard to p53 degradation, immortalization, phylogeny, and epidemiologic risk classification. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **15**, 1262–1267 (2006)
24. Wallin K.L., Wiklund F., Angström T., Bergman F., Stendahl U., Wadell G., Hallmans G., Dillner J.: Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1633–1638 (1999)
25. de Visser K.E., Korets L.V., Coussens L.M.: De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*, **7**, 411–423 (2005)
26. Ylitalo N., Adami H.O. i wsp.: A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res.* **60**, 6027–6032 (2000)
27. Schwarz E., Freese U.K., Gissmann L., Mayer W., Roggenbuck B., Stremlau A., Zur Hausen H.: Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, **314**, 111–114 (1985)
28. Scheffner M., Werness B.A., Huibregtse J.M., Mayer W., Roggenbuck B., Stremlau A., Zur Hausen H.: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**, 1129–1136 (1990)
29. Dong W., Tommasino M. i wsp.: Skin hyperproliferation and susceptibility to chemical carcinogenesis in transgenic mice expressing E6 and E7 of human papillomavirus type 38. *J. Virol.* **79**, 14899–14908 (2005)
30. Hagensee M.E., Yaegashi N., Galloway D.A.: Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* **67**, 315–322 (1993)
31. Liu X., Clements A., Zhao K., Marmorstein R.: Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* **281**, 578–586 (2006)
32. Santer F.R., Moser B., Spoden G.A., Jansen-Dürr P., Zwerschke W.: Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein inhibits apoptosis mediated by nuclear insulin-like growth factor-binding protein-3 by enhancing its ubiquitin/proteasome-dependent degradation. *Carcinogenesis*, **28**, 2511–2520 (2007)
33. Vogt M., Butz K., Dymalla S., Semzow J., Hoppe-Seyley F.: Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene*, **25**, 4009–4015 (2006)
34. Iovino F., Lentini L., Amato A., Di Leonardo A.: RB acute loss induces centrosome amplification and aneuploidy in murine primary fibroblasts. *Mol. Cancer*, **5**, 1–11 (2006)

35. Dalal S., Gao Q., Androphy E.J., Band V.: Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E6 demonstrates that p53 degradation is necessary for immortalization of mammary epithelial cells. *J. Virol.* **70**, 683–688 (1996)
36. Camus S., Menéndez S., Cheok C.F., Stevenson L.F., Lain S., Lane D.P.: Ubiquitin-independent degradation of p53 mediated by high-risk human papillomavirus protein E6. *Oncogene*, **26**, 4059–4070 (2007)
37. Jabbar S., Strati K., Shin M.K., Pitot H.C., Lambert P.F.: Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins act synergistically to cause head and neck cancer in mice. *Virology*, **407**, 60–67 (2010)
38. Rutkowski T., Skłodowski K.: Impact of human papillomavirus (HPV) on pathogenesis, treatment and prognosis of head and neck cancer. *Współczesna Onkol.* **13**, 233–240 (2009)
39. Koopman L.A., Szuhai K., van Eendenburg J.D., Bezrukove V., Kenter G.G., Schuurin E., Tanke H., Fleuren G.J.: Recurrent integration of human papillomaviruses 16, 45, and 67 near translocation breakpoints in new cervical cancer cell lines. *Cancer Res.* **59**, 5615–5624 (1999)
40. Ziegert C., Wentzensen N., Vinokurova S., Kisseljov F., Einenkel J., Hoeckel M., von Knebel Doeberitz M.: A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene*, **22**, 3977–3984 (2003)
41. Peitsaro P., Johansson B., Syrjänen S.: Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 886–891 (2002).
42. Wagatsuma M., Hashimoto K., Matsukura T.: Analysis of integrated human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers: amplification of viral sequences together with cellular flanking sequences. *J. Virol.* **64**, 813–821 (1990)
43. Lace M.J., Anson J.R., Klussmann J.P., Wang D.H., Smith E.M., Haugen T.H., Turek L.P.: Human papillomavirus type 16 (HPV-16) genomes integrated in head and neck cancers and in HPV-16-immortalized human keratinocyte clones express chimeric virus-cell mRNAs similar to those found in cervical cancers. *J. Virol.* **85**, 1645–1654 (2011)
44. Matovina M., Sabol I., Grubišić G., Gašperov N.M., Grce M.: Identification of human papillomavirus type 16 integration sites in high-grade precancerous cervical lesions. *Gynecol. Oncol.* **113**, 120–127 (2009)
45. Olthof N.C., Huebbers C.U. i wsp.: Comprehensive analysis of HPV16 integration in OSCC reveals no significant impact of physical status on viral oncogene and virally disrupted human gene expression. *PLoS One*, **9**, e88718 (2014)
46. Walline H.M., Carey T.E. i wsp.: Integration of high-risk human papillomavirus into cellular cancer-related genes in head and neck cancer cell lines. *Head Neck*, **39**, 840–852 (2017)
47. Olthof N.C., Speel E.J.M. i wsp.: Viral load, gene expression and mapping of viral integration sites in HPV16-associated HNSCC cell lines. *Int. J. Cancer*, **136**, E207–218 (2015)
48. Gao G., Wang J., Kasperbauer J.L., Tombers N.M., Teng F., Gou H., Zhao Y., Bao Z., Smith D.I.: Whole genome sequencing reveals complexity in both HPV sequences present and HPV integrations in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer*, **19**, 1–15 (2019)
49. Koneva L.A., Zhang Y., Virani S., Hall P.B., McHugh J.B., Chepeha D.B., Wolf G.T., Carey T.E., Rozek L.S., Sartor M.A.: HPV Integration in HNSCC Correlates with Survival Outcomes, Immune Response Signatures, and Candidate Drivers. *Mol. Cancer Res.* **16**, 90–102 (2018)
50. Mellin H., Dahlgren L., Munck-Wikland E., Lindholm J., Rabbani H., Kalantari M., Dalianis T.: Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int. J. Cancer*, **102**, 152–158 (2002)
51. Nulton T.J., Kim N.K., DiNardo L.J., Morgan I.M., Windle B.: Patients with integrated HPV16 in head and neck cancer show poor survival. *Oral Oncol.* **80**, 52–55 (2018)
52. Mandel P., Metais P.: Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'Homme. *C R Seances Soc. Biol. Fil.* **142**, 241–243 (1948)
53. Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J.: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* **37**, 646–650 (1977)
54. Diaz Jr L.A., Bardelli A.: Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol.* **32**, 579–586 (2014)
55. Lo Y.M., Zhang J., Leung T.N., Lau T.K., Chang A.M., Hjelm N.M.: Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 218–224 (1999)
56. Yu S.C., Lee S.W., Jiang P., Leung T.Y., Chan K.A., Chiu R.W., Lo Y.D.: High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clin. Chem.* **59**, 1228–1237 (2013)
57. Emlen W., Mannik M.: Effect of DNA size and strandedness on the in vivo clearance and organ localization of DNA. *Clin. Exp. Immunol.* **56**, 185–192 (1984)
58. Diehl F., Vogelstein B. i wsp.: Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16368–16373 (2005)
59. Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., Knippers R.: DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* **61**, 1659–1665 (2001)
60. Mouliere F., Thierry A.R. i wsp.: Circulating Cell-Free DNA from Colorectal Cancer Patients May Reveal High KRAS or BRAF Mutation Load. *Transl. Oncol.* **6**, 319–328 (2013)
61. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, Alden R.S., O'Connell A., Feeney N., Mach S.L., Jänne P.A., Oxnard G.R.: Prospective Validation of Rapid Plasma Genotyping for the Detection of EGFR and KRAS Mutations in Advanced Lung Cancer. *JAMA Oncol.* **2**, 1014–1022 (2016)
62. Kuo Y.B., Chen J.S., Fan C.W. Li Y.S., Chan E.C.: Comparison of KRAS mutation analysis of primary tumors and matched circulating cell-free DNA in plasmas of patients with colorectal cancer. *Clin. Chim. Acta*, **433**, 284–289 (2014)
63. Han J.Y., Choi J.J., Kim J.Y., Han Y.L., Lee G.K.: PNA clamping-assisted fluorescence melting curve analysis for detecting EGFR and KRAS mutations in the circulating tumor DNA of patients with advanced non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, **16**, 1–10 (2016)
64. Pathak A.K., Bhutani M., Kumar S., Mohan A., Guleria R.: Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *Clin. Chem.* **52**, 1833–1842 (2006)
65. Schwarzenbach H., Hoon D.S., Pantel K.: Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 426–437 (2011)
66. van Ginkel J.H., Slieker F.J.B., de Bree R., van Es R.J., Van Cann E.M., Willems S.M.: Cell-free nucleic acids in body fluids as biomarkers for the prediction and early detection of recurrent head and neck cancer: A systematic review of the literature. *Oral Oncol.* **75**, 8–15 (2017)
67. Swiecicki P.L., Brennan J.R., Mierzwa M., Spector M.E., Brenner J.C.: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Detection and Surveillance: Advances of Liquid Biomarkers. *Laryngoscope*, **129**, 1836–1843 (2019)
68. Keller L., Belloum Y., Wikman H., Pantel K.: Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: mutation detection and beyond. *Br. J. Cancer*, **124**, 345–358 (2021)

69. Jakobsen K.K., Carlander A.F., Bendtsen S.K., Garset-Zamani M., Lynggaard C.D., Grønhoj C., von Buchwald C.: Diagnostic Accuracy of HPV Detection in Patients with Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Viruses*, **13**, 1692 (2021)
70. Wuerdemann N., Jain R., Adams A., Speel E.J.M., Wagner S., Joesse S. A., Klussmann J.P.: Cell-Free HPV-DNA as a Biomarker for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma-A Step Towards Personalized Medicine? *Cancers*, **12**, 2997 (2020)
71. Lee J.Y., Bhide S.: Predicting response to radical (chemo)radiotherapy with circulating HPV DNA in locally advanced head and neck squamous carcinoma. *Brit. J. Cancer*, **117**, 876–883 (2017)
72. Dermody S.M., Haring C.T., Bhambhani C., Tewari M., Brenner J.C., Swiecicki P.L.: Surveillance and Monitoring Techniques for HPV-Related Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Circulating Tumor DNA. *Curr. Treat. Option On.* **22**, 1–11 (2021)
73. Mazurek A.M., Fiszer-Kierzkowska A., Rutkowski T., Składowski K., Pierzyna M., Ściegłińska D., Woźniak G., Głowacki G., Kawczyński R., Małusecka E.: Optimization of circulating cell-free DNA recovery for KRAS mutation and HPV detection in plasma. *Cancer Biomark.* **13**, 385–394 (2013)
74. Pérez-Barrios C., Nieto-Alcalado I., Torrente M., Jiménez-Sánchez C., Calvo V., Gutierrez-Sanz L., Palka M., Donoso-Navarro E., Provencio M., Romero A.: Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl. Lung Cancer Res.* **5**, 665–672 (2016)
75. Capone R.B., Pai S.I., Koch W.M., Gillison M.L., Danish H.N., Westra W.H., Daniel R., Shah K.V., Sidransky D.: Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **6**, 4171–4175 (2000)
76. Cao H, Le Q.T. i wsp.: Quantitation of human papillomavirus DNA in plasma of oropharyngeal carcinoma patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Bio. Phys.* **82**, e351–e358 (2012)
77. Mazurek A.M., Rutkowski T., Śnietura M., Pięłowski W., Suwiński R., Składowski K.: Detection of circulating HPV16 DNA as a biomarker in the blood of patients with human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*, **41**, 632–641 (2019)
78. Ahn S.M., Chan J.Y., Zhang Z., Wang H., Khan Z., Bishop J.A., Westra W., Koch W.M., Califano J.A.: Saliva and plasma quantitative polymerase chain reaction-based detection and surveillance of human papillomavirus-related head and neck cancer. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.* **140**, 846–854 (2014)
79. Hindson C.M., Chevillet J.R., Briggs H.A., Gallichotte E.N., Ruf I.K., Hindson B.J., Vessella R.L., Tewari M.: Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat. Methods*, **10**, 1003–1005 (2013)
80. Chera B.S., Gupta G.P. i wsp.: Rapid Clearance Profile of Plasma Circulating Tumor HPV Type 16 DNA during Chemoradiotherapy Correlates with Disease Control in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **25**, 4682–4690 (2019)
81. Hanna G.J., Supplee J.G., Kuang Y., Mahmood U., Lau C.J., Haddad R.I., Jänne P.A., Paweletz C.P. Plasma HPV cell-free DNA monitoring in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer. *Ann. Oncol.* **29**, 1980–1986 (2018)
82. Dahlstrom K.R., Li G., Hussey C.S., Mahmood U., Lau C.J., Haddad R.I., Jänne P.A., Paweletz C.P.: Circulating human papillomavirus DNA as a marker for disease extent and recurrence among patients with oropharyngeal cancer. *Cancer*, **121**, 3455–3464 (2015)
83. Dok R., Nuyts S.: HPV Positive Head and Neck Cancers: Molecular Pathogenesis and Evolving Treatment Strategies. *Cancers*, **8**, 41 (2016)
84. Kawecki A., Nawrocki S., Golusiński W., Grzesiakowska U., Jassem J., Krajewski R., Olszewski W.: Nowotwory nabłonkowe narządów głowy i szyi. Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych. Sierpień 2014r. [http://onkologia.zalecenia.med.pl/pdf/zalecenia\\_PTOK\\_tom1\\_01\\_Nowotwory\\_nablonkowe\\_glowy\\_i\\_szyi\\_20140807.pdf](http://onkologia.zalecenia.med.pl/pdf/zalecenia_PTOK_tom1_01_Nowotwory_nablonkowe_glowy_i_szyi_20140807.pdf) (16.06.2020)
85. Hanna G.J., Lau C.J., Mahmood U., Supplee J.G., Mogili A.R., Haddad R. Jänne P.A., Paweletz C.P.: Salivary HPV DNA informs locoregional disease status in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* **95**, 120–126 (2019)
86. Lell M., Baum U., Greess H., Nömayr A., Nkenke E., Koester M., Lenz M., Bautz W.: Head and neck tumors: imaging recurrent tumor and post-therapeutic changes with CT and MRI. *Eur. J. Radiol.* **33**, 239–247 (2000)
87. Rutkowski T.W., Widłak P.: Circulating HPV16 DNA may complement imaging assessment of early treatment efficacy in patients with HPV-positive oropharyngeal cancer. *J. Transl. Med.* **18**, 1–10 (2020)

## COLIFAGI SOMATYCZNE JAKO WSKAŹNIK W OCENIE JAKOŚCI WODY DO PICIA

Marta Bartosik, Łukasz Mąka, Renata Matuszewska\*

Zakład Bezpieczeństwa Zdrowotnego Środowiska, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy

Wpłynęło w kwietniu, zaakceptowano w grudniu 2021 r.

**Streszczenie:** Colifagi są wirusami bakteryjnymi, które od wielu lat są przedmiotem badań mających na celu między innymi określenie ich przydatności i zastosowania jako wskaźników zanieczyszczenia kałowego oraz obecności wirusów chorobotwórczych w wodzie. Retrospektywne badania występowania epidemii chorób wodopochodnych wykazały, że opieranie się jedynie na założeniach związanych z brakiem lub obecnością bakterii *Escherichia coli*, może nie być wystarczające do oceny bezpieczeństwa wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Colifagi w porównaniu ze wskaźnikami bakteryjnymi, wykazują większą odporność na dezynfekcję i utrzymywanie się w znacznych odległościach od źródła zanieczyszczenia. Ich zastosowanie w celu wzmocnienia kontroli i bezpieczeństwa wody do picia zostało zarekomendowane przez ekspertów WHO i wprowadzone w dyrektywie (UE) 2020/2184. Colifagi somatyczne są nowym wskaźnikiem jakości mikrobiologicznej wody, w tym występowania wirusów jelitowych i mogą służyć do weryfikacji procesów uzdatniania wody i oceny ich skuteczności w usuwaniu chorobotwórczych wirusów.

1. Wprowadzenie. 2. Colifagi somatyczne. 3. Występowanie colifagów somatycznych w środowisku. 4. Wrażliwość na wybrane czynniki środowiskowe. 4.1. Temperatura. 4.2. Promieniowanie słoneczne. 4.3. Zasolenie. 4.4. Kwasowość (pH) środowiska. 5. Odporność colifagów somatycznych na procesy oczyszczania i dezynfekcji wody oraz ścieków. 6. Metody badań colifagów somatycznych w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. 6.1. Hodowlane metody oznaczania colifagów somatycznych. 6.2. Szybkie testy do badań colifagów somatycznych. 7. Zastosowanie colifagów somatycznych w ocenie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi

### SOMATIC COLIPHAGES AS AN INDICATOR IN DRINKING WATER QUALITY ASSESSMENT

**Abstract:** Coliphages are bacterial viruses that have been tested for many years to determine their usefulness as indicators of faecal contamination and presence of human viral pathogens in water. Retrospective analyzes of water-borne outbreaks have shown that *E. coli* tests are not enough to assure the safety of water intended for human consumption. Coliphages are more resistant to disinfection in comparison with bacterial indicators and are able to survive at considerable distance from source of contamination. Using of coliphages as indicators, to ensure better control and safety of drinking water had been recommended by WHO experts and introduced in Directive (EU) 2020/2184. Somatic coliphages are new indicators of water microbiological quality assessment, including indication of intestinal viruses. They can be used to verify processes of water treatment and to assess efficiency of removing intestinal viruses.

1. Introduction. 2. Somatic coliphages. 3. Occurrence of somatic coliphages in the environment. 4. Susceptibility to environmental factors. 4.1. Temperature. 4.2. Sunlight. 4.3. Salinity. 4.4. Acidity of the environment. 5. Resistance to the processes of disinfection and treatment of wastewater and water. 6. Testing methods in water intended for human consumption. 6.1. Culture methods for somatic coliphages. 6.2. Rapid tests for somatic coliphages. 7. Somatic coliphages in quality assessment of water intended for human consumption

**Słowa kluczowe:** colifagi somatyczne, dyrektywa (UE) 2020/2184, metody badań, woda przeznaczona do spożycia

**Keywords:** somatic coliphages, Directive (EU) 2020/2184, testing methods, water intended for human consumption

### 1. Wprowadzenie

Systematyczna kontrola wskaźników zanieczyszczenia kałowego, takich jak *Escherichia coli* czy enterokoki kałowe jest jednym z głównych elementów zapewnienia odpowiedniej jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi pod względem mikrobiologicznym [10, 15, 51, 66]. W zanieczyszczonych wodach ze względu na obecność w dużej liczbie bakterii *E. coli*, w większości przypadków monitoring tego parametru powinien zapewniać wysoki stopień bezpieczeństwa wody oraz wiarygodności co do jej jakości [66]. Jednak wyniki nie-

których badań wskazują również na niedoskonałości wykorzystania *E. coli* jako organizmu wskaźnikowego między innymi względem wirusów chorobotwórczych, czy pierwotniaków pasożytniczych. Wirusy i pierwotniaki są bardziej odporne na warunki środowiskowe i konwencjonalne technologie uzdatniania, w tym filtrację i dezynfekcję, a tym samym mogą być obecne w uzdatnionej wodzie do picia pomimo niewykrywalności bakterii *E. coli* [15, 29, 66]. Stąd prowadzone są poszukiwania wskaźników wzmacniających kontrolę i podnoszących bezpieczeństwo wody. Jednocześnie pojawiają się zalecenia ekspertów, aby podejmować

\* Autor korespondencyjny: dr Renata Matuszewska, Zakład Bezpieczeństwa Zdrowotnego Środowiska, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel: +48 (22) 54-21-374; e-mail: rmatuszewska@pzh.gov.pl

Tabela I  
Przedstawiciele i charakterystyka colifagów

Przykład	Typ	Rodzina	Kwas nukleinowy	Budowa
T2, T4	Colifagi somatyczne	<i>Myoviridae</i>	dsDNA	Ogonek składający się z wewnętrznej struktury rdzeniowej otoczonej kurczliwą osłonką
$\lambda$ , T1	Colifagi somatyczne i bakteriofagi <i>Bacterioides</i>	<i>Siphoviridae</i>	dsDNA	Długi, niekurczliwy ogonek, bez otoczki
P22	Colifagi somatyczne	<i>Podoviridae</i>	dsDNA	Krótki, niekurczliwy ogonek, bez otoczki
phiX174	Colifagi somatyczne	<i>Microviridae</i>	dsDNA	Bez otoczki, izometryczny
PR772	F-specyficzne bakteriofagi DNA	<i>Tectiviridae</i>	dsDNA	Brak ogonka, sześcienny kapsyd bez otoczki
MS2, Q $\beta$	F-specyficzne bakteriofagi RNA	<i>Leviviridae</i>	ssRNA	Bez otoczki, izometryczny
M13	F-specyficzne bakteriofagi DNA	<i>Inoviridae</i>	ssDNA	Bez otoczki, pałeczkowaty

działania w kierunku włączenia nowych parametrów mikrobiologicznych do rutynowych badań wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [67]. Jednym z proponowanych rozwiązań jest rozszerzenie wykonywanych badań o analizy w kierunku wykrywania wirusów bakteryjnych (bakteriofagów, w skrócie fagów) w wodzie. Mogą one być użyteczne jako wskaźniki zanieczyszczenia kałowego oraz „organizmy” modelowe przydatne w ocenie skuteczności usuwania z wody wirusów chorobotwórczych, za pomocą procesów filtracji lub efektywności procesów dezynfekcji [7, 8, 15, 18, 48, 54, 65, 66]. Wśród licznej grupy przedstawicieli fagów bakteryjnych, duże zainteresowanie w zakresie ich wykorzystania do powyższych celów wzbudzają colifagi, w tym colifagi somatyczne oraz F-specyficzne bakteriofagi RNA [16, 17, 18, 19, 21, 27, 29, 46]. Znalazło to również potwierdzenie w dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2020/2184 z dnia 16 grudnia 2020 r., która wprowadza colifagi somatyczne jako nowy parametr operacyjny oznaczany w wodzie surowej, w celu kontrolowania skuteczności procesów uzdatniania, w odniesieniu do ryzyka mikrobiologicznego [10].

## 2. Colifagi somatyczne

Bakteriofagi infekujące *E. coli*, jak również inne rodzaje bakterii należące do grupy coli określane są jako colifagi [15, 46, 66]. Wśród nich, dwie podstawowe grupy brane są pod uwagę jako wskaźniki jakości wody: colifagi somatyczne oraz F-specyficzne bakteriofagi RNA. Te dwie grupy różnią się między sobą przede wszystkim rodzajem kwasu nukleinowego, z którego zbudowany jest genom oraz mechanizmem infekowania komórki *E. coli*. Colifagi somatyczne posiadają genom w postaci dsDNA lub ssDNA i infekują komórki bakteryjne (komórki gospodarza) poprzez wiązanie się z receptorami występującymi na powierzchni komórki. Natomiast F-specyficzne bakteriofagi RNA (colifagi F-RNA) posiadają genom w postaci ssRNA i wywołują zakażenie poprzez adhezję do fimbrii płciowych *E. coli*,

które wytwarzane są tylko przez bakterie będące nosicielami plazmidu płciowego F [46, 66]. Fagi te podzielono na grupy serologiczne I–IV, których genotypy identyfikowane są przy użyciu technik molekularnych [66]. Ze względu na wskaźnikowy charakter wykorzystania obu grup, wskazuje się również na podobieństwa colifagów somatycznych do adenowirusów, a F-specyficznych bakteriofagów RNA między innymi do enterowirusów, astrowirusów, czy wirusów zapalenia wątroby typu A i E [27]. Colifagi somatyczne to przedstawiciele licznych rodzin bakteriofagów (*Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Microviridae*) wykazujące różne typy morfologiczne [21, 27]. W przeciwieństwie do nich, F-specyficzne bakteriofagi RNA tworzą grupę podobnych morfologicznie fagów należących do rodziny *Leviviridae* (Tabela I).

Colifagi są niepatogenne dla ludzi i wydalane z kałem przez zwierzęta stałocieplne [8, 15, 18, 27]. Colifagi somatyczne namnażają się w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, ale nie tylko, ponieważ w naturalnych środowiskach wodnych do replikacji mogą wykorzystywać jako gospodarzy inne bakterie niż *E. coli*, m.in. bakterie z rodzaju *Klebsiella* spp., *Shigella* sp. [18, 21]. W odróżnieniu od nich, replikacja colifagów F-RNA zachodzi głównie w przewodzie pokarmowym zwierząt stałocieplnych, a nie ma miejsca w warunkach środowiskowych [18, 29].

## 3. Występowanie colifagów somatycznych w środowisku

Bakteriofagi są jedną z najliczniejszych grup organizmów występujących na Ziemi. Ich obecność była wykrywana w wodach głębinowych, powierzchniowych, ściekach oraz w glebie [8, 22, 26, 35, 62]. Colifagi somatyczne są wydalane z kałem przez większość ludzi i zwierząt [8, 15, 18, 29, 66]. F-specyficzne bakteriofagi RNA wydalane są natomiast przez ludzi i zwierzęta w różnym, zwykle niższym, odsetku [8, 66]. Colifagi F-RNA z grupy I i IV wykrywano dotychczas wyłącznie



w odchodach zwierząt (głównie bydła), natomiast fagi z grupy III wykrywane były w odchodach ludzkich. Fagi z grupy II wykrywano zasadniczo tylko w odchodach ludzkich, poza przypadkiem stwierdzenia ich w 28% próbek kału świń [8, 66]. Colifagi somatyczne mogą występować w dużych ilościach w ściekach i zanieczyszczonych środowiskach wodnych [15]. Liczba cząstek colifagów somatycznych w ściekach może wynosić nawet  $10^6$ – $10^8$  na liter [4, 18, 36]. Według niektórych autorów liczba colifagów somatycznych w ściekach i wodzie surowej może 2–5-krotnie przewyższać liczbę colifagów F-RNA i około 500-krotnie liczbę ludzkich wirusów patogennych [18, 27]. Zarówno colifagi somatyczne jak i F-specyficzne bakteriofagi RNA wykrywane są w wodach jezior i rzek w liczbie do  $10^5$  cząstek na liter [18].

Badania nad częstością występowania bakteriofagów, w tym colifagów w środowisku wodnym prowadzone są od wielu lat [8, 17, 18, 21, 22, 26, 29, 37, 68]. Niestety dane nie są spójne, między innymi ze względu na wiele czynników, które wpływają na występowanie, zdolność przetrwania i rozwój fagów w różnych środowiskach wodnych. Wśród tych czynników, należy wymienić liczebność komórek gospodarza, jak i samych wirusów, zdolność wirusów do adhezji do cząstek stałych, obecność zwłaszcza materii organicznej, która wpływa na aktywność metaboliczną bakterii, promieniowanie słoneczne, temperaturę, pH, stężenie i rodzaj jonów w wodzie oraz aktywność metaboliczną mikroorganizmów innych niż bakterie gospodarza [61].

#### 4. Wrażliwość colifagów somatycznych na wybrane czynniki środowiskowe

Wpływ czynników środowiskowych na zdolność przetrwania fagów była badana w warunkach laboratoryjnych oraz środowiskowych [22]. Danych uzyskanych w warunkach środowiskowych jest jednak znacznie mniej. Wpływ temperatury, światła słonecznego, zasolenia, pH na colifagi w dużej mierze związany jest z ich morfologią. Wykazano, że takie cechy jak obecność ogonków, duże kapsydy i brak otoczki wpływają na ich większą odporność na czynniki zewnętrzne [22]. Przy czym z powodu wielu zmiennych, które wpływają na zdolność przetrwania i replikację fagów, trudno jest usystematyzować i przewidzieć występowanie oraz zachowanie fagów w środowisku wodnym.

##### 4.1. Temperatura

Temperatura jest jednym z kluczowych czynników wpływających na zdolność przetrwania bakteriofagów [44]. Odgrywa ona istotną rolę między innymi na etapie adhezji, wnikania i replikacji fagów. W przypadku colifagów F-RNA, decydujące są warunki wytwarzania przez bakterie F-fimbrii wyłącznie w fazie wzrostu

logarytmicznego, w temperaturze powyżej  $30^{\circ}\text{C}$ , co precyzyjnie determinuje, że do ich replikacji dochodzi wyłącznie w przewodzie pokarmowym zwierząt stałocieplnych. Jest to również zmienna, która koreluje z utrzymywaniem się colifagów w warunkach środowiskowych [22, 43, 69]. Badania wpływu tego czynnika na zdolność do przetrwania colifagów somatycznych w środowiskach wodnych wykazały, że fagi te, podobnie jak wirusy jelitowe, występowały częściej i przez dłuższy czas w środowiskach naturalnych, w niższych temperaturach (np. woda morska, rzeki, woda podziemna) [32]. W temperaturze niższej niż optymalna, przemieszczanie się fagów jest spowolnione, a proces adsorpcji faga do komórki gospodarza zaburzony. W konsekwencji mniej cząstek faga wnika do bakteryjnych komórek gospodarza, natomiast wyższa temperatura może wydłużać fazę uśpienia, w wyniku czego czas od etapu infekcji komórki do namnożenia faga będzie wydłużony [63].

Przeprowadzona przez Bertrand i wsp. (2012) meta-analiza danych w zakresie wpływu temperatury na inaktywację wirusów jelitowych oraz bakteriofagów m.in. w ściekach i wodzie (woda do picia, podziemna, woda morska) wykazała, że inaktywacja wirusów przebiega szybciej w temperaturach  $\geq 50^{\circ}\text{C}$  w porównaniu do niższych temperatur. Testowany w badaniach colifag somatyczny phiX174 wykazywał wysoką stabilność we wszystkich wymienionych wyżej warunkach, w zakresie temperatur  $0$ – $100^{\circ}\text{C}$ , szczególnie w wyższych temperaturach (podobnie jak colifagi F-RNA). W wyższych temperaturach colifagi somatyczne i colifagi F-RNA wykazywały większą odporność w porównaniu do wirusów jelitowych [5]. Z kolei wyniki badań Lee i Sobsey (2011) dotyczące wpływu temperatury na inaktywację różnych colifagów somatycznych (T4, phiX174,  $\lambda$  T1, T7), w próbkach wody powierzchniowej oraz w wodzie o czystości laboratoryjnej wykazały, że colifagi T4, phiX174 i  $\lambda$  dłużej utrzymywały się w niskich ( $4^{\circ}\text{C}$ ) i wyższych temperaturach ( $25^{\circ}\text{C}$ ) w porównaniu z T1 i T7.

Wyraźne różnice w odporności na wysoką temperaturę pomiędzy naturalnie występującymi bakteriami a colifagami somatycznymi, zaobserwowali w swoich badaniach Mocé-Llivina i wsp. (2003). W doświadczeniu, obróbce cieplnej poddawano ścieki surowe, inkubując je w temperaturze  $60^{\circ}\text{C}$  przez 30 min. oraz osad, inkubując w temperaturze  $80^{\circ}\text{C}$  przez 30 min. i 90 min. W obu eksperymentach colifagi somatyczne wykazywały większą odporność. Redukcja liczby drobnoustrojów po 30 min. i 90 min. inkubacji wynosiła ponad  $3,6 \log_{10}$  dla *E. coli* w próbkach osadu. Colifagi F-RNA były redukowane o  $1,3 \log_{10}$  po 30 min. i ponad  $3,4 \log_{10}$  po 90 min., natomiast colifagi somatyczne odpowiednio o  $0,6 \log_{10}$  i  $3,0 \log_{10}$ . Eksperyment z wykorzystaniem ścieków surowych wykazał redukcję colifagów somatycznych o  $0,8 \log_{10}$  w porównaniu z redukcją  $6,2 \log_{10}$  dla *E. coli* i  $2,1 \log_{10}$  dla colifagów F-RNA [41].

## 4.2. Promieniowanie słoneczne

Promieniowanie słoneczne jest kolejnym czynnikiem mającym wpływ na inaktywację wirusów, w tym colifagów somatycznych [22, 33]. Zaobserwowano korelację pomiędzy stopniem inaktywacji środowiskowych izolatów colifagów somatycznych pod wpływem promieniowania słonecznego, a wielkością genomu. Izolaty posiadające większe genomy wykazywały wyższy wskaźnik inaktywacji [33]. Z kolei wyniki badań Sinton i wsp. (1999) wykazały, że ekspozycja próbek wody morskiej i ścieków na promieniowanie słoneczne zwiększa tempo rozpadu cząstek colifagów somatycznych i innych bakteriofagów oraz bakterii z grupy coli typu kałowego, w porównaniu z próbkami bez dostępu światła [58]. Wyniki kolejnych badań prowadzonych przez Sinton i wsp. na próbkach wody świeżej pochodzącej z rzeki, wody morskiej oraz wody będącej odpowiednikiem wody z estuarium (50% wody z rzeki + 50% wody morskiej) wykazały wolniejsze tempo rozpadu kapsydów colifagów somatycznych oraz F-specyficznych bakteriofagów RNA w porównaniu z bakteriami *E. coli*, innymi bakteriami grupy coli typu kałowego i enterokokami [59]. Colifagi somatyczne występujące w wodzie z rzeki okazały się również nieznacznie bardziej wrażliwe na promieniowanie słoneczne w porównaniu z colifagami F-RNA. Natomiast w wodzie morskiej, colifagi somatyczne wykazywały większą odporność [5].

## 4.3. Zasolenie

Dane piśmiennictwa wskazują, że wraz ze wzrostem zasolenia rośnie stopień inaktywacji colifagów [58, 59]. Woda morska to przede wszystkim roztwór NaCl. Jony sodu i chloru stanowią ponad 86% związków soli w wodzie. Średnie zasolenie wód morskich wynosi 35 g/litr. W innych rodzajach wód naturalnych stężenie jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  jest znacznie mniejsze [42]. W wielu analizach środowiskowych potwierdzono powszechne występowanie colifagów somatycznych w wodach morskich [9, 21, 34]. W badaniach prowadzonych na terenie Europy (Irlandia, Anglia, Francja, Hiszpania, Grecja), colifagi somatyczne izolowane były w 71–100% próbek wody morskiej pochodzącej z kąpielisk [9]. Częstotliwość wykrywania colifagów somatycznych w rzekach jest porównywalnie wysoka, jednak badania ilościowe wykazują że jest ich od 100 do 1000-krotnie więcej w porównaniu z wodą morską [9, 21]. Z kolei w wodach głębinowych, colifagi somatyczne występują znacznie rzadziej. W badaniach prowadzonych w krajach takich jak Kanada, Argentyna, Kolumbia, Francja, Hiszpania, Korea czy USA fagi te były izolowane w 8,7–53,6% próbek pochodzących ze studni i ujęć głębinowych [1, 21, 23, 30, 35, 37]. Jak wykazali Sinton i wsp. [58, 59] tempo inaktywacji colifagów somatycznych rośnie

wraz ze wzrostem zasolenia. Gdy hodowle prowadzono bez dostępu światła, tempo rozpadu cząstek colifagów somatycznych było 5,5-krotnie wyższe w wodzie słonej w porównaniu z wodą z rzeki, podczas gdy dla F-specyficznych colifagów RNA tempo rozpadu było 3,1-krotnie wyższe w tych samych warunkach. Gdy badania prowadzono w warunkach dostępu do światła słonecznego, tempo rozpadu colifagów somatycznych wzrosło 2,3-krotnie w wodzie słonej w porównaniu z wodą pochodzącą z rzeki. W tych samych warunkach, odnotowane tempo rozpadu kapsydów colifagów F-RNA było wyższe 1,4-krotnie. Powyższe wyniki wskazują, że colifagi somatyczne są bardziej wrażliwe na zasolenie w porównaniu z F-specyficznymi colifagami RNA.

## 4.4. Kwasowość (pH) środowiska

Do istotnych czynników wpływających na stabilność fagów jest pH środowiska. W badaniach nad stabilnością faga T7 inkubowanego w buforach o pH od 3 do 11 zaobserwowano, że najbardziej stabilny jest, gdy wartość pH wynosi od 6 do 8. Fag T7 inkubowany przez 2 tygodnie w buforze fosforanowym o pH = 7, w temperaturze 0,5–2°C, utracił 20% swojej początkowej aktywności, czego wynikiem było obniżenie miana faga. Gdy wartość pH spadła poniżej 4, już po 96 godz. fag ten utracił niemal całkowicie zdolność do infekcji, a po inkubacji w buforach o pH < 3, przez 1 godzinę, w ogóle nie wykryto aktywnych cząstek wirusa. Inkubacja faga T7 w buforach o wyższym pH wykazała, że przy pH = 9.0 fag wykazywał 30% początkowej aktywności, tracąc ją niemal całkowicie po 24 godz. inkubacji w buforze o pH > 10 [22, 24]. W innych badaniach, fag T2 był stabilny w pH od 5 do 9, a najwyższą stabilność wykazywał przy pH w zakresie 5–6 [22, 56]. Z kolei Jepson i March (2004) badali aktywność faga  $\lambda$  w pH w zakresie 2–14. Po 24 godz. inkubacji w temperaturze pokojowej, badacze nie zauważyli znaczącego spadku miana faga przy pH w zakresie 3–11. Natomiast przy pH = 2.0 oraz powyżej wartości 11.8, fag  $\lambda$  tracił całkowicie swoją aktywność [20, 22]. Z kolei Kłak i wsp. (2010) badali wpływ pH na faga T4, prowadząc inkubację w buforach o pH w zakresie 1.1–9.2 w temperaturze 37°C, przez 1 godz. Stwierdzono, że optymalne pH wynosiło 6.0–7.4. Miano faga było o 50% niższe, gdy inkubację prowadzono w buforze o pH = 9.2, natomiast całkowitą aktywność fag utracił podczas inkubacji w pH = 4.0 [22, 25].

## 5. Odporność colifagów somatycznych na procesy oczyszczania i dezynfekcji wody oraz ścieków

Colifagi somatyczne są przez wielu autorów uznawane jako organizmy użyteczne w celu oceny skuteczności procesów oczyszczania wody i ścieków [15, 19, 50].

Colifagi, lepiej niż kałowe bakterie wskaźnikowe naśladują utrzymywanie się patogennych wirusów w środowisku i podczas procesu oczyszczania wody oraz ścieków. Redukcja wirusów jelitowych człowieka oraz colifagów może przebiegać w podobny sposób na różnych etapach procesu oczyszczania ścieków [15, 19, 50, 64]. Według wielu doniesień, colifagi somatyczne przewyższają liczbą colifagi F-RNA w ściekach nieoczyszczonych oraz oczyszczonych [3, 14, 17, 18]. Ze względu na złożoność i wieloetapowość procesu oczyszczania ścieków, trudno jest wyciągnąć wnioski na podstawie publikowanych wyników badań, które nie dostarczają informacji co do specyfiki badanej matrycy oraz o warunkach procesu (np. pH, temperatura, dawka UV, stężenie lub forma stosowanego chloru itp.). Według danych z piśmiennictwa oczyszczanie ścieków z wykorzystaniem osadu czynnego pozwala na redukcję liczby colifagów somatycznych o  $2-2,4 \log_{10}$  [3, 50]. Natomiast stosując filtrację (m.in. z użyciem filtrów piaskowych, antracytowych czy antracytowo-piaskowych) odnotowano redukcję o ok.  $0,5 \log_{10}$ . Dezynfekcja ścieków środkami na bazie chloru oraz stosowanie promieniowania UV skutkowało redukcją o ok.  $0,5 \log_{10}$  [50]. Porównując poziom redukcji liczby ( $\log_{10}$ ) na różnych etapach oczyszczania ścieków, colifagi (w tym somatyczne), wykazywały wartości bliskie enterowirusom (ok.  $3-4 \log_{10}$ ), podczas gdy bakteryjne wskaźniki zanieczyszczenia kałowego zredukowane były na poziomie  $5-6 \log_{10}$  [50]. Według raportu z badań przeprowadzonych przez Rose i wsp. (2004), poziom zanieczyszczenia colifagami i wirusami w próbkach pobranych ze ścieków wpływających do sześciu analizowanych oczyszczalni nie był znacząco różny. Z kolei poziom zanieczyszczenia colifagami w próbkach ścieków wpływających z oczyszczalni, różnił się w zależności od stosowanych w danej oczyszczalni technologii [50]. Chociaż nie zaobserwowano korelacji między stężeniem colifagów i enterowirusów w oczyszczonych próbkach, autorzy stwierdzili, że w oparciu o poziom colifagów można wykluczyć obecność enterowirusów. Poziomy poniżej  $10 \text{ pfu}/100 \text{ ml}$  (zarówno colifagów F-RNA lub colifagów F-RNA w połączeniu z colifagami somatycznymi) wskazywały, że w próbkach tych nie były wykrywane enterowirusy [50].

## 6. Metody badań colifagów somatycznych w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi

Wirusy są obligatoryjnymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi i mogą replikować się tylko w żywych komórkach gospodarza, powodując ich lizę. Właściwość ta leży u podstawy metod hodowlanych do oznaczania bakteriofagów, w tym colifagów somatycznych. Metody hodowlane są powszechnie stosowane ze względu na łatwość wykonania, niezawodność,

niskie koszty i brak konieczności posiadania szczególnego wyposażenia laboratorium. Wadą ich jest to, że są pracochłonne, a wynik otrzymywany jest w czasie dłuższym niż jeden dzień roboczy. Dodatkowo badania próbek wody o dużych objętościach oraz próbek o niskiej liczbie fagów mogą wymagać przeprowadzenia dodatkowego etapu – zateżnienia. Alternatywnie możliwe jest zastosowanie coraz bardziej powszechnych szybkich testów, które są mniej pracochłonne, nie wymagają wstępnego zateżnienia próbek i umożliwiają uzyskanie wyników w krótszym czasie.

### 6.1. Hodowlane metody oznaczania colifagów somatycznych

Metody hodowlane stosowane do badań bakteriofagów, w tym colifagów somatycznych pozwalają na oznaczenie ich liczby (metody ilościowe) lub wykrycie obecności (metody jakościowe) w badanej próbce wody.

Metody ilościowe oparte są tzw. teście łysinkowym, opisanym już w 1959 roku [2]. Polega on na przygotowaniu mieszaniny badanej próbki, hodowli bakterii wrażliwych na faga i półpłynnego agaru. Mieszaninę przenosi się następnie na płytkę Petriego w celu zestalenia. Po inkubacji w temperaturze optymalnej dla wzrostu komórek gospodarza, w przypadku obecności fagów w badanej próbce, ich obecność wyrażana jest w postaci przejaśnień – łysinek na powierzchni murawy szczepu gospodarza [2]. Wyniki badań przedstawiane są jako liczba jednostek tworzących łysinki pfp – plaque forming particles) [11] lub pfu (plaque forming units) [11, 14] w objętości próbki. Colifagi są różnorodną grupą wirusów, które tworzą łysinki o różnej morfologii i średnicy od 1 do 10 mm [14]. Dodatkowym utrudnieniem w odczycie może być specyfika próbki i obecność mikroflory towarzyszącej. Do ułatwienia wizualizacji łysinek może być stosowany TTC (chlorek 2,3,5-trifenyloctetrazoliowy) nadający komórkom gospodarza kontrastowe różowe zabarwienie [45]. Metoda łysinkowa występuje w dwóch wariantach: SAL (single agar layer) – metoda płytek jednowarstwowych [14] i DAL (double agar layer) – metoda płytek dwuwarstwowych [11]. Różnica pomiędzy nimi polega na dodatkowej warstwie podłoża stałego pod warstwą półpłynnego agaru w metodzie DAL. Warstwa ta ma za zadanie zapewnienie bardziej stabilnego podłoża dla warstwy półpłynnego agaru. Metody jakościowe składają się z dwóch etapów: etapu namnażania i etapu testu kropelkowego. Metody te mogą być stosowane również w formie NPL (najbardziej prawdopodobnej liczby), co umożliwia uzyskanie wyniku ilościowego.

Metody hodowlane mające zastosowanie do oznaczania colifagów somatycznych w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi to rekomendowane obecnie przez dyrektywę UE [10] metody znormalizowane

Tabela II

Metody rekomendowane do oznaczania colifagów somatycznych w próbkach wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi

Metoda	Parametr/ zastosowanie	Matryca	Rodzaj metody	Objętość próbki	Czułość	Czas uzyskania wyniku
<b>ISO 10705-2:2000</b>	colifagi somatyczne	wszystkie rodzaje wody, osady, ścieki ekstrakty z mięczaków	jakościowa ilościowa	1 ml 5 ml	1 pfu/ objętość	24–48 godz.
<b>ISO 10705-3:2003</b>	walidacja i przykłady metod zateżania bakteriofagów	wszystkie rodzaje wody	nie dotyczy	zależnie od metody zateżania	zależnie od metody zateżania	zależnie od metody zateżania
<b>EPA Method 1601:2001</b>	colifagi somatyczne, F-specyficzne bakteriofagi RNA	wody podziemne, inne rodzaje wody	jakościowa	100 ml 1000 ml	1 pfu/objętość	24–48 godz.
<b>EPA Method 602:2001</b>	colifagi somatyczne, F-specyficzne bakteriofagi RNA	wody podziemne, inne rodzaje wody	ilościowa	100 ml	1 pfu/objętość	24 godz.

EN-ISO 10705-2:2000 [11] i EN-ISO 10705-3:2003 [12]. Na metodach hodowlanych opierają się także protokoły US EPA (*United States Environmental Protection Agency*) – EPA 1601:2001 [13] i EPA 1602:2001 [14]. W tabeli II przedstawiono przegląd jakościowych i ilościowych metod znormalizowanych. Główne różnice występują w składzie pożywek i odczynników oraz w stosowanych szczepach gospodarza bakteryjnego oraz objętościach badanych próbek.

Metoda opisana w normie EN-ISO 10705-2:2000 [11] przeznaczona jest do badania wszystkich rodzajów wód oraz osadów i ścieków. Umożliwia oznaczenia ilościowe i jakościowe colifagów somatycznych. Norma wskazuje różne szczepy bakteryjnego gospodarza w zależności od specyfiki badanych próbek. Dla próbek o małej liczbie bakterii gospodarzem jest szczep *E. coli* ATCC 13706, a w przypadku próbek o spodziewanej dużej liczbie bakterii, szczep *E. coli* ATCC 700078 oporny na kwas nalidyksowy. Do przygotowania materiału referencyjnego stosowany jest bakteriofag phiX174 (ATCC 13706-B1). Fag phiX174 jest colifagiem somatycznym należącym do rodziny *Microviridae*, dla którego gospodarzem są bakterie *E. coli*. Występuje on powszechnie w populacji fagowej ścieków i charakteryzuje się stosunkowo dużą zdolnością przetrwania w warunkach środowiskowych, wykazując znaczną odporność między innymi na działanie wysokiej temperatury oraz promieniowania UV [28].

Przedstawiona w normie metoda ilościowa oparta jest na metodzie płytek dwuwarstwowych DAL. Objętość próbki badanej wynosi 1 ml lub 5 ml dla próbek o niskiej liczbie fagów. Wyniki uzyskiwane są w czasie około 24 godzin i przedstawiane jako liczba pfp lub pfu w określonej objętości próbki. W przypadku oznaczeń jakościowych wynik uzyskiwany jest w czasie około 48 godz. i odczytywany jest jako obecne/nieobecne w 1 ml. W obu przypadkach możliwe jest badanie

próbek o większej objętości, ale konieczne jest wtedy zastosowanie większych objętości pożywek.

Niekiedy bakteriofagi w wodzie mogą być obecne w zbyt niskich stężeniach, aby można było je oznaczać za pomocą bezpośredniej analizy. W takich przypadkach badanie próbek wody w ich kierunku może być procesem wieloetapowym obejmującym etap zateżania, po którym dopiero następuje właściwy etap oznaczania ilościowego [69]. W przypadku metody ilościowej dla próbek o bardzo niskiej liczbie fagów norma wskazuje na konieczność wstępnego zateżania badanych próbek. Również w przypadku próbek o dużej objętości zalecane jest ich zateżanie. Etap zateżania próbek wydłuża dodatkowo całkowity czas potrzebny na uzyskanie wyniku, przy czym jest on różny w zależności od zastosowanej metody zateżania [12]. Ważnym aspektem badania jest wpływ procesu zateżania próbek wody na odzysk bakteriofagów. Poziom odzysku zależy od wielu czynników takich jak metoda zateżania, rodzaj próbki wody (m.in. mętność, poziom zanieczyszczenia), objętość próbki, ilość i różnorodność bakteriofagów w próbce [38]. Etap zateżania został opisany w EN-ISO 10705-3:2003, która określa ogólne zasady oceny przydatności metod zateżania bakteriofagów do danego celu, rodzaju i objętości próbek wody. Norma podaje przykłady metod zateżania, które mogą być stosowane dla wszystkich rodzajów wód, pod warunkiem, że pozwala na to ich specyfika (ilość i charakter zawiesin i substancji rozpuszczonych). Jedną z metod zateżania opisanych w EN ISO 10705-3:2003 jest metoda filtracji membranowej. Metoda ta jest rekomendowana dla zateżania F-specyficznych bakteriofagów RNA w próbkach o objętości 100–1000 ml i mętności < 2 NTU. Dane literaturowe wskazują, że metoda ta może być z powodzeniem wykorzystywana także do zateżania colifagów somatycznych, a ich odzysk osiągnięty jest na poziomie nieco ponad 80% [37]. W przypadku colifagów somatycznych dobre wyniki zateżania mogą

być uzyskiwane również innymi wariantami metody filtracji membranowej [14, 19, 38, 55, 57]. W przypadku próbek o mętności  $>2$  NTU do zateżnienia colifagów somatycznych może mieć zastosowanie metoda flokulacji wodorotlenkiem magnezu [12].

Protokół EPA 1602 [14] przedstawia metodę ilościową płytek jednowarstwowych SAL, z kolei protokół EPA 1601 [13] dwuetapową metodę jakościową. Protokoły te przeznaczone są do oznaczania F-specyficznych bakteriofagów RNA oraz colifagów somatycznych. Mogą być stosowane do badania wód podziemnych i innych, przy czym ich walidacja została przeprowadzona tylko dla wód podziemnych. Metoda jakościowa EPA 1601 może być stosowana dodatkowo w formacie NPL, jednak nie została pod tym względem zwalidowana. Gospodarzem bakteryjnym dla colifagów somatycznych jest oporny na kwas nalidyksowy szczep *E. coli* CN13 (ATCC 700609), a fagiem referencyjnym bakteriofag phiX174 (ATCC 13706-B1). Badane objętości próbek wody to 100 ml w metodzie ilościowej EPA 1602 oraz 100 ml i 1000 ml w metodzie jakościowej EPA 1601. Wynik badania uzyskuje się w czasie 24–48 godzin.

## 6.2. Szybkie testy do badań colifagów somatycznych

Alternatywą dla oznaczania colifagów somatycznych klasycznymi metodami hodowlanymi mogą być tzw. szybkie testy. Testy te mogą być oparte na znormalizowanych metodach ISO i EPA. Umożliwiają one oznaczenia jakościowe oraz ilościowe colifagów somatycznych [6, 27, 39, 49, 52, 53]. Ich zastosowanie może obejmować różne matryce, w tym wodę, ścieki i osady. W zależności od rodzaju testu, celu badania i specyfiki próbek, szybkie testy umożliwiają badanie różnych objętości: 1 ml, 10 ml i 100 ml. Czas uzyskania wyników to od kilku do 24 godzin. Trwają prace nad kolejnymi formułami testów umożliwiającymi badanie próbek o objętości 100 ml oraz rozwiązaniami redukującymi czas przygotowania hodowli gospodarza, mającymi bezpośrednio przełożenie na otrzymanie wyników w jeszcze krótszym czasie [47]. Ze względu na różnorodność colifagów somatycznych pewne trudności sprawia zastosowanie do ich oznaczania metod molekularnych i serologicznych. Metody molekularne oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) mogą być wykorzystywane do oznaczania całej subgrupy colifagów lub tylko F-specyficznych bakteriofagów RNA. Metody serologiczne znajdują zastosowanie do wykrywania F-specyficznych bakteriofagów RNA [15]. Prowadzone są również badania w zakresie zastosowania tych metod do badań colifagów somatycznych, a ich wyniki są obiecujące [28]. Warto podkreślić, że prowadzone są badania, których celem jest opracowanie powszechnie akceptowanych standardów i wytycznych dotyczących zateżnienia i oznaczania fagów, w tym colifagów somatycznych w środowiskach wodnych.

## 7. Zastosowanie colifagów somatycznych w ocenie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi

Największe ryzyko zagrożenia dla zdrowia ludzi związane z wodą pochodzi od patogenów kałowych, przenoszonych na skutek nieodpowiednich warunków sanitarnych, braku higieny i ochrony ujęć wody. Patogeny bytujące w wodzie (m.in. wirusy, bakterie, pierwotniaki) mogą powodować poważne i długotrwałe skutki zdrowotne. Głównym celem stosowania wskaźników mikrobiologicznych do oceny jakości wody, jest wskazanie na obecność organizmów patogennych, przede wszystkim pochodzenia kałowego. Obecnie ocena jakości wody do picia pod względem mikrobiologicznym oparta jest przede wszystkim na analizie parametrów bakteriologicznych [29]. O ile wskaźniki bakteryjne takie jak *E. coli* oraz enterokoki spełniają swoją rolę w stosunku do oceny występowania w wodzie bakterii chorobotwórczych, to w przypadku oceny występowania patogennych wirusów jelitowych nie dają już takiej pewności [8, 18, 28, 66]. Wirusy znacznie różnią się od bakterii zarówno pod względem budowy, przeżywalności w środowisku wodnym, odporności na środki dezynfekcyjne czy procesy uzdatniania wody [22, 66]. Okres infekcyjny u większości wirusów jelitowych w wodzie o temperaturze 20°C jest długi i wynosi ponad 1 miesiąc, z kolei w przypadku występujących w wodzie bakterii chorobotwórczych okres ten jest zwykle krótki, do 1 tygodnia lub średni od 1 tygodnia do 1 miesiąca [22, 66]. Wiele gatunków wirusów jest mniej wrażliwych niż bakterie, na konwencjonalne technologie uzdatniania wody, w tym filtrację i dezynfekcję [8, 19, 66]. W związku z powyższym wirusy chorobotwórcze mogą być obecne w uzdatnionej wodzie do picia, mimo nie wykrycia standardowo stosowanego wskaźnika bakteryjnego jakim jest *E. coli*. Retrospektywne badania występowania epidemii, których źródłem była woda do picia wykazały, że opieranie się jedynie na założeniach związanych z wykrywalnością bakterii *E. coli* nie zapewnia bezpieczeństwa wody jeżeli chodzi o patogeny należące do innych grup mikroorganizmów, w tym wirusów jelitowych. Stało się to podstawą opinii, że *E. coli* jest wskaźnikiem niewystarczającym oraz bodźcem do poszukiwania organizmów innych niż bakterie, które byłyby użyteczne jako modele lub zastępcze wskaźniki do oceny zachowania wirusów jelitowych w środowisku wodnym oraz ich wrażliwości na procesy uzdatniania i dezynfekcji wody [15, 27, 66, 67].

Przeprowadzona analiza wyników badań opublikowanych w latach 1999–2019, potwierdziła korelację między występowaniem w wodzie wirusów jelitowych i colifagów somatycznych lub colifagów F-RNA [27]. Wśród analizowanych badań, między innymi praca

Skraber i wsp. (2004) potwierdziła korelację między obecnością colifagów somatycznych, a występowaniem enterowirusów i norowirusów w wodzie powierzchniowej. Podobnie Mocé-Llivina i wsp. (2005) wykazali korelację między obecnością colifagów somatycznych i enterowirusów w próbkach wody pobranych z rzek, zanieczyszczonych ściekami. Również Lodder i wsp. (2010) w badaniach prowadzonych na ujęciach wody do picia opartych na rzekach, wskazał na korelację między występowaniem enterowirusów oraz colifagów somatycznych i colifagów F-RNA. W przypadku tych badań nie stwierdzono jednak takiej zależności pomiędzy colifagami somatycznymi a innymi wirusami jelitowymi (reowirusami, norowirusami, czy też rotawirusami).

Wśród najważniejszych cech colifagów somatycznych jako organizmów wskaźnikowych można wymienić: podobieństwo do kontrolowanych patogenów (m.in.: budowa, występowanie, wrażliwość na procesy uzdatniania i środki dezynfekcyjne), brak zdolności do namnażania się w wodzie i dostępność prostych metod badawczych, pozwalających uzyskać wiarygodne wyniki w krótkim czasie [8, 11, 13, 14, 18, 66].

Colifagi somatyczne, przypominają ludzkie wirusy jelitowe pod względem pochodzenia i uwalniania się do środowiska. Podobnie jak wirusy jelitowe mogą replikować się tylko w komórkach gospodarza [8]. W przypadku colifagów są to komórki bakterii *E. coli*, a w przypadku wirusów jelitowych są to komórki ludzi i innych zwierząt stałocieplnych. Optymalne warunki do replikacji zarówno wirusów jelitowych, jak i colifagów somatycznych, występują w przewodzie pokarmowym tych organizmów [8, 27]. Colifagi somatyczne, podobnie jak ich gospodarz *E. coli*, mogą występować w prawidłowej mikroflorze układu pokarmowego ludzi i zwierząt, nie powodując zachorowań [66]. Ludzkie wirusy jelitowe są uwalniane do środowiska prawie wyłącznie z przewodu pokarmowego, podobnie jak colifagi somatyczne, infekujące bakterie jelitowe, jakimi są *E. coli*. Colifagi somatyczne można wykrywać przy użyciu prostych metod badawczych opartych na hodowli na podłożach agarowych, a wyniki dostępne są w czasie 24–48 godzin [11, 13, 14, 22]. Powyższe cechy colifagów somatycznych sprawiają, że wydają się one być lepszym wskaźnikiem wirusów chorobotwórczych niż bakterie *E. coli*. W związku z tym mogą znaleźć zastosowanie w monitoringu prowadzonym w ramach nadzoru oraz weryfikacji poprawności działań, jako wskaźnik zanieczyszczenia kałowego ujęć wody [10, 27, 63]. Warto jednak zaznaczyć, że colifagi somatyczne, podobnie jak wskaźniki bakteryjne, nie są idealne. Jak opisują niektórzy badacze nie zawsze istnieje bezpośrednia korelacja między liczbą bakteriofagów *E. coli* a wirusów jelitowych, co nie czyni ich bezwzględnie wiarygodnym wskaźnikiem. Potwierdzono to, izolując

wirusy jelitowe z próbek uzdatnionej wody do picia poddanej dezynfekcji, w których standardowe oznaczenia colifagów dawały wynik ujemny [66].

Zapewnienie odpowiedniej ochrony ludzi przed patogenami jelitowymi, w szczególności wirusami i pierwotniakami pasożytniczymi, które mogą występować w wodzie do picia wiąże się z koniecznością wprowadzenia dodatkowych wymagań do zaleceń i przepisów prawnych dotyczących tego obszaru. Na ten aspekt zwracają uwagę również eksperci WHO w rekomendacjach z 2017 r., które są wsparciem dla przeglądu załącznika I do dyrektywy Rady 98/83/WE w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [67]. Opracowanie to wskazuje na potrzebę włączenia innych mikroorganizmów, między innymi takich jak bakteriofagi (colifagi somatyczne, F-specyficzne bakteriofagi RNA) jako bardziej odpowiednich do identyfikacji zagrożeń mikrobiologicznych, które mogą być nie wykryte przez dotychczas stosowane wskaźniki.

Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2020/2184 z dnia 16 grudnia 2020 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, wprowadza colifagi somatyczne jako dodatkowy wskaźnik do programu monitoringu operacyjnego, przy czym zwraca uwagę, że powinno to następować w odniesieniu do lokalnych okoliczności i wiedzy naukowej. Okoliczności takie mogą obejmować na przykład wykorzystywanie wody z ujęć zanieczyszczonych wirusami jelitowymi i pasożytami lub przypadki podejrzenia wystąpienia tego typu zanieczyszczenia na skutek dopływu ścieków zawierających odchody ludzkie lub ścieków pochodzących od zwierząt hodowlanych. Wartość dopuszczalna dla colifagów somatycznych w wodzie surowej wynosi 50 pfu w 100 ml. Według zapisów w dyrektywie parametr ten powinien być oznaczany w uzasadnionych przypadkach wynikających z oceny ryzyka. W przypadku wykrycia colifagów somatycznych w wodzie surowej w stężeniach powyżej 50 pfu/100 ml, wskazane jest przeprowadzenie analizy procesów na kolejnych etapach uzdatniania, aby oznaczyć wartość logarytmiczną usuwania colifagów przez występujące bariery oraz ocenić, czy ryzyko przedostania się wirusów chorobotwórczych zostało w wystarczającym stopniu zredukowane [10].

Wprowadzenie badań colifagów somatycznych w wodzie powinno stanowić uzupełnienie informacji pozyskanych w oparciu o wyniki badań parametrów bakteryjnych i dawać dodatkowe potwierdzenie, że procesy uzdatniania oraz dezynfekcji spełniają swoją rolę. Jednocześnie oznaczanie tego dodatkowego parametru może być istotnym krokiem w zwiększeniu bezpieczeństwa wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi.

#### Finansowanie

Praca została wykonana w ramach zadania badawczego BK-3/2020

## Piśmiennictwo

1. Abbaszadegan M., LeChevallier M., Gerba C.: Occurrence of viruses in U.S. groundwaters. *J. Am. Water. Work. Ass.* **95**, 107–120 (2003)
2. Adams M.H.: Bacteriophages. Interscience Publishers Inc, New York, 1959
3. Aw T.G., Gin K.Y.-H.: Environmental surveillance and molecular characterization of human enteric viruses in tropical urban wastewaters. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 716–730 (2010)
4. Bell R.G.: The limitation of the ratio of fecal coliforms to total coliphage as a water pollution index. *Water Res.* **10**, 745–748 (1976)
5. Bertrand I., Gantzer C. i wsp.: The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: A review. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 1059–1074 (2012)
6. Bluephage S.L. <https://bluephage.com/> (06.04.2021)
7. Bonilla N., Santiago T., Marcos P., Urdaneta M., Domingo J.S., Toranzos G.A.: Enterophages, a group of phages infecting *Enterococcus faecalis*, and their potential as alternate indicators of human faecal contamination. *Water Sci. Technol.* **61**, 293–300 (2010)
8. Cole D., Long S.C., Sobsey M.D.: Evaluation of F-i-RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Appl. Environ. Microb.* **69**, 6507–6514 (2003)
8. Contreras-Coll N., Jofre J. i wsp.: Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Res.* **36**, 4963–4974 (2002)
10. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2020/2184 z dnia 16 grudnia 2020 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020L2184&from=PL> (19.11.2021)
11. EN-ISO 10705-2:2000. Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages – Part 2: Enumeration of somatic coliphages. <https://www.iso.org/standard/20127.html> (19.11.2021)
12. EN-ISO 10705-3:2003 Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages – Part 3: Validation of methods for concentration of bacteriophages from water. <https://www.iso.org/standard/27806.html> (19.11.2021)
13. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Water. Method 1601: Male-specific (F<sup>+</sup>) and somatic coliphage in water by two-step enrichment procedure. EPA 821-R-01-030, Washington, DC, USA, 2001 [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/method\\_1601\\_2001.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/method_1601_2001.pdf) (19.11.2021)
14. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Water. Method 1602: Male-specific (F<sup>+</sup>) and somatic coliphage in water by single agar layer (SAL) Procedure. EPA 821-R-01-029, Washington, DC, USA, 2001 [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/method\\_1602\\_2001.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/method_1602_2001.pdf) (19.11.2021)
15. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Water, Office of Science and Technology, Health and Ecological Criteria Division: Review of coliphages as possible indicators of faecal contamination for ambient water quality. 820-R-15-098, Washington, DC, USA, 2015 [https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-07/documents/review\\_of\\_coliphages\\_as\\_possible\\_indicators\\_of\\_fecal\\_contamination\\_for\\_ambient\\_water\\_quality.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-07/documents/review_of_coliphages_as_possible_indicators_of_fecal_contamination_for_ambient_water_quality.pdf) (19.11.2021)
16. Gantzer C., Maul A., Audic J.M., Schwartzbrod L.: Detection of infectious enteroviruses, phages in treated wastewater coliphages, and *Bacteroides fragilis* enterovirus genomes, somatic. *Appl. Environ. Microb.* **64**, 4307–4312 (1998)
17. Grabow W.O.K., Holtzhausen C.S., De Villiers J.C.: Research on bacteriophages as indicators of water quality. WRC Report No 321/1/93. Water Research Commission, University of Pretoria, 147 (1993)
18. Grabow W.: Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA*, **27**, 251–268 (2001)
19. Havelaar A.H., van Olphen M., Drost Y.C.: F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in freshwater. *Appl. Environ. Microb.* **59**, 2956–2962 (1993)
20. Jepson C.D., March J.B.: Bacteriophage lambda is highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine*, **22**, 2413–2419 (2004)
21. Jofre J., Lucena F., Blanch A.R., Muniesa M.: Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water*, **8**, 199 (2016)
22. Jończyk E., Kłak M., Międzybrodzki R., Górski A.: The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiol.* **56**, 191–200 (2011)
23. Jung J.H., Yoo C.H., Koo E.S., Kim H.M., Na Y., Jheong W.H., Jeong Y.S.: Occurrence of norovirus and other enteric viruses in untreated groundwaters of Korea. *J. Water Health.* **9**, 544–555 (2011)
24. Kerby G.P., Godwy R.A., Dillon E.S., Dillon M.L., Csáky T.Z., Sharp D.G., Beard J.W.: Purification, pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of *Escherichia coli*. *J. Immunol.* **63**, 93–107 (1949)
25. Kłak M., Międzybrodzki R., Bubak B., Jończyk E., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Studies on the gastrointestinal transit and blood penetration of a therapeutic staphylococcal bacteriophage. Abstract no. 209, *First International Congr. Viruses of Microbes*, Paris (2010)
26. Kumari S., Harjai K., Chibber S.: Isolation and characterization of *Klebsiella pneumoniae* specific bacteriophages from sewage samples. *Folia Microbiol.* **55**, 221–227 (2010)
27. Lamy M.C., Sanseverino I., Niegowska M., Lettieri T.: Microbiological Parameters under the Drinking Water Directive. Current state of art on somatic coliphages and *Clostridium perfringens* and spores. EUR 29932 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-76-12593-8, doi:10.2760/005492, JRC118219 (2020)
28. Lee H.S.: Somatic coliphage families as potential indicators of enteric viruses in water and methods for their detection. University of North Carolina at Chapel Hill. Dissertation under the direction of Mark D. Sobsey (2009), <https://cdr.lib.unc.edu/concern/dissertations/th83m0562?locale=en> (19.11.2021)
29. Lin J., Ganesh A.: Water quality indicators: bacteria, coliphages, enteric viruses. *Int. J. Environ. Heal. R.* **23**, 484–506 (2013) DOI:10.1080/09603123.2013.769201
30. Locas A., Barthe C., Barbeau B., Carrière A., Payment P.: Virus occurrence in municipal groundwater sources in Quebec, Canada. *Can. J. Microbiol.* **53**, 688–694 (2007)
31. Lodder W.J., van den Berg H.H.J.L., Rutjes S.A., de Roda Husman A.M.: Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in The Netherlands. *Appl. Environ. Microb.* **76**, 5965–5971 (2010)
32. Long S.C., Sobsey M.D.: A comparison of the survival of F+RNA and F-t-DNA coliphages in Lake Water Microcosms. *J. Water Health.* **2**, 15–22 (2004)
33. Love D., Silverman A., Nelson K.L.: Human virus and bacteriophage inactivation in clear water by simulated sunlight compared to bacteriophage inactivation at a southern California beach. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 6965–6970 (2010)
34. Love D.C., Rodriguez R.A., Gibbons C.D., Griffith J.F., Yu Q., Stewart J.R., Sobsey M.D.: Human viruses and viral indicators in marine water at two recreational beaches in Southern California, USA. *J. Water Health.* **12**, 136–150 (2014)

35. Lucena F, Ribas F, Duran A.E., Skrabber S., Gantzer C., Campos C., Morón A., Calderón E., Jofre J.: Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in groundwater in different geographical areas. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 96–102 (2006)
36. Mandilara G., Mavridou A., Lambiri M., Vatopoulos A., Rigas F.: The use of bacteriophages for monitoring the microbiological quality of sewage sludge. *Environ. Technol.* **27**, 367–375 (2006)
37. Méndez J., Audicana A., Cancer M., Isern A., Llana J., Moreno B., Navarro M., Tarancón M.L., Valero F., Ribas F.: Assessment of drinking water quality using indicator bacteria and bacteriophages. *J. Water Health.* **2**, 201–214 (2004)
38. Méndez J., Audicana A., Isern A., Llana J., Moreno B., Tarancón M.L., Jofre J., Lucerna F.: Standardised evaluation of the performance of a simple membrane filtration-elution method to concentrate bacteriophages from drinking water. *J. Virol. Methods.* **117**, 19–25 (2004)
39. Méndez J., Toribio-Avedillo D., Mangas-Casas, R., Martínez-González J.: Bluephage, a method for efficient detection of somatic coliphages in one hundred milliliter water samples. *Nature Sci. Rep.* **10**, 2977 (2020)
40. Mocé-Llivina, L., Lucena, F., Jofre, J.: Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters. *Appl. Environ. Microb.* **71**, 6838–6844 (2005)
41. Mocé-Llivina L., Muniesa M., Pimenta-Vale H., Lucena F., Jofre J.: Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Appl. Environ. Microb.* **69**, 1452–1456 (2003)
42. Murray, J. Major ions of seawater. University of Washington, Seattle, WA, 2004 [http://www.ocean.washington.edu/courses/oc400/Lecture\\_Notes/CHPT4.pdf](http://www.ocean.washington.edu/courses/oc400/Lecture_Notes/CHPT4.pdf) (26.02.2021)
43. Niemi M.: Survival of *Escherichia coli* phage T7 in different water types. *Water Res.* **10**, 751–755 (1976)
44. Olson M.R., Axler R.P., Hicks R.E.: Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *J. Virol. Meth.* **122**, 147–152 (2004)
45. Pattee P.A.: Use of tetrazolium for improved resolution of bacteriophage plaques. *J. Bacteriol.* **92**, 787–788 (1966)
46. Pillai S.D.: Bacteriophages as fecal indicator organisms (w) Viruses in Foods, red. Goyal S.M. Springer, New York, 2006
47. Future BioSolutions: QuantiPhageCT – Advanced phage detection <https://www.quantiphage.com/> (06.04.2021)
48. Purnell S.E., Ebdon J.E., Taylor H.D.: Bacteriophage lysis of *Enterococcus* host strains: A tool for microbial source tracking? *Environ. Sci. Technol.* **45**, 10699–10705 (2011)
49. Rames E., Macdonald J.: The QuantiPhage assay: A novel method for the rapid colorimetric detection of coliphages using cellulose pad materials. *Water Res.* **149**, 98–110 (2019)
50. Rose J.B., Farrah S.R., Harwood V.J., Levine A.D., Lukaskik J., Menendez P., Scott T.M. Reduction of pathogens, indicator bacteria, and alternative indicators by wastewater treatment and reclamation processes. *Water Sci. Technol.* **3**, DOI10.2166/ws.2003.0069
51. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Dz.U. 2017, poz. 2294. <http://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/download.xsp/WDU20170002294/O/D20172294.pdf> (19.11.2021)
52. Salter R.S., Durbin G.W., Wang S., Abraham S.R., Charm S.: Same day and continuous detection of coliphage in water. *Am. Soc. Microbiol. Gen. Meet.* 109th p.483 (2009)
53. Salter R.S., Durbin G.W., Conklin E., Rosen J., Clancy J.: Proposed modifications of Environmental Protection Agency Method 1601 for detection of coliphages in drinking water, with same-day fluorescence-based detection and evaluation by the performance-based measurement system and alternative test protocol validation approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7803–7810 (2010)
54. Santiago-Rodriguez T.M., Toranzos G.A. i wsp.: Characterization of *Enterococcus faecalis*-infecting phages (enterophages) as markers of human fecal pollution in recreational waters. *Water Res.* **44**, 4716–4725 (2010)
55. Schulze E., Lenk J.: Concentration of coliphages from drinking water by Mg(OH)<sub>2</sub> flocculation. *Naturwissenschaften*, **70**, 612–613 (1983)
56. Sharp D.G., Hock A., Taylor A.E., Beard D., Beard J.W.: Sedimentation characters and pH stability of the T2 bacteriophage of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **165**, 259–270 (1946)
57. Sinton L.W., Finlay R.K., Reid A.J.: A simple membrane filtration-elution method for the enumeration of F-RNA, F-DNA and somatic coliphages in 100-ml water samples. *J. Microbiol. Meth.* **25**, 257–269 (1996)
58. Sinton L.W., Finlay R.K., Lynch P.A.: Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3605–3613, (1999)
59. Sinton L.W., Hall C.H., Lynch P.A., Davies-Colley R.J.: Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1122–1131 (2002)
60. Skrabber S., Gassilloud B., Gantzer, C.: Comparison of coliforms and coliphages as tools for assessment of viral contamination in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 3644–3649 (2004)
61. Sobsey M.D., Meschke J.S.: World Health Organization: Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin. Geneva, 2003
62. Śliwa-Dominiak J., Tokarz-Deptuła B.: Wiesław deptuła F-specyficzne bakteriofagi RNA Orax bakterie z grupy coli w próbkach wody pochodzących ze śródmiejskiego jeziora w Szczecinie. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie*, **10**, 189–199 (2010)
63. Tey B.T., Ooi S.T., Yong K.C., Tan Ng M.Y., Ling T.C., Tan W.S.: Production of fusion m13 phage bearing the disulphide constrained peptide sequence (C-WSFFSN1-C) that interacts with hepatitis B core antigen. *J. African. Biotechnol.* **8**, 268–273 (2009)
64. Turner S.J., Lewis G.D.: Comparison of F-specific bacteriophage, enterococci, and faecal coliform densities through a wastewater treatment process employing oxidation ponds. *Water Sci. Technol.* **31**, 85–89 (1995)
65. Vijayavel K., Fujioka R., Ebdon J., Taylor H.: Isolation and characterization of *Bacteroides* host strain HB-73 used to detect sewage specific phages in Hawaii. *Water Res.* **44**, 3714–3724 (2010)
66. World Health Organization: Guidelines for drinking-water quality 4th edition. WHO, Geneva, 2011. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950> (19.11.2021)
67. World Health Organization: Drinking water parameter cooperation project support to the revision of annex I Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption, 2017, [https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/pdf/WHO\\_parameter\\_report.pdf](https://ec.europa.eu/environment/water/water-drink/pdf/WHO_parameter_report.pdf) (19.11.2021)
68. Wyn-Jones P.: The detection of waterborne viruses (w) Perspectives in Medical Virology, red. A. Bosch, Elsevier Science, Oxford, 2007, s. 177–204
69. Yates M.V., Gerba C.P., Kelley L.M.: Virus persistence in ground water. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 778–781 (1985)





## INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

Od ostatniej informacji o działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, zamieszczonej w zeszytach nr 4 z 2021 r. kwartalników *Advancements of Microbiology – Postępy Mikrobiologii* i *Polish Journal of Microbiology*, ZG PTM zajmował się następującymi sprawami:

- I. W dniu 10.01.2022 r. w wersji on-line odbyła się konferencja „VI Mazowieckie Spotkanie Mikrobiologów i Epidemiologów organizowana przez Wiceprezes PTM, Konsultanta Wojewódzkiego w dziedzinie Mikrobiologia Lekarska Panią prof. dr hab. Ewę Augustynowicz-Kopec.
- II. Europejskie Towarzystwo Mikrobiologii Klinicznej i Chorób Zakaźnych (ESCMID) podjęło decyzję o wprowadzeniu od stycznia 2022 r. opłaty dla stowarzyszonych towarzystw (Affiliated Society), a takim jest PTM, w zależności od liczby członków. W związku z faktem, że na koniec 2021 w PTM było 880 członków, składka wynosi 250 Euro ( $\geq 100$  and  $< 1000$  members). Do tej pory towarzystwa mikrobiologiczne liczące poniżej 1000 członków nie płaciły żadnej składki.
- III. Opłaciliśmy składkę roczną w wysokości 275 USD za członkostwo PTM w Publishers International Linking Association, Inc Db a CROSSREF, organizacji nadającej numery Doi dla artykułów w *Polish Journal of Microbiology*.
- IV. Uruchomiono stronę internetową Kongresu IUMS. <https://iums2022.com/>, który będzie odbywać się w formie hybrydowej w Rotterdamie, Holandia w dniach 19–22 lipca 2022 r. Opłaty rejestracyjne są zróżnicowane <https://iums2022.com/register/>. Abstrakty prac można nadsyłać do 6 kwietnia 2022 r. Późne abstrakty można nadsyłać w okresie 2–18 maja 2022 r.
- V. Pierwsze spotkanie naukowe Sekcji Mikrobiologii Środowiskowej PTM odbyło się on-line dnia 20 stycznia 2022 r. Wykład pt. „Metaboliczna różnorodność cyjanobakterii bałtyckich – środowiskowe znaczenie i biotechnologiczny potencjał” wygłosiła Pani prof. Hanna Mazur-Marzec z Zakładu Biotechnologii Morskiej Instytutu Oceanografii, Uniwersytetu Gdańskiego.
- VI. Oddział PTM w Krakowie zaprosił 27 stycznia 2022 r. na posiedzenie naukowo-szkoleniowe on-line z wykładem pt.: „Nanotechnologia w praktyce mikrobiologicznej – oddziaływanie bakterii z powierzchniami ciał stałych”, który wygłosił dr Wojciech Pajerski Absolwent Środowiskowych Studiów Doktoranckich „Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej” InterDokMed.
- VII. W dniu 28.01.2022 r. odbyło się on-line e-Symposium pt. „COVID-19 – Raport z obłązonego świata” współorganizowane przez Oddziały Terenowe PTM w Warszawie i Szczecinie. Przedstawiono 4 wykłady:
  - a) „Zwierzęta w transmisji wirusa SARS-CoV-2” – dr hab. inż. Paweł Nawrotek, prof. ZUT; Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Centrum Dydaktyczno-Badawcze Nanotechnologii Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie,
  - b) „Ko-infekcje w przebiegu COVID-19” – dr n. med. Joanna Jursa-Kulesza; Samodzielna Pracownia Mikrobiologii Lekarskiej, Katedra Mikrobiologii, Immunologii i Medycyny Laboratoryjnej Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie,
  - c) „Szczepienia przeciwko COVID-19 przed piątą falą pandemii – fakty i mity” – dr hab. n. med. Ernest Kuchar; Klinika Pediatrii z Oddziałem Obserwacyjnym, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
  - d) „Postępowanie z chorym na COVID-19” – dr n. med. Jacek Nasiłowski; Tymczasowy Szpital Narodowy, CSK MSWiA, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, WUM.
- VIII. Oddział PTM w Krakowie w dniu 24.02.2022 r. zorganizował posiedzenie naukowo-szkoleniowe on-line z wykładem pt.: „Środki dezynfekujące w wytwórni farmaceutycznej z punktu widzenia laboratorium mikrobiologicznego”, który wygłosiła mgr Katarzyna Bucała-Śladowska Z-ca Kierownika Centrum ds. Mikrobiologii Farmaceutycznej, Kierownik Zapewnienia Jakości Osoba Wykwalifikowana z Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek imienia dr Jana Bobra.

- IX. Opłaciliśmy składkę roczną za członkostwo PTM w International Union of Microbiological Societies (IUMS) w wysokości 1144 USD = 880 członków PTM × 1,3 USD oraz składkę roczną za uczestnictwo PTM w Federation of European Microbiological Societies w wysokości 1232 Euro = 880 członków PTM × 1,4 Euro. Szkoda, że niewielu członków PTM występuje do FEMS o finansowanie staży zagranicznych i wyjazdów na konferencje ([https://fems-microbiology.org/zakładka GRANTS](https://fems-microbiology.org/zakladka%20GRANTS)).
- X. W dniu 31.01.2022 r. informacja o PTM i składzie Zarządu Głównego została wprowadzona do Centralnego Rejestru Beneficjentów Rzeczywistych.
- XI. Prezydium Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów działając zdalnie, w dniu 31.01.2022 r. podjęło następujące uchwały: **Uchwałę nr 1-22** w sprawie wynagrodzenia członków redakcji *Advances in Microbiology – Postępy Mikrobiologii* w 2022 r.; **Uchwałę nr 2-2022** w sprawie wynagrodzenia członków redakcji *Polish Journal of Microbiology* w 2022 r.; **Uchwałę nr 3-2022** w sprawie wynagrodzenia sekretarki ZG PTM do 31.10.2022 r.; **Uchwałę nr 4-2022** w sprawie wynagrodzenia księgowej PTM do 31.12.2022 r.; **Uchwałę nr 5-2022** w sprawie organizacji kolejnej edycji **Nagrody Naukowej PTM im. Prof. Edmunda Mikulaszka**, która będzie przyznana w roku 2022, za artykuły opublikowane w latach 2020–2021 oraz w sprawie przedłużenia kadencji pracy na 2022 r. Komisji Konkursowej powołanej Uchwałą nr 20-2018. Zasady przyznawania nagrody są określone w **Regulaminie Nagrody Naukowej PTM im. Prof. Edmunda Mikulaszka** znajdującym się na stronie PTM (<https://www.microbiology.pl/nagrody/nagroda-im-prof-edmunda-mikulaszka/>)  
Nagroda w 2022 roku dotyczy prac opublikowanych w latach 2020–2021.  
Termin składania wniosków: 15.03.2022 r.  
Ogłoszenie wyników konkursu: 30.04.2022 r.  
**Uchwałę nr 6-2022** jednomyślnie postanowiono przyjąć 4 osoby w poczet członków zwyczajnych PTM.
- XII. Prezydium Zarządu Głównego PTM przyjęło **Uchwałę nr 7-2022** w sprawie objęcia patronatem honorowym IV Ogólnopolskiej Konferencji „IMPLANTY 2022: Inżynieria, medycyna i nauka – w pogoni za implantem doskonałym”, w trakcie której będą omawiane również aspekty mikrobiologiczne. Konferencja organizowana będzie w dniach 27–28.05.2022 r. przez Politechnikę Gdańską, Wydział Inżynierii Mechanicznej i Okrętownictwa w Gdańsku; e-mail: konferencja-implanty.wm@pg.edu.pl.
- XIII. W dniu 24.01.2022 r. odbyło się spotkanie członków Komitetu Organizacyjnego Zjazdu PTM. Przyjęto ostateczny układ 18 sesji naukowych, w tym jednej sponsorowanej przez firmy, oraz ustalono osoby, które byłyby odpowiedzialne za organizację tych sesji. Zwrócono się do wybranych osób, aby potwierdziły chęć organizacji wskazanych sesji.
- XIV. Nieoczekiwanie skomplikowały się sprawy organizacji Zjazdu PTM. W dniu 27.01.2022 r. otrzymaliśmy informację: „W związku z podjęciem przez Zarząd Sangate Sancak Spółka Komandytowa decyzji o rozpoczęciu realizacji nowej inwestycji w miejscu obecnie działającego hotelu Sangate Hotel Airport informujemy, iż działalność w hotelowo – konferencyjna w Sangate Hotel Airport z dniem 30.04.2022 zostaje zakończona. Wszelkie wykraczające poza wskazany termin rezerwacje zostaną anulowane.”
- XV. W dniu 22.02.2022 r. odbyło się kolejne spotkanie członków Komitetu Organizacyjnego Zjazdu PTM. Omawiano organizację 18 sesji naukowych, ustalono, że Zjazd odbędzie się w Arche Hotel Krakowska w Warszawie, Aleja Krakowska 237. Ponadto ustalono, że ze względów epidemicznych i lokalowych, w Zjeździe w sposób bezpośredni może uczestniczyć tylko 500 osób w tym delegaci na Walne Zgromadzenie Delegatów PTM. Możliwa jest również prezentacja e-plakatów przez e-uczestników Zjazdu.
- XVI. **XXIX Ogólnopolski Zjazd PTM 15–17 września 2022 r. w Warszawie.**  
Bardzo dużo pracy zostało włożone w ustalenie konfiguracji strony internetowej XXIX Ogólnopolskiego Zjazdu PTM: [www.zjazdptm2022.pl](http://www.zjazdptm2022.pl) oraz systemu rejestracji na Zjazd.  
Strona Zjazdu została uruchomiona od 15.03.2022 r. Wszystkich członków PTM i osoby zainteresowane mikrobiologią zachęcamy do zapoznania się ze stroną, zarejestrowanie się i zgłaszania streszczeń na Zjazd, jak również pobrania plakatu Zjazdu i rozpropagowania wydarzenia.
- XVII. Intensywnie poszukujemy sponsorów i wystawców na nasz Zjazd. Niestety zainteresowanie firm jest niewielkie. Spodziewamy się większego zaangażowania w tym obszarze członków i Przewodniczących Oddziałów Terenowych PTM, którzy są współorganizatorami Zjazdu.
- XVIII. PTM podpisało z firmą De Gruyter Poland Sp. z o.o., działającą pod nazwą „Sciendo” aneksy dotyczące przedłużenia do 31.12.2022 r. umów na usługi wydawnicze Open Access Publishing Agreement pomiędzy Exeley Inc. i PTM, a dotyczących czasopism AM-PM i PJM, z uwzględnieniem przeniesienia praw i obowiązków Exeley na Sciendo.
- XIX. Zdecydowano, że doroczne zebranie członków Zarządu Głównego i zaproszonych gości odbędzie się w dniu 28.03.2022 r. on-line. Przygotowano i rozesłano materiały na to spotkanie.
- XX. Władze Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, który nieodpłatnie udostępnia PTM pomieszczenia na Biuro PTM w 2022 r. podniósł opłaty eksploatacyjne z 100 zł za pomieszczenie (7,7 m<sup>2</sup>) w 2021 r. do 78,50 zł netto za 1 m<sup>2</sup> pomieszczenia w 2022 r. Ustalono, że PTM będzie płaciło miesięcznie za 2 m<sup>2</sup> pomieszczenia 193,11 zł brutto.

**XXI. W dniu 24.02.2022 r. rozpoczęła się agresja Rosji wobec Ukrainy.**

Prezydium ZG PTM zaapelowało do FEMS, IUMS i ESCMID nie tylko o solidarność z Ukrainą, w tym z członkami Society of Microbiologists of Ukraine, wyrażoną przez towarzystwa mikrobiologiczne zrzeszone w FEMS/IUMS/ESCMID, ale i o podjęcie sankcji w stosunku do towarzystw mikrobiologicznych krajów agresorów. Zawnioskowaliśmy do FEMS/ IUMS/ESCMID o zawieszenie towarzystw mikrobiologicznych z Rosji i z Białorusi w prawach członka FEMS/IUMS/ ESCMID oraz pozbawienie ich przywilejów przysługujących członkom federacji FEMS/ IUMS oraz ESCMID do czasu zakończenia wojny. Zaproponowaliśmy również blokadę artykułów wydawanych przez czasopisma FEMS/IUMS nadsyłanych przez autorów z afiliacją Rosji i Białorusi do czasu zakończenia wojny, **Uchwała nr 8-2022 z 02.03.2022 r. w załączeniu.**

Tego samego dnia PTM poparło Apel Prezesa Naczelnej Rady Lekarskiej Pana prof. dr hab. Andrzeja Matyja dotyczący zawieszenia współpracy z instytucjami rosyjskimi.

W odpowiedzi na Uchwałę nr 8-2022 szybko zareagowała Pani prof. Hilary Lappin-Scott Prezydent FEMS (**list w załączeniu**).

Prezydium ZG PTM jednogłośnie podjęło również **Uchwałę nr 9-2022**, o następującej treści:

„W związku z napaścią Rosji na suwerenny kraj – Ukrainę i prowadzeniu przez nią krwawej i niszczycielskiej wojny, której ofiarami jest ludność cywilna, a także w związku z udostępnianiem przez Białoruś swojego terytorium do ataków zbrojnych wojsk Rosyjskich na Ukrainę, Prezydium ZG PTM podejmuje decyzję w sprawie blokady artykułów wydawanych przez czasopisma PTM: *Polish Journal of Microbiology* (PJM) oraz *Advancements of Microbiology – Postępy Mikrobiologii* (AM-PM), nadsyłanych przez autorów z afiliacją Rosji i Białorusi do czasu zakończenia wojny. Blokada dotyczy manuskryptów już będących w trakcie procesu wydawniczego jaki i tych które dopiero zostaną nadesłane do redakcji czasopism.”

W dniu 09.03.2022 r. odbyło się spotkanie Prezydent FEMS i 2 członków zarządu FEMS z prof. Elżbietą A. Trafny i prof. S. Tyskim reprezentującymi PTM, na temat stanowiska FEMS i PTM w sprawie wojny na Ukrainie. Uzgodniono, że FEMS podejmie działania wskazane w piśmie PTM, a także rozważy pomoc finansową dla naukowców ukraińskich uciekających przed wojną. Nasza Uchwała nr 8-2022 została przez biuro FEMS rozesłana do wszystkich zrzeszonych towarzystw mikrobiologicznych z informacją o zwołaniu Nadzwyczajnego Zebrania Delegatów – FEMS Council w sprawie podjęcia decyzji o zawieszeniu 4 towarzystw w FEMS. Zebranie FEMS Council odbędzie się dopiero 07.04.2022 r.

Warszawa, 16.03.2022 r.

SEKRETARZ  
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

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

PREZES  
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

*S. Tyski*  
prof. dr hab. Stefan Tyski



**Uchwała 8-2022 z dnia 02 marca 2022 r.**

**Prezydium Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, przyjęta jednomyślnie,  
adresowana do Federation of European Microbiological Societies (FEMS)  
i International Union of Microbiological Societies (IUMS).**

W związku z trwającą wojną na Ukrainie, Polskie Towarzystwo Mikrobiologów **potępia i piętnuje postępowanie Rosji**, która napadła na suwerenny kraj – Ukrainę, zabijając obywateli tego kraju i niszcząc jego infrastrukturę. PTM **potępia także postępowanie Białorusi**, która udostępniła swoje terytorium do ataków zbrojnych wojsk rosyjskich na Ukrainę i sprzyja działaniom wojennym Rosji.

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów liczące prawie 900 członków i działające od 1927 roku było współzałożycielem FEMS i IUMS, a na przestrzeni 95 lat doznawało wielu wstrząsów. Polska, która poniosła ogromne straty w czasie II wojny światowej i jest sąsiadem Ukrainy doskonale rozumie w jakiej sytuacji znaleźli się obywatele Ukrainy i wspiera ich na wiele możliwych sposobów. Skala barbarzyństwa najeźdźców jest ogromna i przerażająca, dlatego uważamy, że musimy zająć wyraźne stanowisko. Na każdym możliwym polu należy wyrazić swój sprzeciw wobec działań wojennych Rosji skierowanych nie tylko wobec Ukrainy, ale całej zachodniej kultury i przeciw wartościom jakie wyznajemy jako ludzie cywilizowani. Tylko widoczny sprzeciw, także wyrażony na polu naukowym, pozwoli dostrzec obywatelom Rosji i Białorusi, poddanych manipulacjom i propagandzie państwa, brak akceptacji i sprzeciw Europy wobec barbarzyństw dokonywanych w stosunku do niewinnych ludzi.

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów apeluje nie tylko o solidarność z Ukrainą, w tym z członkami Society of Microbiologists of Ukraine, wyrażoną przez towarzystwa mikrobiologiczne zrzeszone w FEMS/IUMS, ale i o podjęcie kroków sankcyjnych w stosunku do towarzystw mikrobiologicznych krajów agresorów:

- Interregional Russian Microbiological Society,
- Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy,
- All-Russian Public Organization “National Academy of Mycology”,
- Belarussian Non-governmental Association of Microbiologists.

Wnoskujemy do FEMS/IUMS o zawieszenie powyższych czterech towarzystw mikrobiologicznych w prawach członka FEMS/IUMS i pozbawienie ich przywilejów przysługujących członkom FEMS/IUMS do czasu zakończenia wojny. Proponujemy również blokadę artykułów wydawanych przez czasopisma FEMS/IUMS nadsyłanych przez autorów z afiliacją Rosji i Białorusi do czasu zakończenia wojny.

Takie działania podjęte przez FEMS/IUMS będą jawnym znakiem aktywnego sprzeciwu europejskiej/światowej nauki wobec zbrodniczego ataku na Ukrainę i podstawowe prawa wolności każdego człowieka. Być może będzie to pierwszy odebrany czytelny znak dla rzeszy mikrobiologów rosyjskich i białoruskich, że Europa/Świat mówi **STOP WOJNIE**.

Należy zdawać sobie sprawę, że działania zbrojne podejmowane przez Rosję i Białoruś nie mają wpływu na prowadzoną działalność naukową w tych krajach. Natomiast mają bezpośredni wpływ na zawieszenie badań naukowych na Ukrainie. Teraźniejszość Ukrainy to okrutna wojna, mężczyźni – naukowcy są zmobilizowani i z bronią w ręku walczą o niepodległość kraju, kobiety – naukowcy chowają się z dziećmi po schronach, a budynki instytutów i uczelni oraz aparatura badawcza są niszczone. Jakże projekty badawcze mogą być realizowane, jakie publikacje mogą powstawać, w takich warunkach?

Mamy dzisiaj obowiązek stanąć po stronie wolności jednostki, jak i po stronie prawa do niepodległości państwa położonego w centrum Europy.

SEKRETARZ  
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

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

PREZES  
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

*prof. dr hab. Stefan Dyki*

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów  
Zarząd Główny  
ul. Banacha 1 b, 02-097 Warszawa  
NIP 521-11-21-855

<https://www.microbiology.pl/> e-mail: [ptm.zmf@wum.edu.pl](mailto:ptm.zmf@wum.edu.pl)

FEMS Business Office, Delftechpark 37a, 2628 XJ Delft, The Netherlands  
T: +31 (0) 15 302 0050 E: fems@fems-microbiology.org W: fems-microbiology.org



Prof. Stefan Tyski  
Polish Society of Microbiologists  
National Medicines Institute  
Chełmska 00-725  
Warsaw  
Poland

**RE: FEMS response to the invasion of Ukraine**

4 March 2021

Dear Stefan,

Thank you for your letter on the resolution adopted unanimously by the Polish Society of Microbiologists requesting FEMS show solidarity with Ukraine by suspending the FEMS membership of microbiological societies from Russia and Belarus and introduce a boycott of authors with affiliations of those countries submitting to FEMS journals. I will reply to each proposal separately to provide as full a response as possible to what we are doing right now and how we plan to proceed.

The Federation is appalled by the invasion of Ukraine and gives its full support to the people of Ukraine and all those impacted by this senseless and illegal aggression by the Russian Government. To that end we have written expressing our support to the Society of Microbiologists of Ukraine and have issued a public statement calling on the Russian Government to end the invasion immediately. We are also preparing a range of financial support for microbiologists in Ukraine and are appealing to our Member Societies and their members to host Ukrainian researchers, for which FEMS will also provide support.

The FEMS *Articles of Association*, which govern the way the organization can act, make clear that suspension of FEMS membership can only be approved by our Member Societies. To that end the Board of Directors has decided to convene an 'extraordinary meeting' of the FEMS Council to vote on the proposed suspensions. This invitation will be issued to all Member Societies shortly, with the vote being held within the timescales laid out in the *Articles*.

The introduction of any restriction on manuscripts from authors with Russian or Belarussian affiliation in FEMS journals must be made in collaboration with our publisher Oxford University Press and, with the involvement of the Editors-in-Chief of each journal who have autonomy over what is published in their journals. Consequently, a decision on this will take a little longer to achieve.

FEMS is working with the Society of Microbiologists of Ukraine and, Prof Sibirny, the FEMS Director of Education & Public Outreach, to understand how best to support Ukrainian microbiologists who have had

FEMS Business Office, Delftechpark 37a, 2628 XJ Delft, The Netherlands  
T: +31 (0) 15 302 0050 E: fems@fems-microbiology.org W: fems-microbiology.org



their lives, work and, studies destroyed. To that end (and to be communicated shortly to all Member Societies) FEMS will:

1. Explore what practical resources and funding can be provided to support Ukrainian microbiologists continue or begin placements at institutions outside of the country
2. Contact our Member Societies to outline what this support will look like and to encourage societies to contact institutions who could potentially host Ukrainian colleagues.

Finally, I hope we can speak about this issue, to better understand the perspective and priorities of the Polish Society. FEMS Managing Director, Matthew Harvey, and I are very keen to arrange a meeting via Zoom with you as soon as possible and will share our availability next week. Please just let us know what times suit you and we can provide the Zoom links for the call.

I hope this letter provides both an explanation of the steps that FEMS is taking and the reasoning behind these. Please be assured that we are all working on these matters with the highest priority and will look to what support we can provide at speed both now and in the future. I look forward to hearing your comments and if you would be available to discuss these matters further with us.

Warm regards



Hilary Lappin-Scott OBE  
FEMS President



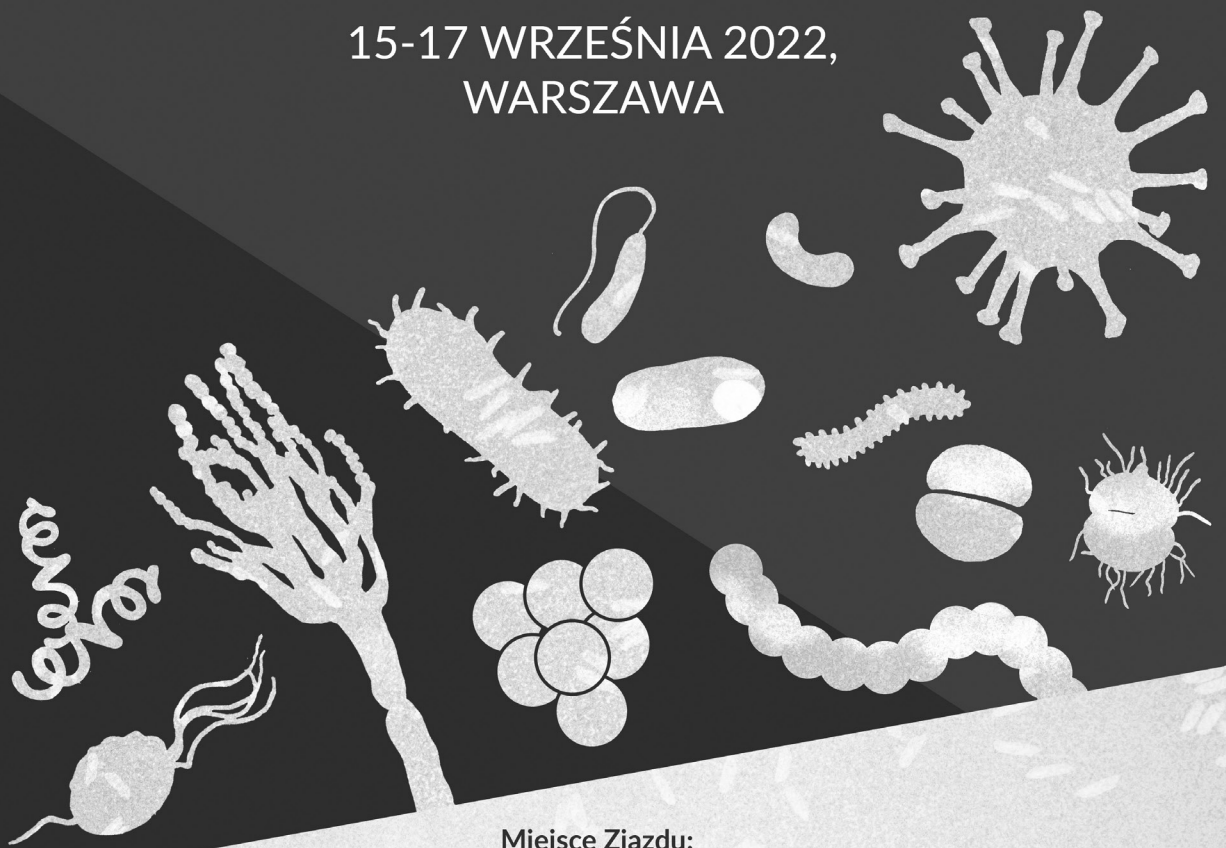
XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD  
POLSKIEGO TOWARZYSTWA  
MIKROBIOLOGÓW  
15-17 WRZEŚNIA 2022,  
WARSZAWA



POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# XXIX OGÓLNOPOLSKI ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

15-17 WRZEŚNIA 2022,  
WARSZAWA



Miejsce Zjazdu:

Arche Hotel Krakowska  
Warszawa, Aleja Krakowska 237

Główny Organizator Zjazdu:

Polskie Towarzystwo Mikrobiologów  
ul. Stefana Banacha 1b, 02-097 Warszawa  
[ptm.zmf@wum.edu.pl](mailto:ptm.zmf@wum.edu.pl), [www.microbiology.pl](http://www.microbiology.pl)

**CZŁONKOWIE WSPIERAJĄCY PTM**

**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



## SPIS TREŚCI

### OD REDAKCJI

T. Jagielski – Fykologia medyczna – nowa dyscyplina mikrobiologii .....	3
D. Żakowska, B. Wlizio-Skowronek, P. Wójcicka, M. Stawecka-Hamerla, K. Naylor – Szczepionki przeciwko wąglikowi – wybrane badania .....	7
M. Wysocki, M. Kierzkowska, E. Podsiadły – Rola <i>Bacteroides</i> spp. w bakteriemii .....	13
B. Macura, A. Kiecka, M. Szczepanik – Bakterie modyfikowane genetycznie – perspektywy zastosowania w profilaktyce, diagnostyce i terapii .....	21
B. Masarczyk, T.W. Rutkowski, A.M. Mazurek – Potencjalne możliwości wykrywania DNA HPV w płynnej biopsji i diagnostyce raka głowy i szyi .....	31
M. Bartosik, Ł. Mąka, R. Matuszewska – Colifagi somatyczne jako wskaźnik w ocenie jakości wody do picia .....	39
KOMUNIKATY, INFORMACJE .....	49

## CONTENTS

### EDITORIAL

T. Jagielski – Medical phycology – a new realm of microbiology .....	3
D. Żakowska, B. Wlizio-Skowronek, P. Wójcicka, M. Stawecka-Hamerla, K. Naylor – Vaccines against anthrax – selected research .....	7
M. Wysocki, M. Kierzkowska, E. Podsiadły – The role of the <i>Bacteroides</i> spp. in bacteraemia .....	13
B. Macura, A. Kiecka, M. Szczepanik – Genetically modified bacteria – the perspective of application in prevention, diagnostics and therapy .....	21
B. Masarczyk, T.W. Rutkowski, A.M. Mazurek – Potential possibilities of HPV DNA detection in liquid biopsy for diagnosis of patients with head and neck cancer .....	31
M. Bartosik, Ł. Mąka, R. Matuszewska – Somatic coliphages as an indicator in drinking water quality assessment .....	39
NEW REPORTS, INFORMATION .....	49

### **Warunki prenumeraty**

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

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

Cena 1 zeszytu 40 zł + VAT 8%