POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Kwartalnik
Tom 61
Zeszyt 3•2022
LIPIEC – WRZESIEŃ

CODEN:
PMKMAV 61 (3)
2022

Postępy Mikrobiologii

Advancements of Microbiology

Impact Factor = 1,118 (2021)
Punktacja MNiSW = 20,00 (2019)

http://www.pm.microbiology.pl

RADA REDAKCYJNA

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

REDAKCJA

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@uw.edu.pl

ADRES REDAKCJI

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

REDAKTORZY

MONIKA ADAMCZYK-POPŁAWSKA (Uniwersytet Warszawski), GABRIELA BUGLA-PŁOSKOŃSKA (Uniwersytet Wrocławski),
KATARZYNA GRUDLEWSKA-BUDA (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu)
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*

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 3, 105–114
DOI: 10.2478/am-2022-009

MULTIDRUG EFFLUX PUMPS IN BACTERIA AND EFFLUX PUMP INHIBITORS

Abhirami P. Sreekantan, Pooja P. Rajan, Minsa Mini and Praveen Kumar*

Department of Zoology, Government College for Women, Kerala, India

Received in March, accepted in May 2022

Abstract: Antimicrobial resistance is becoming a paramount health concern nowadays. The increasing drug resistance in microbes is due to improper medications or over usage of drugs. Bacteria develop many mechanisms to extrude the antibiotics entering the cell. The most prominent are the efflux pumps (EPs). EPs play a significant role in intrinsic and acquired bacterial resistance, mainly in Gram-negative bacteria. EPs may be unique to one substrate or transport several structurally different compounds (including multi-class antibiotics). These pumps are generally associated with multiple drug resistance (MDR). EPs are energized by a proton motive force and can pump a vast range of detergents, drugs, antibiotics and also β-lactams, which are impermeable to the cytoplasmic membrane. There are five leading efflux transporter families in the prokaryotic kingdom: MF (Major Facilitator), MATE (Multidrug And Toxic Efflux), RND (Resistance-Nodulation-Division), SMR (Small Multidrug Resistance) and ABC (ATP Binding Cassette). Apart from the ABC family, which utilizes ATP hydrolysis to drive the export of substrates, all other systems use the proton motive force as an energy source. Some molecules known as Efflux Pump Inhibitors (EPI) can inhibit EPs in Gram-positive and Gram-negative bacteria. EPIs can interfere with the efflux of antimicrobial agents, leading to an increase in the concentration of antibiotics inside the bacterium, thus killing it. Therefore, identifying new EPIs appears to be a promising strategy for countering antimicrobial drug resistance (AMR). This mini-review focuses on the major efflux transporters of the bacteria and the progress in identifying Efflux Pump Inhibitors.

1. Introduction. 2. Major classes of efflux pumps. 2.1. ATP-Binding Cassette Superfamily. 2.2. Major Facilitator Superfamily. 2.3. Multidrug And Toxic Compound Extrusion Family. 2.4. Small Multi-drug Resistance Family. 2.5. Resistance-Nodulation-Division Superfamily. 3. Efflux pumps and their role in virulence and biofilm formation. 4. Efflux Pump Inhibitors

Keywords: Antimicrobial resistance, MDR, Multidrug efflux pumps, Biofilm, Efflux Pump Inhibtor (EPI)

1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) arises when microorganisms develop strategies to evade antimicrobial agents, making them ineffective. AMR is a global threat to the public health system across the globe. According to a recent report from the WHO, drug-resistant diseases claim the lives of at least 700,000 individuals each year [1]. Due to the inappropriate dosage and use of current antimicrobials, many pathogens become multidrug-resistant (MDR) [2]. It is generally assumed that resistance to antibiotics and other antimicrobials has developed due to selective pressures resulting from indiscriminate and inappropriate use. Increased antibiotic resistance has resulted in fewer treatment options for patients and increased morbidity and death. Due to this, we are now confronted with more acute diseases that require more intense treatment, relatively extended hospital stays and expensive hospitalization [3]. Bacteria can gain resistance through diverse mechanisms such as restricting drug uptake into the cell, altering a drug target, enzymatic degradation of a drug, and active efflux of a drug. The efflux mechanism involves the extrusion of drugs from the interior to the external environment by protein transporters called multidrug efflux pumps (EPs). An EP reduces the efficacy of antibiotics by preventing their intracellular accumulation. The efflux-mediated resistance is widespread in the bacteria [4]. Numerous studies have shown that EPs, such as AcrAB-TolC of *Escherichia coli*, MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa*, and AdeFGH of *Acinetobacter baumanii* help in biofilm formation, pathogenicity, stress tolerance, and quorum sensing (QS) [5–8]. The link between EPs and QS has been investigated in *P. aeruginosa.* Mutation in RND EP leads to the downregulation of QS-dependent LecA-Lux pathways, thereby increasing the expulsion of QS molecules and biofilm formation [9]. EPs can interact with host-derived antimicrobials such as bile salts, contributing to the virulence of enteric bacteria; the RND EP, AcrAB-TolC from *E. coli* is involved in the extrusion of bile salt, is a good example [10]. Other RND EPs, VexAB, VexCD, VexIJK, and VexGH, increase the pathogenicity of *Vibrio cholerae* by encoding the two major virulence factors: cholera

* Corresponding author: Praveen Kumar, Department of Zoology, Government College for Women, Thiruvananthapuram-695014, Kerala, India; e-mail: praveen@gcwtvm.ac.in
© 2022 Abhirami P. Sreekantan et al.
This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

toxin (CT) and toxin co-regulated pilus (TCP) [11]. This review will focus on the major classes of EPs identified in bacteria and discuss the newly identified EPIs.

2. Major classes of efflux pumps

The EPs are predominantly found in Gram-positive bacteria (GPB) such as *Streptococcus pneumoniae,* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Listeria monocytogenes* and Gram-negative bacteria (GNB) including *E. coli, A. baumanii, Klebsiella pneumoniae*, *Camphylobacter jejuni*, *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrheae* and *V. cholerae.* EPs are energy-dependent as they expel toxic substrates against a concentration gradient. The EPs can be classified into two types based on their energy source. The primary EPs directly utilize energy from ATP hydrolysis, while the secondary EPs derive energy from the chemical gradients from protons or sodium ions. The GNB EPs are more complex than GPB EPs and possess tripartite assembly. They can expel a broad spectrum of antibiotics such as quinolones, β-lactams, and tetracycline AMR in GPB is chiefly mediated by MFS transporter, NorA, and MATE transporter, MepA protein in *S. aureus*, ABC transporter LmrA of *Lactococcus lactis* [12–15]. Major efflux in GNBs are AcrAB-TolC efflux (*E. coli*), AcrAD-TolC and AcrEF-TolC (*Salmonella enterica*). KdeA, KmrA, KpnEP and EefABC in (*K. pneumoniae*), MexAB-OprM, MexJK-OprM, MexEF-OprN, MexXY--OprM, MexCD-OprJ and MexVW-OprM (*P. aeruginosa*), SsmE, SdeAB, SdeCDE, SdeXY, SmdAB and SmfY (*Serratia marcescens*) MarA and AcrAB (*Yersinia pestis*) CmeABC (*C. jejuni*) and AdeIJK, AdeABC and AdeFGH (*A. baumanii*) [16].

The EPs are classified into five families based on the number of membrane-spanning regions, sequence similarity, substrate specificity and energy source used by the pump and the types of molecules exported (Fig. 1).

2.1. ATP-binding cassette superfamily

ATP-binding cassette (ABC) transporters are a large superfamily that uses the energy released upon ATP hydrolysis to pump chemicals [22]. They function as influx and efflux proteins, transporting nutrients into cells and removing toxins and drugs from the cell. However, in Eukaryotes, ABC transporters behave as efflux proteins that protect the cell against toxins [23]. A distinguishing feature of ABC transporters is the presence of two transmembrane domains, which help in substrate translocation, and two cytoplasmic ATP--binding domains that generate energy by ATP hydrolysis to move the substrates across the membrane [24]. ABC transporters contain highly conserved motifs such as Walker A and Walker B motifs (binds to ATP) and LSGGQ/KQR (C-motif) [25]. LmrA (involved in the efflux of ethidium, rhodamine G, daunorubicin) was the first bacterial MDR ABC transporter reported and was identified in *Lactococcus lactis* [26]. A homolog of LmrA, named BmrA, was identified from *Bacillus subtilis* which expelled drugs such as Hoechst 33342, doxorubicin and 7-amino-actinomycin-D [27]. MacAB-TolC, initially identified as a tripartite pump, is involved in the efflux of macrolide antibiotics, protoporphyrin and heat--stable enterotoxins [28]. Similarly, DrrA (ATP binding) and DrrB (integral membrane protein) from *Mycobacterium tuberculosis* imparted resistance to doxorubicin and daunorubicin [29]. PatAB in *S. pneumoniae* is implicated in the efflux of several drugs, including fluoro-

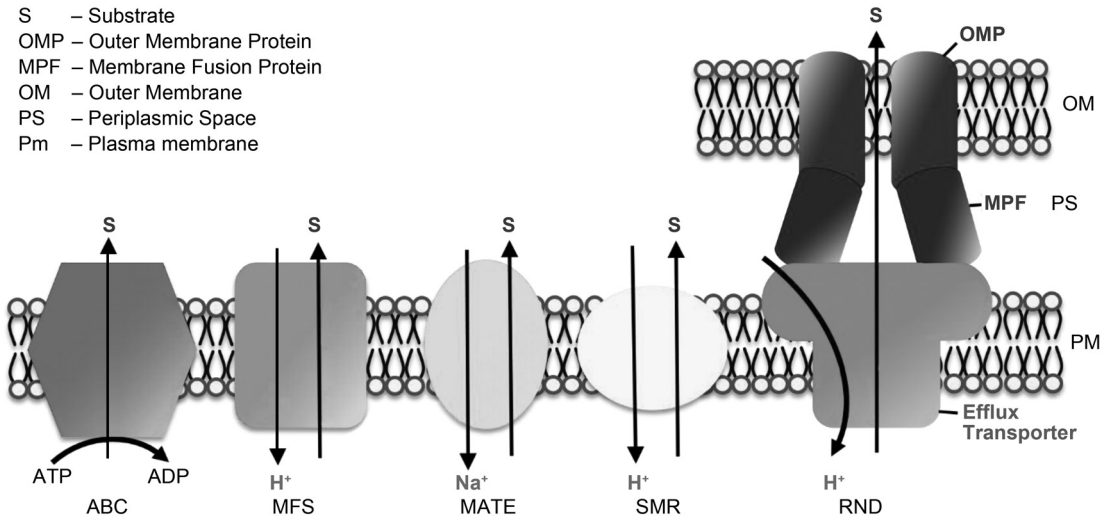


Fig. 1. Schematic representation of five superfamilies of EPs found in bacteria

(ABC) ATP-Binding Cassette Superfamily [17]; (MFS) Major Facilitator Superfamily [18]; (MATE) Multidrug And Toxic Compound Extrusion Family [19]; (SMR) Small Multi-Drug Resistance Family [20]; (RND) Resistance-Nodulation-Division Superfamily [21].

quinolones [30]. EfrCD, an ABC transporter characterized in *Enterococcus faecalis* demonstrated enhanced sensitivity to several drugs, such as daunorubicin and doxorubicin [31]. SmrA is an ABC transporter identified in the nosocomial pathogen, *Stenotrophomonas maltophilia,* which conferred increased resistance to fluoroquinolones and tetracycline [32]. SmdAB, a multidrug efflux transporter, was identified in *S. marcescens* involved in the transport of antibiotics, norfloxacin and tetracycline [33]. A multidrug EP, VcaM, was identified in *V. cholerae,* conferring resistance to fluoroquinolones and tetracycline [34]. Recently, YddA was identified as an ABC-type multidrug transporter associated with exporting several substrates, including norfloxacin [35].

2.2. Major Facilitator Superfamily

Major Facilitator Superfamily (MFS) transporters are found in most living forms, including humans, and they transport many small compounds across the cell membranes [36]. The gene encoding the MFS transporters is present in high copy numbers. For example, *E. coli* K-12 likely has more than 70 transporters [37]. Unlike ABC transporters which are primary active transporters depending on ATP hydrolysis, MFS transporters are secondary active transporters moving smaller solute particles depending on the ion gradient created by active transporters [18]. The MFS transporters function as symport, antiport, or uniport and transport a wide range of compounds, including glucose, oligosaccharides, inositols, drugs, amino acids, and nucleosides. Structurally, MFS transporters are composed of 400–600 amino acids that fold into 12 or 14 transmembrane helices [38].

MdfA, an MDR EP identified in *E. coli* is involved in the transport of lipophilic compounds such as ethidium bromide, rhodamine, daunomycin, rifampin, tetracycline, and puromycin [39]. LmrP, a proton/drug antiport pump from *L. lactis* is involved in the extrusion of lincosamide, streptogramin, and tetracycline [40]. Fluoroquinolones, biocides, dyes, quaternary ammonium compounds and antiseptics are substrates of NorA EP from *S. aureus* and *Staphylococcus epidermis* [41]. Bmr and Blt of *B. subtilis*, and QacA of *S. aureus* are other examples of MFS transporters in GPB [42]. MFS transporters are monomeric in GPB, whereas they possess tripartite assembly in GNB. Tripartite EmrAB-TolC and EmrKY--TolC of *E. coli* enable the transportof the substrates ie. thiolactomycin, cerulenin, nalidixic acid and nitroxolone across the outer and inner membranes of GNB [43, 44].

2.3. Multidrug and toxic compound extrusion family

Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family comprises active secondary transporters and contributes to MDR in *V. cholerae* and *N. gonorrhoeae*. MATE family of transporters pump a wide range of toxic compounds from mammalian and bacterial cells harnessing the proton motive force and cation gradient. Many toxic metabolites and antimicrobial drugs are transported across the membrane by the MATE family, contributing to multidrug tolerance [45]. The NorM transporters from *V. cholerae* and *N. gonorrhoeae* and DinF transporters from *Pyrococcus furiosus* and *Bacillus halodurans* are well characterized [46]. NorM from *Vibrio parahaemolyticus* can extrude antibiotics, norfloxacin and ciprofloxacin outside the cells energy--dependent [47]. All MATE EPs are frequently made up of 12 transmembrane helices except mammalian MATE transporters, containing one additional helix [48]. MDR EP of the MATE family, MepA, is responsible for the extrusion of norfloxacin, ciprofloxacin and tigecycline [49, 50]. Interestingly, human MATE transporters (hMATE1-K and hMATE2-K) contribute to the transport of drugs, such as cimetidine, metformin, procainamide, cephalexin, and acyclovir [51]. PmpM, a proton-drug anti-transporter belonging to MATE family, associated with extrusion of fluoroquinolones, was identified in *P. aeruginosa* [52].

2.4. Small multidrug resistance family

As their name suggests, SMR transporters are small (~12 kDa) proteins consisting of 100 to 140 amino acids and involved in transporting a variety of lipophilic compounds and antibiotics [53, 54]. A proton gradient or ATP-dependent mechanism drives the transport of the substrates across the membrane. All SMR transporter consists of 4 transmembrane helix with primarily α-helical structure [55]. EmrE is an SMR type transporter in *E. coli* exchanging H^+ with ethidium and tetraphenylphosphonium compounds [56].The SMR transporters are further classified into three subclasses: the small multidrug pumps (SMP), suppressors of *groEL* mutation proteins (SUG), and paired small multidrug resistance proteins (PSMR) [54]. SMR proteins are encoded by bacterial chromosomes or plasmids and may be present in integrons. SMR transporters confera high level of resistance to several classes of antibiotics, such as β-lactams, cephalosporins co-trimoxazole, and a few aminoglycosides [39].

2.5. Resistance-Nodulation-Division Superfamily

The Resistance-Nodulation-Division (RND) efflux protein superfamily was initially identified as proteins related to Heavy Metal Resistance (*Ralstonia metallidurans*), Nodulation (*Mesorhizobium loti*) and Cell division (*E. coli*) [57]. AdeABC is the first characterized RND EP in *A. baumannii,* conferring multidrug resistance [58]. The components of AdeABC EP are adeA, adeB and adeC encoding membrane fusion proteins, multidrug transporter and outer membrane channel

protein, respectively [59]. The adeABC is associated with the active extrusion of fluoroquinolones, tetracycline, macrolides and aminoglycosides [58]. The members of the RND family play a key role in conferring antibiotic resistance in GNB, whereas the MATE family is mainly concerned with resistance in GPB [60]. RND pumps are proton gradient dependent and possess a tripartite assembly with three subunits, an inner membrane protein (IMP), an outer-membrane protein (OMP), and a periplasmic membrane fusion protein (MFP) which connect the other two components. The AcrAB-TolC EP, a well-characterized RND pump, encompasses the outer-membrane channel TolC, the transporter AcrB in the inner membrane, and AcrA, a periplasmic component interacting with the TolC and AcrB. The crystal structure of AcrB confirmed that it is a homotrimer [61]. The AcrAB-TolC EP transports several compounds and imparts resistance to antibiotics [62]. Another well-studied RND transporter is MexA--MexB-OprM from *P. aeruginosa,* actively extruding tetracycline, norfloxacin, and chloramphenicol [63]. *E. coli* RND transporter, SecDF, is a proton-dependent protein translocation factor that functions as a protein exporter [64]. RND efflux system, VexB, VexD, VexK and VexH, identified in *V. cholerae*, exhibited resistance to bile salts and several antimicrobial agents [11].

3. Efflux pumps and their role in virulence and biofilm formation

It has been demonstrated that the efflux of several host-derived antimicrobials agents, such as bile salts, facilitates colonization and increases bacterial adaptation to the host digestive tract [65]. In *E. coli*, the RND EP, AcrAB-TolC, primarily involved in drug efflux, can also impart bile salt resistance [10]. Biofilms are complex microbial communities attached to several surfaces, including implanted devices such as urinary catheters. It is well-known that bacteria encased in biofilm show a greater degree of antibiotic resistance than planktonic cells. The relationship between antimicrobial tolerance of biofilm and EPs has been reported in several bacterial species [66]. For example, the antimicrobial tolerance of biofilms in *P. aeruginosa* increases due to the expression of the multidrug EPs MexAB--OprM and MexEF-OprN [67]. The upregulation of EPs affects the flagellar motility, which plays a crucial role in biofilm formation [68]. The deletion of genes encoding RND EP diminished the ability of biofilm formation in *S. maltophilia* and the retraction of flagellar formation [69]. Intriguingly, the upregulation of RND efflux causes inhibition of the type III secretion system in *P. aeruginosa*, which deliver bacterial toxins into the host cell, thus reducing the virulence [70].

AcrAB-TolC, MexAB-OprM, AdeFGH and AcrD are crucial in biofilm formation. Numerous studies have examined the relationship between EPs and biofilm formation [71–73]. Gene expression studies using microarrays have shown that efflux encoding genes, *mdtF* and *lsrA* are upregulated during biofilm formation and QS in *E. coli* [8]. *Klebsiella* sp. isolates exhibiting efflux activity formed strong biofilm [74]. A strong correlation exists between the overexpression of the AdeFGH EP and biofilm formation by clinical isolates of *A. baumannii* [6]. Further, efflux genes *yihN* and *mdtO* are overexpressed in *E. coli* biofilms and are involved in the efflux of glucose, a major constituent of the extracellular polymer matrix [75]. An MDR EP, YhcQ confer drug resistance in the *E. coli* biofilm, whereas TolC plays an important role in the adhesion and biofilm formation in enteroaggregative *E. coli* [66]. MexAB-OprM EP extruded tetracycline, chloramphenicol, quinolones and β-lactams in *P. aeruginosa* biofilms [76]. Correlation between biofilm formation, drug resistance, and efflux mechanism has been reported in *P. aeruginosa* recently. In addition, the occurance of such cases may be a major public health concern in the treatment of infections caused by the pathogen [77]. Several EP genes, ie. *acrA*, *emrB*, *oqxA* are overexpressed in *K. pneumoniae* biofilms [71]. Deletion of the *bcr* gene decreased the biofilm formation of *P. mirabilis* and reduced catheter blockage [78]. Similarly, deletion of EP encoding genes (acrB, acrD, acrEF, emrAB, macAB, mdfA, mdsABC, mdtABC, mdtK, and tolC) impaired biofilm formation in *Salmonella enterica* [79]. The EPs play an important role in *Helicobacter pylori* biofilm drug resistance. Studies have shown upregulation of EP encoding genes (kefB, hefA, yckJ, tetA, gln, crdB/hefG and ybhS) in biofilm compared to planktonic cells [80]. These data, taken together, strongly show a relationship between efflux activity and biofilm development.

4. Efflux Pump Inhibitors

Efflux abolition could be accomplished by various means: (i) controlling the expression of EPs (ii) discovering new antibacterial agents that do not act as substrates, (iii) identifying small molecules inhibiting the EPs or mimicking the substrates and subsequently blocking EP [15]. The Efflux Pump Inhibitors (EPIs) are molecules capable of inhibiting EPs and preventing the extrusion of foreign compounds. EPIs, inhibit EPs by one or more mechanisms mentioned above. The synergistic activity of EPI and the antibiotics can strengthen their efficacy against bacteria expressing EPs, as this might lead to an adequate accumulation of an antibiotic inside the cell. Eventhough several EPIs have been identified at the experimental level in recent years, none have been approved by the FDA and used therapeutically.

The relationship between EPs and biofilm formation is well understood, therefore, EPIs can also reduce biofilm formation. Several EPIs act as biofilm disruptors, e.g., the combinations of EPIs, thioridazine with Phenylalanine-arginine β-naphthylamide (PaβN) and thioridazine with 1-naphthylmethyl-piperazine (NMP) reduced 80–99% of biofilm formation in *E. coli* [81]. Biofilm inhibitors such as reserpine, linoleic acid, berberine and curcumin exhibited efflux inhibitory activity in *K. pneumoniae* [82]. EPIs can also act as adjuvants, e.g., PAβN and NMP can compete with levofloxacin for the binding site of RND pumps (MexAB, MexCD and MexEF) in *P. aeruginosa* and *E. coli* (AcrAB and AcrEF), thereby increasing the accumulation of levofloxacin [83, 84]. A competitive interaction between PAβN and polyamine potentiates the tetracycline concentration and abolishes biofilm formation in *P. aeruginosa* [85]. Other clinically approved drugs such as nilotinib, dihydroergotamine, ergoloid, azelastine, doxazosin and telmisartan are competitive inhibitors of ciprofloxacin [86]. Mahey et al., identified azoles as putative TetK EPI that reduced the *S. aureus* associated biofilm [87]. Fluoxetine and thioridazine drugs can strongly inhibit the biofilm-associated Bcr/CflA efflux system and swarming motility of *Proteus mirabilis* [88]. Quinazoline derivatives enhanced the inhibitory activity of chloramphenicol and nalidixic acid in EP over-expressing strains of *Enterobacter aerogenes*, *P. aeruginosa* and *K. pneumonia* [89]. Similarly, peptidomimetic EPI, PaβN, increases the antibacterial activity of levofloxacin and erythromycin in MexAB-OprM overexpressing clinical isolates of *P. aeruginosa* [90]. A novel EPI, conessine reduced the MIC of all antibiotics by 8-fold in MexAB-OprM overexpressed *P. aeruginosa* through competitive inhibition [91]. Carbonyl-cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) is an important EPI that can disrupt the energy or ATP levels of bacteria (oxidative phosphorylation) and abolishes the efflux of various molecules. It could reverse the colistin resistance of GNB without affective tigecycline and carbapenem resistance [92]. In another study, CCCP showed synergism with ciprofloxacin, imipenem, gentamicin and cefepime in *P. aeruginosa* [93]. CCCP is a known proton motive force inhibitor of MexAB-OprM overexpressing *P. aeruginosa* biofilm [94]. Xanthone derivatives effectively inhibit specific EPs such as AcrAB-TolC in *S. typhimurium* and NorA in *S. aureus* [95]. Oliveira-Tintino et al., reported that 1,8 naphthyridines reduced the MIC of norfloxacin and ethidium bromide in NorA overexpressing *S. aureus* strains [96]. The calcium channel blocker verapamil, clinically used to treat cardiac disorders, can inhibit ATP-dependent multidrug resistant EPs and reverse the resistance of rifampicin, ofloxacin, streptomycin, and ethidium bromide in *M. tuberculosis*. Valinomycin is a potassium-specific EPI extracted from *Streptomyces* that targets the MFS and ABC EPs. They have been shown to inhibit the P55, an MFS EP that relies on the electrochemical gradient for the active efflux of substrates in *M. tuberculosis* [97]. The list of EPIs, their mechanism of action, origin and their corresponding target EPs are shown in Table I.

Table I.
List of Efflux Pump Inhibitors based on mechanism of action, origin, targets and substrates

Mechanism of action/Compounds	EPIs	Target EPs	Bacteria	Substrates	References
1. Mechanism of Action					
Energy Disruption	CCCP-Carbonyl cyanide chlorophenyl hydrazone	MFS- *tetA*, *tetB*	*H. pylori*, *Klebsiella* spp.	Tetracycline	[98, 99]
	Synthetic EPI- IITR08027	MATE- *abeM*	*E. coli, A. baumanii*	Fluoroquinolones	[100]
	PAβN	RND- *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN*	*P. aeruginosa*	Levofloxacin Erythromycin Streptomycin	[90, 101]
Competitive Inhibition	Verapamil	MATE- *dinF* and *norM*	*M. tuberculosis*	Bedaquiline Ofloxacin	[102]
	1-(1-napthylmethyl)-piperazine (NMP)	RND- *acrAB, acrEF*	*E. coli*	Levofloxacin Rifampin Chloramphenicol	[103]
2. Plant origin					
Alkaloids	Reserpine (*Rawfolia serpentia*)	MFS- *norA, tetK, Bmr* MATE- *mepA*	*S. aureus* *Bacillus subtilis* *Streptococcus pneumoniae*	Norfloxacin Tetracycline Ciprofloxacin	[104]
	Piperine (*Piper nigram*)	ABC transporters MFS- *norA*	*S. aureus, Mycobacterium tuberculosis*	Ciprofloxacin Rifampicin	[105]
	Conessine (*Holarrheaa antidysenterica*)	RND- *adeIJK*, *mexAB-oprM*	*Acinetobacter baumannii*	Novobiocin Rifampicin	[91]

Table I Continued

	EPIs	Target EPs	Bacteria	Substrates	References
Flavanoids	Baicalein (*Thymus vulgaris*)	MFS- *tetK, norA*	*Staphylococci*	Tetracycline Ciprofloxacin	[106, 107]
	5'-methoxy-hydnocarpin (*Berberis fremontii*)	MFS- *norA*	*S. aureus*	Tetracycline Norfloxacin Berberine	[108]
	Genistein (Isoflavone)	MFS- *norA*	*S. aureus*	Berberine	[109]
	Epigallocatechin gallate	MFS- *tetK*	*Staphylococci* *Camphylobacter*	Tetracycline Erythromycin Ciprofloxacin	[110]
Polyphenols	Curcumin (*Curcuma longa*)	MFS- *norA* RND	*S. aureus* *P. aeruginosa*	Norfloxacin Ciprofloxacin Gentamicin	[111, 112]
	Coumarin (*Mesua ferrea*)	MFS- *norA*	*S. aureus*	Norfloxacin Ciprofloxacin	[113]
Phenolic diterpenes	Carnosic acid (*Rosmarinus officinalis)*	ABC transporter *msrA*	*S. aureus*	Erythromycin	[114]
Monoterpenoid	Carnosol (*Rosmarinus officinalis)*	ABC transporter *msrA* MFS- *tetK*	*S. aureus*	Tetracycline	[114]
	Geraniol (*Helichrysum italicum*)	RND- *acrAB-tolC*	*Enterobacter aerogenes*	Chloramphenicol	[115]
	Catharanthine (*Catharanthus roseus*)	RND- *mexAB-oprM*	*P. aeruginosa*	Tetracycline Streptomycin	[116]
3. Synthetic origin					
Quinolone derivatives	Pyridoquinolones	RND- *acrAB-tolC*	*Enterobacter aerogenes*	Norfloxacin	[117]
Arylpiperidines and aryl piperazine derivatives	Phenylpiperadines	RND- *acrAB-tolC*	*E. coli*	Linezolid	[118]
Pyridopyrimidine and pyranopyridine derivatives	D2 and D13-9001 MBX2319	RND- *mexAB-oprM* RND- *acrAB-tolC*	*P. aeruginosa* *E. coli*	Fluoroquinolones Fluoroquinolones	[119, 120] [121]
Naphthyridine derivatives	1,8-naphthyridines sulfonamide	MFS- *norA*	*S. aureus*	Norfloxacin Ethidium bromide	[97]
Boronic acid derivatives	6-(3-Phenylpropoxy) pyridine-3-boronic acid	MFS- *norA*	*S. aureus*	Ciprofloxacin Ethidium bromide	[122]
Indole derivatives	3-amino-6-carboxyl-indole 3-nitro-6-amino-indole	RND- *acrAB-tolC*	*E. coli*	Chloramphenicol Tetracycline Erythromycin Ciprofloxacin	[123, 124]
4. Clinically approved drug					
Hypoglycemic biguanide drug	Metformin	RND- *acrAB-tolC* MATE- *mdtK*	*K. pneumoniae*	Ampicillin-sulbactam Meropenem Amikacin	[125]
Tyrosine kinase Inhibitor	Nilotinib	MFS- *EmrD*	*S. aureus*	Ciprofloxacin	[86]
Ergot alkaloid--vasoconstrictor	Dihydroergotamine	MFS- *norA*	*S. aureus*	Ciprofloxacin	[86]
5. Microbial origin					
	EA-371α and EA-371d (fermentation extract of *Streptomyces* spp.	RND- *mexAB-oprM*	*P. aeruginosa*	Levofloxacin	[126]

The chemical compound must follow specific criteria to make it an ideal EPI. The first and foremost rule is that the molecule must not be antibacterial. Secondly, it should be selective and target only bacterial EPs. Thirdly, it should be non-toxic with high therapeutic and safety indices and good ADMET

(Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity) [127]. The toxicity of EPI can be lowered by co-administering them with membrane permeabilizing antimicrobial peptides (AMP) such as Polymyxin B nonapeptide (PMBN), which has five times lower toxicity than the parent compound polymyxin B [128]. The nephrotoxicity of PMBN was low when compared to polymyxin B (PMB) and polymyxin E (Colistin) in mice [129]. The cytotoxicity of polyamines towards eukaryotic cells are relatively low, and it would strongly enhance the antibacterial activity [85].

Computational approaches have led to the discovery of novel EPIs such as PAβN, novel pyranopyridine (D13-9001), and novel pyranopyridine (MBX2319) [130]. Molecular dynamics simulation (MDS), advanced three-dimensional structural resolution and molecular modelling can help identify possible inhibitors with pharmacophores that can detect a specific binding site on the EP [131]. Several studies have been made on the correlation of molecular interactions between EPIs and bacterial pumps via molecular docking [132].

In summary, EPs significantly contribute to drug resistance and survival of bacteria in the biofilm by extruding clinically relevant antibiotics. Therefore, the present investigation highlights that EPs could be an attractive target for antimicrobial drug development.

Acknowledgement

Research funding under the Performance Linked Encouragement for Academic Studies and Endeavour (PLEASE) scheme, Kerala Government, and Consolidation of University Research for Innovation and Excellence in Women Universities (CURIE), DST, New Delhi are duly acknowledged. The University Grants Commission, Junior Research Fellowship, awarded to Minsa Mini, is duly acknowledged.

References

1. 2019 antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240000193 (2021)
2. Kabra R., Chauhan N., Kumar A., Ingale P., Singh S.: Efflux pumps and antimicrobial resistance: Paradoxical components in systems genomics. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **141**, 15–24 (2019)
3. Reygaert W.C.: An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS. Microbiol*. **4**, 482–501 (2018)
4. Nikaido H.: Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 516–523 (1998)
5. Langevin A.M., Dunlop M.J.: Stress introduction rate alters the benefit of AcrAB-TolCefflux pumps. *J. Bacteriol.* **200**, e00525-17 (2017)
6. He X., Lu F., Yuan F., Jiang D., Zhao P., Zhu J., Cheng H., Cao J., Lu G.: Biofilm formation caused by clinical *Acinetobacter baumannii* isolates is associated with overexpression of the AdeFGH efflux pump. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **59**, 4817–4825 (2015)
7. Favre-Bonté S., Köhler T., Van Delden C.: Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 598–604 (2003)
8. Schembri M.A., Kjaergaard K., Klemm P.: Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol*. **48**, 253–267 (2003)
9. Diggle S.P., Winzer K., Lazdunski A., Williams P., Cámara M.: Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J. Bacteriol.* **184**, 2576–2586 (2002)
10. Thanassi D.G., Cheng L.W., Nikaido H.: Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **179**, 2512–2518 (1997)
11. Taylor D.L., Bina X.R., Bina J.E.: *Vibrio cholerae* VexH encodes a multiple drug efflux pump that contributes to the production of cholera toxin and the toxin co-regulated pilus. *PloS One*, **7**, e38208 (2012)
12. Schindler B.D., Kaatz G.W.: Multi-drug efflux pumps of Gram--positive bacteria. Drug. Resist. *Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer. Chemother*. **27**, 1–13 (2016)
13. Li X-Z., Plésiat P., Nikaido H.: The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev*. **28**, 337–418 (2015)
14. Handzlik J., Matys A., Kieć-Kononowicz K.: Recent advances in Multi-Drug Resistance (MDR) efflux pump inhibitors of Gram--positive bacteria *S. aureus*. *Antibiotics*, **2**, 28–45 (2013)
15. Sharma A., Gupta V.K., Pathania R.: Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian. J. Med. Res*. **149**, 129–145 (2019)
16. Auda I.G., Ali Salman I.M., Odah J.G.: Efflux pumps of Gram--negative bacteria in brief. *Gene Reports*, 100666 (2020)
17. Lubelski J., Konings W.N., Driessen A.J.M.: Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **71**, 463–476 (2007)
18. Pao SS., Paulsen I.T., Saier M.H. Jr.: Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol. Biol. Rev*. **62**, 1–34 (1998)
19. Kuroda T., Tsuchiya T.: Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim. Biophys. Acta. BBA – Proteins. Proteomics.* **1794**, 763–768 (2009)
20. Jack D.L., Yang N.M., Saier M.H Jr.: The drug/metabolite transporter superfamily: The DMT superfamily. *Eur. J. Biochem.* **268**, 3620–3639 (2001)
21. Nikaido H., Takatsuka Y.: Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim. Biophys. Acta. BBA – Proteins. Proteomics.* **1794**, 769–781 (2009)
22. Mi W., Li Y., Yoon S.H., Ernst R.K., Walz T., Liao M.: Structural basis of MsbA-mediated lipopolysaccharide transport. *Nature,* **549**, 233–237 (2017)
23. Higgins C.F.: ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res. Microbiol.* **152**, 205–210 (2001)
24. Xiong J., Mao D., Liu L.: Research progress on the role of ABC transporters in the drug resistance mechanism of intractable epilepsy. *BioMed. Res. Int*. **2015**, 1–10 (2015)
25. Wilkens S.: Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime. Rep*. **7**, 14 (2015)
26. van Veen H.W., Venema K., Bolhuis H., Oussenko I., Kok J., Poolman B., Driessen A.J., Konings W.N.: Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10668–10672 (1996)
27. Dalmas O., Do Cao M-A., Lugo M.R., Sharom F.J., Di Pietro A., Jault M.A.: Time-resolved fluorescence resonance energy transfer shows that the bacterial multidrug ABC half-transporter BmrA functions as a homodimer. *Biochemistry,* **44**, 4312–4321 (2005)
28. Fitzpatrick A.W.P., Du D. *et al.*: Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nat. Microbiol*. **2**, 17070 (2017)
29. Choudhuri B.S., Bhakta S., Barik R., Basu J., Kundu M., Chakrabarti P.: Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes

drrA and drrB of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **367**, 279–285 (2002)
30. Robertson G.T., Doyle T.B., Lynch A.S.: Use of an efflux-deficient *Streptococcus pneumoniae* strain panel to identify ABC--class multidrug transporters involved in intrinsic resistance to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **49**, 4781–4783 (2005)
31. Hürlimann L.M., Corradi V., Hohl M., Bloemberg G.V., Tieleman D.P., Seeger M.A.: The heterodimeric ABC transporter EfrCD mediates multidrug efflux in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **60**, 5400–5411 (2016)
32. Al-Hamad A., Upton M., Burnie J.: Molecular cloning and characterization of SmrA, a novel ABC multi-drug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother*. **64**, 731–734 (2009)
33. Matsuo T., Chen J., Minato Y., Ogawa W., Mizushima T., Kuroda T., Tsuchiya T.: SmdAB, a heterodimeric ABC-type multi-drug efflux pump, in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol*. **190**, 648–654 (2008)
34. Huda N., Lee E-W., Chen J., Morita Y., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T.: Molecular cloning and characterization of an ABC multidrug efflux pump, VcaM, in non-O1 *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **47**, 413–2417 (2003)
35. Feng Z., Liu D., Liu Z., Liang Y., Wang Y., Liu Q., Liu Z., Zang Z., Cui Y.: Cloning and functional characterization of putative *Escherichia coli* ABC multidrug efflux transporter YddA. *J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 982–995 (2020)
36. Quistgaard E.M., Löw C., Guettou F., Nordlund P.: Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **17**, 123–132 (2016)
37. Ren Q., Chen K., Paulsen I.T.: TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. *Nucleic. Acids. Res*. **35**, D274-D279 (2007)
38. Henderson P.J.: The 12-transmembrane helix transporters. *Curr. Opin. Cell. Biol*. **5**, 708–721 (1993)
39. Edgar R., Bibi E.: MdfA, an *Escherichia coli* multi-drug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *J. Bacteriol*. **179**, 2274 (1997)
40. Putman M., van Veen H.W., Degener J.E., Konings W.N.: The lactococcal secondary multidrug transporter LmrP confers resistance to lincosamides, macrolides, streptogramins and tetracyclines. *Microbiology*, **147**, 2873–2880 (2001)
41. Fontaine F., Hequet A., Voisin-Chiret A.S., Bouillon A., Lesnard A., Cresteil T., Jolivalt C., Rault S.: First identification of boronic species as novel potential inhibitors of the *Staphylococcus aureus*NorA efflux pump. *J. Med. Chem*. **57**, 2536–2548 (2014)
42. Bolhuis H., van Veen H.W., Poolman B., Driessen A.J., Konings W.N.: Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS. Microbiol. Rev.* **21**, 55–84 (1997)
43. Li X.Z., Nikaido H.: Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, **69**, 1555–1623 (2009)
44. Alav I., Kobylka J., Kuth M.S., Pos K.M., Picard M., Blair J.M.A., Bavro V.N.: Structure, assembly, and function of tripartite efflux and type 1 secretion systems in Gram-negative bacteria. *Chem. Rev*. **121**, 5479–5596 (2021)
45. Leung Y.M., Holdbrook D.A., Piggot T.J., Khalid S.: The NorM MATE transporter from *N. gonorrhoeae*: insights into drug and ion binding from atomistic molecular dynamics simulations. *Biophys. J.* **107**, 460–468 (2014)
46. Radchenko M., Symersky J., Nie R., Lu M.: Structural basis for the blockade of MATE multidrug efflux pumps. *Nat. Commun.* **6**, 1–11 (2015)
47. Morita Y., Kodama K., Shiota S., Mine T., Kataoka A., Mizushima T., Tsuchiya T.: NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **42**, 5 (1998)
48. Kusakizako T., Miyauchi H., Ishitani R., Nureki O.: Structural biology of the multidrug and toxic compound extrusion superfamily transporters. *Biochim. Biophys. Acta. BBA – Biomembr*. **1862**, 183154 (2020)
49. Kaatz G.W., McAleese F., Seo S.M.: Multi-drug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multi-drug and toxin extrusion (MATE) transport protein. *Antimicrob. Agents.Chemother*. **49**, 1857–1864 (2005)
50. McAleese F., Petersen P., Ruzin A., Dunman PM., Murphy E., Projan SJ., Bradford PA.: A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **49**, 1865–1871 (2005)
51. Tanihara Y., Masuda S., Sato T., Katsura T., Ogawa O., Inui K.: Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. *Biochem. Pharmacol*. **74**, 359–371 (2007)
52. He G.X., Kuroda T., Mima T., Morita Y., Mizushima T., Tsuchiya T.: An H(+)–coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. **186**, 262–265 (2004)
53. Heir E., SundheimG., Holck A.L.: The qacG gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *J. Appl. Microbiol*. **86**, 378–388 (1999)
54. Bay D.C., Rommens K.L., Turner R.J.: Small multi-drug resistance proteins: A multi-drug transporter family that continues to grow. *Biochim. Biophys. Acta. BBA – Biomembr*. **1778**, 1814–1838 (2008)
55. Paulsen I.T., Skurray R.A., Tam R., Saier M.H. Jr., Turner R.J., Weiner J.H., Goldberg E.B., Grinius L.L.: The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol*. **19**, 1167–1175 (1996)
56. Yerushalmi H., Lebendiker M., Schuldiner S.: EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H^+ and is soluble in organic solvents. *J. Biol. Chem*. **270**, 6856–6863 (1995)
57. Choudhary S., Sar P.: Real-time PCR based analysis of metal resistance genes in metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain J007: Real-time PCR-based analysis of metal resistance genes. *J. Basic. Microbiol*. **56**, 688–697 (2016)
58. MagnetS., Courvalin P., Lambert T.: Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **45**, 3375–3380 (2001)
59. Xu C., Bilya S.R., Xu W.: adeABC efflux gene in *Acinetobacter baumannii*. *New. Microbes. New. Infect*. **30**, 100549 (2019)
60. Piddock L.J.V.: Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev*. **19**, 382–402 (2006)
61. Nakashima R., Sakurai K., Yamasaki S., Nishino K., Yamaguchi A.: Structures of the multi-drug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature*, **480**, 565–569 (2011)
62. Du D., Wang Z., James N.R., Voss J.E., Klimont E., Ohene-Agyei T., Venter H., Chiu W., Luisi B.F.: Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature*, **509**, 512–515 (2014)
63. Li X.Z., Livermore D.M., Nikaido H.: Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **38**, 1732–1741 (1994)
64. Tsukazaki T.: Structure-based working model of SecDF, a proton-driven bacterial protein translocation factor. *FEMS. Microbiol. Lett*. **365**, 112 (2018)

65. Alcalde-Rico M, Hernando-Amado S, Blanco P, Martínez J.L.: Multidrug efflux pumps at the crossroad between antibiotic resistance and bacterial virulence. *Front. Microbiol*. **7**, 1483 (2016)
66. Soto S.M.: Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, **4**, 223–229 (2013)
67. Liao J., Schurr M.J., Sauer K.: The MerR-like regulator BrlR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol*. **195**, 3352–3363 (2013)
68. Houry A., Gohar M., Deschamps J., Tischenko E., Aymerich S., Gruss A., Briandet R.: Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **109**, 13088–1309313 (2012)
69. Lin Y.T., Huang Y.W., Chen S.J., Chang C.W., Yang T.C.: The SmeYZ efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* contributes to drug resistance, virulence-related characteristics, and virulence in mice. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **59**, 4067–4073 (2015)
70. Linares J.F., López J.A., Camafeita E., Albar J.P., Rojo F., Martínez J.L.: Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol*. **187**, 1384–1391 (2005)
71. Tang M., Wei X., Wan X., Ding Z., Ding Y., Liu J.: The role and relationship with efflux pump of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Microb. Pathog*. **147**, 104244 (2020)
72. Sánchez P., Linares J.F., Ruiz-Díez B., Campanario E., Navas A., Baquero F., Martínez J.L.: Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* nalB and nfxB multidrug resistant mutants. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 657–664 (2002)
73. Alav I., Sutton J.M., Rahman K.M.: Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J. Antimicrob. Chemother*. **73**, 2003–2020 (2018)
74. Akinpelu S., Ajayi A., Smith S.I., Adeleye A.I.: Efflux pump activity, biofilm formation and antibiotic resistance profile of *Klebsiella* spp. isolated from clinical samples at Lagos University Teaching Hospital. *BMC Res. Notes*. **13**, 1–5 (2020)
75. Pasqua M., Grossi M., Zennaro A., Fanelli G., Micheli G., Barras F., Colonna B., Prosseda G.: The varied role of efflux pumps of the MFS family in the interplay of bacteria with animal and plant cells. *Microorganisms*, **7**, e285 (2019)
76. Scoffone V.C., Trespidi G., Barbieri G., Irudal S., Perrin E., Buroni S.: Role of RND efflux pumps in drug resistance of cystic fibrosis pathogens. *Antibiot. Basel. Switz*. **10**, 863 (2021)
77. Ugwuanyi F.C., Ajayi A., Ojo D.A., Adeleye A.I., Smith S.I.: Evaluation of efflux pump activity and biofilm formation in multidrug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Federal Medical Center in Nigeria. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob*. **20**, 11 (2021)
78. Holling N., Jones B.V. *et al*.: Elucidating the genetic basis of crystalline biofilm formation in *Proteus mirabilis. Infect. Immun*. **82**, 1616–1626 (2014)
79. Baugh S., Ekanayaka A.S., Piddock L.J., Webber M.A.: Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. *J. Antimicrob. Chemother*. **67**, 2409–2417 (2012)
80. Krzyżek P., Grande R., Migdał P., Paluch E., Gościniak G.: Biofilm formation as a complex result of virulence and adaptive responses of *Helicobacter pylori*. *Pathogens*, **9**, 1062 (2020)
81. Kvist M., Hancock V., Klemm P.: Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7376–7382 (2008)
82. Magesh H., Kumar A., Alam A., Priyam., Sekar U., Sumantran V.N., Vaidyanathan R.: Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Indian. J. Exp. Biol*. **51**, 764–772 (2013)
83. Rampioni G., Pillai C.R., Longo F., Bondì R., Baldelli V., Messina M., Imperi F., Visca P., Leoni L.: Effect of efflux pump inhibition on *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome and virulence. *Sci. Rep.* **7**, 11392 (2017)
84. Casalone E., Vignolini T., Braconi L., Gardini L., Capitanio M., Pavone F.S., Dei S., Teodori E.: 1-benzyl-1,4-diazepane reduces the efflux of resistance-nodulation-cell division pumps in *Escherichia coli*. *Future. Microbiol.* **15**, 987–999 (2020)
85. Fleeman R.M., Debevec G., Antonen K., Adams J.L., Santos R.G., Welmaker G.S., Houghten R.A., Giulianotti M.A., Shaw L.N.: Identification of a novel polyamine scaffold with potent efflux pump inhibition activity toward multi-drug resistant bacterial pathogens. *Front. Microbiol*. **9**, 1301 (2018)
86. Zimmermann S., Klinger-Strobel M., Bohnert J.A., Wendler S., Rödel J., Pletz M.W., Löffler B., Tuchscherr L.: Clinically approved drugs inhibit the *Staphylococcus aureus* multidrug NorA efflux pump and reduce biofilm formation. *Front. Microbiol.* **10**, 2762 (2019)
87. Mahey N., Tambat R., Verma D.K., Chandal N., Thakur K.G., Nandanwar H.: Antifungal azoles as tetracycline resistance modifiers in *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **87**, e00155–21 (2021)
88. Nzakizwanayo J., Jones B.V. *et al*.: Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystalline biofilm formation by *Proteus mirabilis*. *Sci. Rep*. **7**, 12222 (2017)
89. Chevalier J., Mahamoud A., Baitiche M., Adam E., Viveiros M., Smarandache A., Militaru A., Pascu M.L., Amaral L., Pagès J.M.: Quinazoline derivatives are efficient chemosensitizers of antibiotic activity in *Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* resistant strains. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **36**, 164–168 (2010)
90. Lomovskaya O., Lee V.J. *et al*.: Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. **45**, 105–116 (2001)
91. Siriyong T., Srimanote P., Chusri S., Yingyongnarongkul B.E., Suaisom C., Tipmanee V., Voravuthikunchai S.P.: Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC. Complement. Altern. Med*. **17**, 405 (2017)
92. Osei Sekyere J., Amoako D.G.: Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Front. Microbiol*. **8**, 228 (2017)
93. Adabi M., Talebi-Taher M., Arbabi L., Afshar M., Fathizadeh S., Minaeian S., Moghadam-Maragheh N., Majidpour A.: Spread of efflux pump overexpressing-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by using an efflux pump inhibitor. *Infect Chemother*. **47**, 98–104 (2015)
94. Ikonomidis A., Tsakris A., Kanellopoulou M., Maniatis A.N., Pournaras S.: Effect of the proton motive force inhibitor carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Lett. Appl. Cccp Microbiol.* **47**, 298–302 (2008)
95. Durães F., Resende D.I.S.P., Palmeira A., Szemerédi N., Pinto M.M.M., Spengler G., Sousa E.: Xanthones active against multidrug resistance and virulence mechanisms of bacteria. *Antibiotics,* **10**, 600 (2021)
96. Oliveira-Tintino C.D.M., Silva T.G.D. *et al*.: The 1,8-naphthyridines sulfonamides are NorA efflux pump inhibitors. *J. Glob. Antimicrob. Resist*. **24**, 233–240 (2021)
97. Pule C.M., Sampson S.L., Warren R.M., Black P.A., van Helden P.D., Victor T.C., Louw G.E.: Efflux pump inhibitors: targeting mycobacterial efflux systems to enhance TB therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 17–26 (2016)
98. Fenosa A., Fusté E., Ruiz L., Veiga-Crespo P., Vinuesa T., Guallar V., Villa T.G., Viñas M.: Role of TolC in *Klebsiella*

oxytoca resistance to antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother*. **63**, 668–674 (2009)
99. Anoushiravani M., Falsafi T., Niknam V.: Proton motive force--dependent efflux of tetracycline in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol*. **58**, 1309–1313 (2009)
100. Bhattacharyya T., Sharma A., Akhter J., Pathania R.: The small molecule IITR08027 restores the antibacterial activity of fluoroquinolones against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* by efflux inhibition. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **50**, 219–226 (2017)
101. Renau T.E., Ohta T. *et al*., Nakayama K.: Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. *J. Med. Chem.* **42**, 4928–4931 (1999)
102. Gupta S., Cohen K.A., Winglee K., Maiga M., Diarra B., Bishai W.R.: Efflux inhibition with verapamil potentiates bedaquiline in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **58**, 574–576 (2014)
103. Bohnert J.A., Kern W.V.: Selected arylpiperazines are capable of reversing multi-drug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **49**, 849–852 (2005)
104. Stavri M., Piddock L.J.V., Gibbons S.: Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 1247–1260 (2007)
105. Kumar A., Qazi G.N. *et al*.: Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother*. **61**, 1270–1276 (2008)
106. Chan B.C., Leung P.C. *et al*.: Synergistic effects of baicalein with ciprofloxacin against NorA over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *J. Ethnopharmacol*. **137**, 767–773 (2011)
107. Fujita M., Shiota S., Kuroda T., Hatano T., Yoshida T., Mizushima T., Tsuchiya T.: Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol*. **49**, 391–396 (2005)
108. Stermitz F.R., Lorenz P., Tawara J.N., Zenewicz L.A., Lewis K.: Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **97**, 1433–1437 (2000)
109. AlMatar M., Albarri O., Makky E.A., Köksal F.: Efflux pump inhibitors: new updates. *Pharmacol. Rep. PR*. **73**, 1–16 (2021)
110. SudanoRoccaro A., Blanco A.R., Giuliano F., Rusciano D., Enea V.: Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **48**, 1968–1973 (2004)
111. Joshi P., Kumar A. *et al*.: Osthol and curcumin as inhibitors of human Pgp and multidrug efflux pumps of *Staphylococcus aureus*: reversing the resistance against frontline antibacterial drugs. *Med. Chem. Comm*. **5**, 1540–1547 (2014)
112. Negi N., Prakash P., Gupta M.L., Mohapatra T.M.: Possible role of curcumin as an efflux pump inhibitor in multi drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR*. **8**, DC04-DC07 (2014)
113. Roy S., Kumari N., Pahwa S., Agrahari U., Bhutani K., Jachak S., Nandanwar H.: NorA efflux pump inhibitory activity of coumarins from *Mesua ferrea*. *Fitoterapia*, **90**, 140–150 (2013)
114. Oluwatuyi M., Kaatz G.W., Gibbons S.: Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, **65**, 3249–3254 (2004)
115. Lorenzi V., Muselli A., Bernardini A.F., Berti L., Pagès J.M., Amaral L., Bolla J.M.: Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gram-negative species. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **53**, 2209–2211 (2009)
116. Dwivedi G.R., Tyagi R., Sanchita., Tripathi S., Pati S., Srivastava S.K., Darokar M.P., Sharma A.: Antibiotics potentiating potential of catharanthine against superbug *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biomol. Struct. Dyn*. **36**, 4270–284 (2018)
117. Chevalier J., Atifi S., Eyraud A., Mahamoud A., Barbe J., Pagès J.M.: New pyridoquinoline derivatives as potential inhibitors of the fluoroquinolone efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. *J. Med. Chem*. **44**, 4023–4026 (2001)
118. Kaatz G.W., Moudgal V.V., Seo S.M., Hansen J.B., Kristiansen J.E.: Phenylpiperidine selective serotonin reuptake inhibitors interfere with multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **22**, 254–261 (2003)
119. Opperman T.J., Nguyen S.T.: Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Front. Microbiol*. **6**, 421 (2015)
120. Mahmood H.Y., Jamshidi S., Sutton J.M., Rahman K.M.: Current advances in developing inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps. *Curr. Med. Chem*. **23**, 1062–1081 (2016)
121. Vargiu A.V., Ruggerone P., Opperman T.J., Nguyen S.T., Nikaido H.: Molecular mechanism of MBX2319 inhibition of *Escherichia coli* AcrB multidrug efflux pump and comparison with other inhibitors. *Antimicrob. Agents. Chemother*. **58**, 6224–6234 (2014)
122. Fontaine F., Héquet A., Voisin-Chiret A.S., Bouillon A., Lesnard A., Cresteil T., Jolivalt C., Rault S.: Boronic species as promising inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump: study of 6-substituted pyridine-3-boronic acid derivatives. *Eur. J. Med. Chem*. **95**, 185–198 (2015)
123. Zeng B., Wang H., Zou L., Zhang A., Yang X., Guan Z.: Evaluation and target validation of indole derivatives as inhibitors of the AcrAB-TolC efflux pump. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **74**, 2237–2241 (2010)
124. Rana T., Singh S., Kaur N., Pathania K., Gaur U.: A review on efflux pump inhibitors of medically important bacteria from plant sources. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. **26**, 101–111 (2014)
125. Abbas H., Shaker G., Khattab R., Askoura M.: A new role of metformin as an efflux pump inhibitor in *Klebsiella pneumonia*. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci*. **11**, e4232–e4232 (2021)
126. Lee M.D., Galazzo J.L., Staley A.L., Lee J.C., Warren M.S., Fuernkranz H., Chamberland S., Lomovskaya O., Miller G.H.: Microbial fermentation-derived inhibitors of efflux-pump--mediated drug resistance. *Farm. Soc. Chim. Ital. 1989*. **56**, 81–85 (2001)
127. Bhardwaj A.K., Mohanty P.: Bacterial efflux pumps involved in multi-drug resistance and their inhibitors: rejuvinating the antimicrobial chemotherapy. Recent. Patents. *Anti-Infect. Drug. Disc*. **7**, 73–89 (2012)
128. Ferrer-Espada R., Shahrour H., Pitts B., Stewart P.S., Sánchez--Gómez S., Martínez-de-Tejada G.: A permeability-increasing drug synergizes with bacterial efflux pump inhibitors and restores susceptibility to antibiotics in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Sci. Rep*. **9**, 3452 (2019)
129. Keirstead N.D., Kern G. *et al*.: Early prediction of polymyxin--induced nephrotoxicity with next-generation urinary kidney injury biomarkers. *Toxicol. Sci*. **137**, 278–291 (2014)
130. Rathi E., Kumar A., Kini S.G.: Computational approaches in efflux pump inhibitors: current status and prospects. *Drug. Discov. Today*. **25**, 1883–1890 (2020)
131. Pagès J-M., Amaral L., Fanning S.: An original deal for new molecule: reversal of efflux pump activity, a rational strategy to combat Gram-negative resistant bacteria. *Curr. Med. Chem*. **18**, 2969–2980 (2011)
132. Mehla J., Zgurskaya H.I. *et al*.: Predictive rules of efflux inhibition and avoidance in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*. **12**, 02785–20 (2021)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 3, 115–123
DOI: 10.2478/am-2022.010

A REVIEW OF PROBIOTIC APPLICATIONS IN POULTRY: IMPROVING IMMUNITY AND HAVING BENEFICIAL EFFECTS ON PRODUCTION AND HEALTH

Shumaila Yousaf[1], Hafiz Muhammad Nouman[2], Ibrar Ahmed[3], Sabir Husain[4], Muhammad Waseem[5], Shahid Nadeem[1], Muhammad Tariq[6], Ozge Sizmaz[7]*, Muhammad Farhan Zafar Chudhry[8]

[1] Nuclear Institute of Agriculture and Biology, Faisalabad, Pakistan
[2] Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Kirikkale Universitesi, Kirikkale, Turkey
[3] Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University, Konya, Turkey
[4] Department of Poultry Science, Cholistan University of Veterinary and Animal Sciences, Bahawalpur, Pakistan
[5] Department of Surgery and Pet Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore, Pakistan
[6] Department of Livestock Management, University of Agriculture, Faisalabad, Sub-Campus Toba Tek Singh, Pakistan
[7] Department of Microbiology, Government College University, Faisalabad, Pakistan
[8] Department of Animal Nutrition and Nutritional diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey

Received in December 2021, accepted in July 2022

Abstract: A new class of feed additives and nutritional supplements, known as probiotics, include bacterial, fungal, and yeast cultures from various sources. Overall, probiotics are believed to promote the health and well-being of animals, birds, and humans in a variety of settings. Incorporating probiotics into the diets of cattle and poultry has been demonstrated to improve growth, feed conversion efficiency, immunological responses, and the animal's ability to manage enteric infections. The use of probiotic-enriched chicken feed has been shown to enhance egg production by as much as 30% among laying chickens. Probiotics may be used to fight off harmful microorganisms, create antibacterial compounds (such as bacteriocins or colicins), and alter the immunological response of the host, according to the National Institutes of Health. Pathogenic microbial strains such as *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aspergillus*, and *Saccharomyces* are employed in the making of chicken products. The use of subtherapeutic doses of antimicrobial agents, including antibiotics, to combat or remove harmful bacteria and promote animal growth and feed efficiency has resulted in the accumulation of antibiotic residues in animal feed as well as the emergence of drug-resistant microbes in the feed supply chain. As a result of public health concerns, there has been a renewed emphasis on the use of probiotics in chicken production rather than antibiotics in recent years. This research examines the effects of probiotics and direct-fed microorganisms (DFM) on chicken health and performance, with a particular emphasis on the favourable effects they have on poultry health and performance.

1. Introduction. 2. Probiotics' historical development. 3. Criteria for a perfect probiotic. 4. Microbes commonly used as probiotics. 5. Probiotics in poultry applications. 6. Gastrointestinal tract probiotic colonization. 7. Continuing to improve digestion, nutrient metabolism and nutrient utilization. 8. Management of harmful pathogens and disease conditions. 9. Immunostimulation. 10. Probiotics as a growth institution. 10.1. Lactobacilli. 10.2. *Aspergillus oryzae*. 10.3. Yeast. 11. Salient benefits and recommendations for probiotic use. 12. Conclusion

Keywords: Probiotics, Poultry, Production, Health, Immunity

1. Introduction

During the past few decades, poultry farming has developed into a profitable sector in the United States. India is one among the world's top five producers of eggs, broiler chicken, and other poultry meat, according to the United Nations Food and Agriculture Organization [49]. Chicken feed accounts for more than 70% of total production expenses, making its evaluation important to the company's long-term profitability. As a result, it is critical to maximize feed efficiency while keeping expenses as low as possible [2]. Keeping in mind that new chicks have interaction with their mother and acquire microflora from the environment, the normal microflora colonization in the intestine is slow and chicks may become infected during this

* Corresponding author: Ozge Sizmaz, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey; e-mail: osizmaz@ankara.edu.tr
© 2022 Shumaila Yousaf et al.
This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

period; as a result, the concept of probiotic products intake, which is extremely beneficial, emerges during this period [32]. Because of the high demands of production, broiler chickens are subjected to a range of stressors, many of which have a detrimental influence on their general health and productivity. Under these conditions, the use of synthetic antimicrobials and antibiotics to decrease stress while simultaneously increasing growth and feed efficiency is common practice. Since the discovery of antibiotic residues and the emergence of antibiotic-resistant bacteria, the use of subtherapeutic antibiotics in chicken feed has been a prohibited in Europe [32, 43].

The term probiotics was coined as a consequence of the Greek phrase "pro bios," which translates as "for life," and refers to bacteria that are beneficial to the body. The stomach would immediately colonize it if it were a good germ, which would block the proliferation and spread of hazardous germs, and therefore prevent them from inflicting any damage. Animals, birds, and the ecology all benefit from the work, in addition to the individuals who do it. Probiotics, on the other hand, have been shown to increase livestock overall health while also boosting feed conversion and immune responses in cows and poultry. The addition of probiotics to animal feed has been shown to be both safe and effective in terms of stimulating growth in poultry birds [11]. There are various microbial species, such as *Bacillus*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. *Bacillus and Enterococcus* species are more often used in animal research rather than *Lactobacillus and Bifidobacterium* species which are more commonly used in human investigations [53]. The bacteria *Lactobacillus* has also become more used in the treatment of animals in recent years [44]. The use of probiotic supplements, which include bacteria such as lactobacilli, streptococci, and *Bacillus* bacteria, has been demonstrated to be useful in a study. The mechanism of action of probiotics has been the subject of various hypotheses [48]. The injection of probiotics to a bird's digestive tract promotes the microbial ecology of the tract, which helps to eliminate illnesses from the system. Bacterial adhesion and development in the intestines are a competitive endeavor for probiotic microorganisms. As a result, good bacteria colonize the gastrointestinal tract quickly and helps in fighting against harmful bacteria. Competition for resources, the creation of primary and secondary metabolites (antibacterial compounds), and the activation of the immune system are all factors that influence bacterial activity [50].

The use of probiotics in animal feed may aid in the improvement of the animal's gut flora balance as well as its growth performance. It is possible to distinguish two populations of microorganisms in a poultry's digestive tract: those that have colonized the gut as a result of natural exposure and eating, and those that have been introduced to the diet *via* feed or water as direct-fed microorganisms (DFM) or probiotics. Each of these communities of microorganisms plays a critical function in maintaining the health of chickens. As a result of exposure to the environment and the bird's normal feeding habits, autochthonous and allochthonous bacteria colonize the bird's digestive system and cause it to malfunction [23]. To obtain desired health and production goals, a number of criteria must be considered while choosing and delivering probiotic microorganisms [41]. Several *in vivo* and *in vitro* studies have shown that the administration of probiotics may be beneficial in the prevention and treatment of the onset of various diseases. Having a healthy commensal gut microbiota helps to keep infections under control, but if it is disturbed, then body will more likely to become ill. As a result, there has been a rise in the use of certain probiotic cultures in the chicken industry, with the goal of enhancing production while also improving animal welfare [32, 38]. This review aims to summarize the current knowledge about the colonization of probiotics in a host's gastrointestinal tract, as well as their beneficial effects on bird immunity, poultry production, and health, as well as their capability of altering a host's productivity in a direction that is more favorable to them.

2. Probiotics' historical development

Following the findings of recent research, chickens may be permitted to forego antibiotics for the first time in their lives in 1930s. Several studies have shown that fermentation of milk products may extend human life and increase vigor in experimental animals, according to Elie Metchnikoff [47], who was the first to suggest that gut bacteria are important in health maintenance. According to the findings of many research, gut bacteria play an important role in the prevention of gastrointestinal disorders. "Probiotics" is said to have originated from the Greek word "pro bios," which translates as "for one's own well-being" or "for one's own benefit." Inventors Lilly and Stillwell [45] came up with the notion of "creative appropriation" and are credited with coining the term "probiotics," which means "friendly bacteria." 'Live microorganisms' are defined as "probiotics" by the World Health Organization (WHO) and the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), which affect the host's intestinal microbiome by promoting the maintenance of an optimal microbiome balance, preventing pathogens from growing and providing health benefits to the host. The term "probiotic" refers to living bacteria that, when consumed in sufficient quantities, have an effect on the host's gut microbiota and are consequently beneficial to the host. Put another way: "live microbial feed additives that benefit

the host by enhancing gut microbial balance" are what probiotics are and have been suggested for use in cattle for many years [42]. If probiotics are only a single bacterial species or a mix of numerous distinct species, the composition of the probiotics is determined by the bacterial strains that are used. It is commonly used in the treatment of diarrhea and other ailments to use probiotic microorganisms, which are strains of lactic acid-producing bacteria that may adhere to the intestinal epithelium and repair diarrhea and other difficulties. A distinct species of bacteria is considered by some to exist in comparison to other microbes [38]. In light of the possible dangers to human health and safety posed by the use of antibiotics in poultry production, finding a viable alternative to antibiotics in poultry production is now more important than it has ever been [32].

3. Criteria for a perfect probiotic

In order to be deemed successful, a probiotic product must include a substantial number of live bacteria that are capable of surviving in an unfavorable intestinal environment, such as that created by pH variations. A healthy microbiome should include bacteria that are not hazardous to humans, as well as strains that are peculiar to a particular host or environment. Because probiotics have a limited shelf life, they must be gathered as soon as possible. Among the characteristics that these bacteria must possess are the ability to quickly and efficiently attach and remove potentially harmful germs as well as the ability to drive away potentially dangerous pathogens in order to guarantee long-term survival in the gut microflora community [3]. In the future, it is envisaged to be able to develop a more effective antibiotic as well as greater control over the immune response. A probiotic's stability throughout the manufacturing process, as well as during processing and storage, is dependent on the presence or absence of antibiotic resistance genes. During the process of adding starter culture, it is essential that they are not recombinant at any time throughout the manufacturing process. It is also critical that they are fully safe to use and do not cause any bad side effects.

4. Microbes are commonly used as probiotics

Alive and infectious bacterial strains of *Bacillus, Streptococcus, Bacillus* and *Enterococcus* bacteria are often used to supplement the cattle and poultry. Cattle and fowl are also treated with *Saccharomyces*, a kind of yeast. Bacteria that produce lactic acid, has a good effect on hens' performance, are extensively utilized in this business, as are strains of these bacteria. As a treatment for antibiotic-resistant infections, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains have been shown to be the most potent bacteria. "Direct Feed Microbials (DFM)" was developed to define these organisms in acknowledgement of the fact that probiotics may also comprise fungus and yeast. One or a combination of microorganisms that are regarded harmless are often included in probiotic supplements. In terms of probiotics, *Lactobacillus* bacteria-derived ones are the most common. Due to their high resistance to pelleting temperatures and storage conditions, sporogens of yeast and *Lactobacillus* have been found [5].

5. Probiotics in poultry applications

In order to maintain a steady bacterial population in the avian gut, which is crucial for proper immunological function and feed conversion, probiotics are an important supplement. Among the many reasons why probiotics are beneficial in chicken farming include their ability to maintain a healthy gastrointestinal microbiome, increase nutrient uptake, and reduce ammonia generation [32, 38]. Chicks and poults have been shown to benefit from the use of effective probiotics [11]. *Salmonella* infection in birds may be prevented and treated with probiotic spray treatments even in chicks. Improved egg production, weight/size, and food uptake ratio may assist enhance the performance of layers and turkeys by adding probiotics to diet [4, 32, 38]. Cholesterol levels in chicken blood, egg yolks, and yolks are reduced, as is broiler limb weakness, as a result of lactic acid uptake.

6. Gastrointestinal tract probiotic colonization

Creating and maintaining a healthy microflora in the bird's digestive system is essential, as it helps to remove dangerous bacteria from the digestive tract. Chicks' stomachs are sterile when they are hatched, but they begin acquiring germs from the surroundings as soon as they are old enough approximately after 7 to 10 weeks. During this time, bad germs are more likely to spread than helpful bacteria, which means chicks are more likely to get ill. A balance between beneficial and detrimental bacteria is established as the days pass after hatching. Because of this, probiotic supplementation becomes a viable option when the balance between these two is disrupted by external or internal factors like viral pressure or stress [6]. For probiotic colonization to be successful, factors such as microbial stability and long-term interactions with hosts, as well as dose and frequency of usage, must all be considered. colony forming units (CFU) are used to measure

colonization in the beak and colon (CFU). 10^4 to 10^8 CFU/ml (lactobacilli, streptococci and enterobacteria) are found in the digestive tract, which serves as a reservoir for a range of anaerobic bacteria. Between 10^{10} and 10^3 CFU/ml, the colon and caecum are awash in bacteria A study published by Heczko et al. [39], found that some prebiotics may be found attached to particular feed particles (such as starch granules), whereas others reside fully in the digesta's watery matrix. There are many places where germs may thrive in chickens and the mucous membranes that coat the epithelial lining of intestinal villi and the caecal and colonic surfaces are among them. Mucus and epithelial cell adhesion is key selection criteria for a prospective probiotic. Lactobacilli may be found in all parts of the digestive system, either on the surface of the epithelial cells or growing in meal ingredients [7].

7. Continuing to improve digestion, nutrient metabolism, and nutrient utilization

In addition to supplying digestible proteins as well as vitamins, enzymes, and other cofactors, lactic acid generation by probiotics aids in the enhancement of digestion, nutritional metabolism, and nutrient utilization. This product's amylase, protease, and lipase content help improve the digestion and absorption of carbohydrates, protein, and fat in the feed, resulting in an improvement in the efficiency of the feed conversion process [8]. It is probiotics that help with mineral and vitamin absorption and synthesis (biotin, Vitamin-B1, Vitamin-B2, Vitamin-B12, and Vitamin-K), which are essential for proper development and metabolism [32]. In probiotic bacterial consortia, the facultative anaerobes Bifidobacterium and Lactobacillus, two forms of facultative anaerobes that diminish the intestinal redox potential, make it easier for obligatory anaerobes to proliferate. When yeast releases enzymes into the environment, it is possible that dry foods will be more readily digested. According to Dhama and Singh [32] the influence of *Aspergillus oryzae* on macronutrient metabolism may be beneficial to laying hens. To have a better understanding of the digestion process's mechanism of action, it is necessary to investigate digestive enzymes and microbial metabolites that are utilized as probiotics [9].

8. Management of harmful pathogens and disease conditions

Various stressors and pathogenic bacteria found in every animal and poultry raising unit have the potential to disrupt the gut microbiota, which may result in the lowering of the body's defenses as well as an imbalance in the gut microbiota [10]. Diarrhea and a lack of appetite are just a few of the symptoms that may occur as a result of bacteria growing in the host's digestive tract. As a result of the eradication of the natural microbiome, the efficiency and immunocompetence of chicken production will be diminished, resulting in considerable economic losses for poultry producers. It is recommended that a probiotic supplement be added in the animal's feed on a regular and timely basis in order to maintain the animal's microbiota's health and balance [12].

Competitive exclusion is a word that refers to a phenomenon that occurs when pathogens and probiotics compete for gut adhesive receptors, which are required for microorganism attachment and growth. In this approach, probiotics have an effect on the colonization of diseases by bacteria. The rapid colonization of the gastrointestinal tract makes it impossible for pathogens to establish themselves there (the creation of a thick layer of microflora). A list of antibacterial substances that can be found in the body such as bacteriocins, lactocin, lactocidin, acidophilin, reuterin, lactic and acetic acids, lactoferrin, and lactoperoxidase. Probiotics assist in neutralizing and/or absorbing the enterotoxins produced by pathogenic bacteria by releasing anti-enterotoxin molecules into the environment. Toxins, such as mycotoxins, have been detected in significant concentrations in animal feed [13]. Due to their superior colonization abilities in the gut, probiotics effectively prevent pathogens from gaining access to resources by making the best possible use of the substrate that is accessible to them. It is possible that the use of probiotics may assist to minimize litter ammonia creation, which in turn will help to lower the risk of keratoconjunctivitis, which is an eye illness caused by an excess of ammonia in the surrounding environment. According to a recent study, boosting the apoptosis of bacteria in the probiotic culture may help to minimize the risk of *Salmonella* infection in humans [40]. As a result of their intestinal microbiota, intestinal epithelium, and immune system, birds exhibit both passive and active resistance to enteric infections [38].

For the time being, we don't know how probiotics produce their positive effects. "Competitive exclusion" and "bacterial antagonism" are two putative mechanisms for probiotic bacteria to prevent viruses from entering the digestive system (such as intestinal villus and colonic crypts, which are favorite sites of enteric pathogens). A main goal of probiotics is to prevent infections from acquiring the nutrition and energy they require to grow and thrive in the gut environment. Bacterial pathogens like *E. coli* and *Salmonella* can't survive in an environment where the pH of the gut has been altered by primary and secondary metabolites

including organic acid, volatile fatty acid (VFA), and lactic acid. A class of compounds known as bacteriocins has been shown to be effective in killing or preventing the colonization of pathogenic bacteria. Piperidine inhibits the binding and internalization of bacteria by intestinal epithelial cells *in vitro*, according to a research [14].

Enteric bacterial infections and coccidian parasites are especially sensitive to probiotic treatment, which significantly enhances the intestinal immunity of birds. It was shown that several pathogens, including *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, and *Salmonella* Enteritidis, as well as *Clostridium perfringens, Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni* and *Candida albicans* have been suppressed by probiotic supplements in chicken [32]. Bacteria isolated from chicken gastrointestinal tracts were shown to limit *Salmonella, E. coli* and *Clostridium* perfringens development, as well as possessing potential probiotic characteristics. Chick with coccidiosis were demonstrated to be considerably reduced by strains of *Pediococcus, Lactobacillus,* and *Saccharomyces*. Probiotics may considerably reduce idiopathic diarrhea and *Salmonella* colonization in turkeys and broilers in commercial turkey brooding houses [40]. To avoid foodborne illnesses including *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes*, you should use probiotics sparingly [15].

9. Immunostimulation

Taking probiotics has been shown to have a variety of beneficial benefits on the immune system, including increased macrophage, lymphocyte and natural killer (NK) cell activity, increased oxidative burst in heterophils, and increased immunoglobulin production, to name a few (IgG, IgM and IgA). The usage of probiotics, which help to stabilize the stomach and regulate the immune system, may help to maintain a healthy balance between anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines. As a consequence of these observations, it has been established that probiotics may increase the number of lamina propria lymphocytes (LPL) and intestinal epithelial lymphocytes (IEL) in the small intestine while also inhibiting the development of pathogenic microorganisms [32].

Infection-associated diseases like infectious bursal disease, chicken infectious anemia, reoviral infections, Marek's disease, mycotoxins and other immune-suppressive conditions could possibly be alleviated in part by increasing cell-mediated immunity, which would aid in the fight against viral infections. Chicks are protected against a broad variety of infectious illnesses because their metabolites, which serve as immunomodulatory agents, provide protection against these infections in the first place. The use of probiotics in chicks may help to raise antibody levels against viral infections such as ND and IBD, which are frequent in the industry (IBD) [16]. It is possible to reduce the incidence of secondary infections in birds by utilizing probiotics to strengthen the immune system and check/prevent enteric infections during viral illnesses or immunosuppressive conditions (bacterial, coccidian). Probiotics are beneficial to bird health since they assist to reduce the detrimental effects of pathogenic microbes on the birds. They also significantly reduce the pathogenic microbial load in the stomach, which reduces the chance of pathogenic bacteria spreading *via* fecal contamination and other means. Because bacteria, fungi, protozoa, and viruses are responsible for the transmission of many infectious disorders, a multi-strain probiotic should be included in the diet on a regular basis [38].

The gut microbiota, epithelial cells, and immune system all contribute to the development of passive and active resistance against avian enteric illnesses. In the stomach of the avian, little is known about the control of the immune system and bacterial differentiation between "good" and "bad" bacteria by the bacteria [17]. Because of the constant interactions between diverse cell types, such as components of the innate and adaptive immune systems and bacteria in the gut lumen, epithelium, or lamina propria, intestinal enterocytes monitor the epithelial surface area for the presence of probable pathogens in the gut This equilibrium between hyper-reaction and non-reaction is accomplished as a result of the specific intestinal layout and interdigitation of immune cells across epithelial tissue. In part because the gut contains more lymphocytes than any other tissue and because its size and surface area in touch with both autochthonous and allochthonous probiotics are also important factors, the gut is sometimes referred to as the largest immune organ. It is the enterocytes of the intestinal epithelium that act as a barrier to prevent pathogens from gaining access to nutrition and assist the immune system in recognizing possible infections in the lumen [18].

Probiotics' role in an immunological context must be examined in greater detail. One way probiotics can help the body is to boost intestinal and/or systemic immunity, but they can also do other things. Studies on the effects of probiotic bacteria on the immune system in animals have shown that there are a wide range of possible interactions and outcomes to take into account [19]. When pathogens infect cells or the microflora, probiotics can reduce inflammation by inhibiting certain signaling pathways, such as MAP kinase and NF-kappa beta, which are involved in the activation of the immune response. Many pro- and anti-inflammatory cytokines' expression has been hypothesized as a potential mechanism of action. A chicken's knowledge of this topic is limited when compared to that of

other animals. Probiotics help the immune system by increasing levels of IgA in the lumen, the number of cells that produce IgA, IgM, and IgG, and the number of T cells in the cecal tonsils [20]. Oral administration of probiotics increases the production of natural antibodies in the stomach and bloodstream against a wide range of antigens. Antigen-specific antibody response has been shown to be increased by both probiotic treatment and vaccination against Newcastle disease. Antibody response amplification may be one effect of probiotic supplementation on heterophils in addition to an increase in the oxidative burst and degranulation of these organisms. However, feeding *Lactobacillus sporogenes* increased immunity against "Ranikhet" disease in broilers when fed at 100 to 150 mg/kg diet for 28 days after vaccination had no effect on carcass characteristics such as dressing percentage or weight of liver, heart gizzard, giblet, and abdominal fat [22].

Much remains to be learned about how these organisms interact with and influence their hosts, as well as the factors that influence their efficacy. We hypothesize that the significance of our findings may be affected by the antigen used to measure the immune stimulatory responses to probiotics [21]. It has been found that the same strain of bacteria can have varying effects on birds' digestive systems and immune systems depending on their genetics and age, which suggests that different types of birds (layers vs. broilers) may require different dosages of probiotic supplements at different times during the year. For both humoral and cellular immune responses, lactobacilli have the potential to be a useful supplement, but they must be carefully chosen and administered. An obvious and convincing effect on cytokine and oocyst formation was seen in infected broilers that had been given a commercial Lactobacillus-based probiotic supplement. By combining *L. casei* and dextran into an oral immunoadjuvant for birds to protect them from infectious diseases, researchers say they may have found the basis for a vaccine in the future [24].

10. Probiotics as a growth institution

The use of growth promoters, such as probiotics, in livestock (particularly pigs and cattle) has been proven to boost growth, feed conversion efficiency, and immunological responses [11]. Many studies on broiler chicken production efficiency have focused on the use of probiotics. To enhance broiler hens' health, live and inactivated probiotics are both effective. There have been recent attempts to create a multispecies probiotic fluid for poultry, using *Lactobacillus* species that were isolated from the digestive system of chickens. It has been observed that *Lactobacillus* strains may boost the immune systems of both chicken breeds [38].

10.1. Lactobacilli

Catalase-inhibitors are not required to prevent the growth of these lactobacilli. There are a number of probiotics that have been employed, including *Lactobacillus casei*, *L. zeae*, *L. paracasei*, and *L. rhamnosus*. As the population of unpleasant stomach bacteria grows, the number of undesired microflora decreases [37]. Lactic acid bacteria may be found in milk and meat products, as well as in sewage, people, plants, and animals (LAB). There are three species here: *L. johnsonii*, *L. aviarius* (from chicken faeces), and *L. gallinarum* (from chicken faces). *L. casei* can withstand temperatures of up to 72°C, making it a suitable culinary ingredient. Probiotic feed might benefit from additional research into LAB and poultry husbandry settings. Compared to the control, supplementation with four strains of *L. bulgaricus* considerably increased chick growth and feed conversion [25]. When fed jointly, *L. acidophilus* and *L. bulgaricus* improved broiler chick performance. Cultures of *L. bulgaricus* and *L. acidophilus* were given to groups of chicks with low and high protein content and grown on skimmed milk at 37°C for 48 hours; *L. bulgaricus* was shown to provide a stronger growth response than *L. acidophilus,* while *L. acidophilus* was found to be less effective. After 40 days of feeding, either a single strain of *Lactobacillus acidophilus* or a combination of 12 strains of *Lactobacillus* may significantly boost broiler weight growth [26].

Regardless of the commercial probiotic utilized in the trial, researchers discovered that blood glucose levels were higher in the probiotic supplemented groups than in the control group. The study group's blood protein levels were unaffected by probiotic administration. The probiotic diet had no effect on the tibiotarsi weight/length index, the robustness index, the diaphysis diameter, the modulus of elasticity, or the yield stress. The medial and lateral walls of the tibiotarsi developed thicker and broader on the probiotic diet than on the control diet. Taking probiotics may increase bone mineralization and bone growth by increasing tibia wall thickness, the tibiotarsal index percent ash, and P content in the bone [27].

10.2. *Aspergillus oryzae*

Commercially available fermented products produced from *the Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* were shown to have no effect on egg output, egg weight, or egg shell weight, save for the generation of big eggs. While the digestibility of protein and fat in laying hens increased, their nutritional digestibility did not seem to be significantly impacted. According to another study, laying hens that received probiotic therapy performed better when fed diets that varied in methionine content,

according to the results [28]. It was shown that *A. oryzae* as a supplement to laying chicken feed had positive impacts on hen gut microbiota, pH and moisture levels in the hens' intestines, egg quality, and macronutrient metabolism. *A. oryzae* was shown to have reduced the moisture content of laying hens' droppings while increasing the metabolic stability of gross energy and dry matter. Using *A. oryzae* in broiler chick diets increased performance metrics including body weight growth and feed intake, but had little influence on feed:gain ratios, according to previous studies Growth performance in broiler chickens may be linked to *A. oryzae*, which has also been shown to reduce ammonia gas production and lower blood cholesterol in broilers, as well as having a good effect on their microflora populations [29].

10.3. Yeast

Yeast culture has just recently been discovered to be effective as a probiotic for chicks. The effects of the yeast *S. cerevisiae* and subtherapeutic antibiotics on broiler chicks were investigated, and it was discovered that they reduced small intestine weight while enhancing growth and carcass weight in the birds [30]. The inclusion of yeast in broiler feed improves performance as a result of changes in gastrointestinal flora and increased nutrient utilization on both a quantitative and qualitative basis. When compared to a group feed basal diet, body weight gains are 4.25 % larger and feed conversion ratios are 2.8% lower, despite the fact that feed intake has increased by just a tiny amount in this study. Broiler chick meals including the complete yeast or *S. cerevisiae* cell wall showed reduced oxidation and better growth, meat tenderness, and villus production. Therefore, supplementing broiler diets with yeast may serve as a natural alternative to antibiotics in some circumstances [31]. Hens with mycotoxicosis (ochratoxin) had their hematological and biochemical profiles improved when *S. boulardii* was added to their diet, and this was confirmed to be true. When birds were given yeast culture, they produced more antibodies in response to SRBC and CBH responses than when they were fed the baseline diet, indicating that yeast culture increases the birds' immune response. As shown by the fact that all treatment groups gained the same amount of weight, yeast culture had no negative effect on the weight increase of multiple critical organs [33]. A variety of intestinal diseases were successfully treated in animals using commercially available *S. cerevisiae* strains, and some of the *S. cerevisiae* strains were found to adhere to potentially harmful bacteria such as *E. coli* and *Salmonella* species. Probiotics made from the bacteria *Saccharomyces* have been shown to improve humoral immunity in birds, increasing their resistance to coccidiosis when administered at a concentration more than or equivalent to 0.1 percent in the broiler diet. The probiotic qualities of *S. cerevisiae* and *S. boulardii* (ATCC) yeast strains were shown to be significantly resistant to pH 1.5, with a survival rate of 85.3–92.1 percent, indicating that yeast is an excellent probiotic [38].

11. Salient benefits and recommendations for probiotic use

Probiotics may help maintain birds' microbiota healthy and balanced, which can improve both their health and productivity if they are utilized on a regular basis in their diet. It is strongly suggested that probiotics be used in the care of new-born chicks, in stressful situations, and as an alternative to antibiotic growth boosters in broiler chicken. Early chick mortality and gastro-intestinal abnormalities such scouring, lack of appetite, and inappropriate digestion may be prevented when pathogenic microorganisms, particularly enteric pathogens, are eliminated. Chicken breeders may see an improvement in their productivity and avoid major losses as a result of this [34].

Probiotics increase microbial balance, nutrient absorption, digestion, feed conversion, growth rate, and efficiency. Chick mortality is also reduced by preventing the formation of dangerous microorganisms and, in particular, digestive issues induced by bacterial invasions. Egg production and quality, fertility and hatchability of eggs, egg albumen quality, and yolk cholesterol content are all improved by these products. There are several advantages to birds' b-vitamins, such as improved bone structure and reduced contamination, enhanced medication and vaccine effects, and a healthy digestive tract following antibiotic treatment [35]. Although the unlawful and widespread use of antibiotics at subtherapeutic doses may lead to residues in chicken products and the development of drug-resistant bacteria, this does not rule out the use of probiotics to prevent the effects of antibiotics on bacteria. Apart from that, antibiotics used to treat illness impair the host's general microflora, causing bacterial dysbiosis and difficult-to-treat future illnesses in addition to killing harmful bacteria. In addition to preventing diarrhoea, using probiotics with antibiotics helps to maintain the necessary gut microbiota balance without interfering with the medication's effectiveness. It has been advised that the United States consider regulating the use of antibiotics in animal husbandry since drugs have failed to heal human ailments in the past [36]. The European Union has ban the use of antibiotics in animal feeds. Providing probiotics on a regular basis is suggested to keep birds healthy since they are constantly disturbed and under a high level of infectious strain when grown intensively. The greatest outcomes will be obtained if

the supplement is given to the bird before the infection challenge. In stressful situations, the dosage should be increased. After antibiotic treatment, probiotics must be provided to maintain a healthy microbiota population and achieve a well-balanced outcome. Powders and liquids containing probiotics are widely available as feed additives [37]. A single strain of yeast, a single strain of bacteria, or a combination of microorganisms may be utilized to treat numerous illnesses in the commercial probiotic market. As a rule of thumb, a multi-strain probiotic should contain at least 10^7 to 10^9 or even higher guaranteed levels of beneficial microorganisms such as *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei, L. bulgaricus*, *Enterococcus fecium, Aspergillus oryzae, Saccharomyces cerevisiae,* etc., per kilogram of the product [1]. According to industry guidelines, chicks/layers/broilers get 0.5–1 kg /tone of feed, whereas breeders receive 1 kg/tone of feed. Feed or water should be supplemented with probiotics, and they should also be provided as a top dressing or as a top dressing for pelleted feed.

12. Conclusions

Probiotics may be given to chicken feed to help lower the incidence of gastrointestinal disorders in the flock. In terms of practical application, it is critical to understand how probiotics might affect the balance of bacteria in the avian gut, promote growth, and raise immunity in the bird population. It is vital to limit the incidence of sickness in poultry via natural means in order to create a strong immune system that will assist in the improvement of chicken production levels. Instead of using antibiotics as a feed additive or growth stimulant, it is better to utilize probiotics since they have no known negative effects and are less expensive. Furthermore, probiotics do not pose any health risks to humans since they do not leave residues in eggs or meat as antibiotics do. Probiotics for birds assist to increase their natural defenses against a broad variety of diseases by increasing the number of bacteria in their stomach. It is believed by a lot of individuals that these "desirable microorganisms" may assist in keeping hens healthy, productive, and happy in poultry farms. Because antibiotic residues in chicken products and the establishment of drug-resistant bacterial strains have the potential to have serious consequences for human health, antibiotic growth boosters are expected to be phased out in the not-too-distant future. Probiotic research is becoming more important as a result of this. The development of new information and experience in understanding probiotics, their unique mechanism of action, and their widespread use in chicken health and productivity in the next years may pave the way for additional advancements in poultry health and productivity.

References

1. Adam K., Brulisauer F.: The application of food safety interventions in primary production of beef and lamb: a review. *Int. J. Food Microbiol*. **141**, 43–52 (2010)
2. Agawane S.B., Lonkar P.S.: Effect of probiotic containing *Saccharomyces boulardii* on experimental ochratoxicosis in broilers: hematobiochemical studies. *J. Vet. Sci.* **5**, 359–367 (2004)
3. Ahmad F.E.: Genetically modified probiotics in foods. *Trends Biotechnol*. **21**, 491–497 (2003)
4. Alkhalf A., Alhaj M., Al-Homidan I.: Influence of probiotic supplementation on immune response of broiler chicks. *Egypt. Poult. Sci*. **30**, 271–280 (2010)
5. Anandakumar K., Lakshminarayan N.G.: Probiotics: Importance in poultry production. *Poult. Advisor*. April Issue, 7–9 (1997)
6. Anonymous: Focus on poultry industry. A Times Business Associate Special Report. *Cited Times of India*, March (2001)
7. Arun K.P., Rao R., Savarm V., Raju Mantena V.L.N., Sharma Sita R.: Dietary supplementation of *Lactobacillus sporogenes* on performance and serum biochemico-lipid profile of broiler chickens. *J. Poult. Sci*. **43**, 235–240 (2006)
8. Awad W.A., Ghareeb K., Abdel-Raheem S., Böhm J.: Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poult. Sci.* **88**, 49–56 (2009)
9. Bal A.P., Ouyang Q., Zhang W., Wang C.H., Li S.F.: Probiotics inhibit TNF-a-inducedinterlukin-8 secretion of HT29 cells. *World J. Gastroentrol*., **10**, 455–457 (2004)
10. Balevi T., Uçan U.S., Cokun B., Kurtoglu V., Cetingul I.S.: Effect of dietary probiotic on performance and humoral immune response in layer hens. *Br. Poult. S*ci. **42**, 456–461 (2001)
11. Bansal G.R., Singh V.P., Sachan N.: Effect of probiotic supplementation on the performance of broilers. *Asian J. Anim. Sci*. **5**, 277–284 (2011)
12. Bar-Shira E., Friedman A.: Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. *Dev. Comp. Immunol*. **30**, 930–941 (2006)
13. Bengmark S.: Ecological control of the gastrointestinal tract – the role of probiotic flora. *Gut,* **42**, 2–7 (1998)
14. Bengmark S.: Gut microbial ecology in critical illness: is there a role for prebiotics, probiotics, and synbiotics? *Curr. Opin. Crit. Care*, **8**, 145–151 (2002)
15. Bhatt R.S., Katoch B.B., Dogra K.K., Gupta R., Sharma K.S., Sharma C.R.: Effect of dietary supplementation of different strains of (*Saccharomyces cerevisiae*) on the biological performance of broilers. *Indian J. Anim. Nutri.* **12**, 61–65 (1995)
16. Boirivant M., Strober W.: The mechanism of action of probiotics: antimicrobial effects of probiotics. *Curr. Opin. Gastroenterol*. **23**, 679– 692 (2007)
17. Bomba A., Nemcova R.S., Gancarcýkova S., Herich R., Guba P., Mudronova D.: Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins, fructooligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *Br. J. Nutr*. **88**, 95–99 (2002)
18. Bouzaine T., Dauphin R.D., Thonart P., Urdaci M.C., Hamdi M.: Adherence and colonization properties of *Lactobacillus rhamnosus* TB1, a broiler chicken isolate. *Lettersin Appl. Microbiol*. **40**, 391–396 (2005)
19. Brashears M.M., Galyean M.L., Loneragan G.H., Mann J.E., Killinger-Mann K.: Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feed lot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *J. Food Prot*. **66**, 748–754 (2003)
20. Cavit A.: Effect of dietary probiotic supplementation on growth performance in the chicken *Turkish. J. Vet. Anim. Sci.* **28**, 887–891 (2003)

21. Chichlowski M., Croom J., McBride B.W., Havenstein G.B., Koci M.D.: Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: A brief review of current knowledge. *Int. J. Poult. Sci.* **6**, 694–704 (2007)
22. Chichlowski M., Croom J., McBride B.W, Daniel L., Davis G., Koci M.D.: Direct-fed Microbial primalac and salinomycin modulate whole-body and intestinal oxygen consumption and intestinal mucosal cytokine production in the broiler chick. *Poult. Sci.* **86**, 1100–1106 (2007)
23. Chichlowski M., Croom J., Edens F.W., McBride B.W., Qiu R., Chiang C.C., Daniel L.R., Havenstein G.B., Koci M.D.: Microarchitecture and spatial relationship between bacteria and ileal, cecal and colonic, primalac and salinomycin. *Poult. Sci.* **86**, 1121–1132 (2007)
24. Collier C.T., Carroll J.A., Ballou M.A., Starkey J.D., Sparks J.C.: Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae boulardii* reduces mortality associated with immune and cortisol responses to *Escherichia coli* endotoxin in pigs. *J. Anim. Sci.* **89**, 52–58 (2011)
25. Coudeyras S., Marchandin H., Fajon C., Forestier C.: Taxonomic and strain-specific identification of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* group. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2679–2689 (2008)
26. Cummings J.H., Macfarlane G.T.: Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *J. Parenteral and Enteral. Nutr.* **21**, 357–365 (1997)
27. Czerucka D., Piche T., Rampal P.: Review article: yeast as probiotics — *Saccharomyces boulardii. Aliment Pharmacol. Ther.* **26**, 767–768 (2007)
28. Dalloul R.A, Lillehoj H.S., Tamim N.M., Shellem T.A., Doerr J.A.: Induction of local protective immunity to *Eimeria acervulina* by a *Lactobacillus*- based probiotic. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **28**, 351–361 (2005)
29. Das H.K., Medhi A.K., Islam M.: Effect of probiotics on certain blood parameter and carcass characteristics of broiler chicken. *Indian J. Poult. Sci.* **40**, 83–86 (2005)
30. Dhama K., Mahendran M., Tomar S.: Probiotics and prebiotics: A safer way towards improving health and productivity in poultry. *Poultry World*, **2**, 28–32 (2007)
31. Dhama K., Mahendran M., Simmi T., Chauhan R.S.: Beneficial effects of probiotics and prebiotics in livestock and poultry: the current perspectives. *Intas Polivet*, **9**, 1–13 (2008)
32. Dhama K., Singh S.D.: Probiotics improving poultry health and production: an overview. *Poultry Punch*, **26**, 41 (2010)
33. Dicks L.M.T., du Plessis E.M., Dellaglio F., Lauer E.: Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *Casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC15820 as *Lactobacillus zeaenom.* rev., designation of ATCC334 astheneotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 337–340 (1996)
34. Duggan C., Gannon J., Walker W.A.: Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am J. Clin. Nutr.* **75**, 789–808 (2002)
35. Elam N.A., Gleghorn J.F., Rivera J.D., Galyean M.L., Defoor P.J., Brashears M.M., Younts-Dahl S.M.: Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* strain O157 shedding of finishing beef steers. *J. Anim. Sci.* **81**, 2686–2698 (2003)
36. Farnell M.B., Donoghue A.M., Solisdelos Santos F., Blore P.J., Hargis B.M., Tellez G., Donoghue D.J.: Upregulation of oxidative burst and degranulation in chicken heterophils stimulated with probiotic bacteria. *Poult. Sci.* **85**, 1900–1906 (2006)
37. Fathabad E.G., Eslamifar M.: Isolstion and application of one strain of *Lactobacillus paraplantarum* from tea leaves (*Camellia sinensis*). *Am. J. FoodTechnol.* **6**, 429–434 (2011)
38. Hajati H., Rezaei M.: The application of prebiotics in poultry production. *Inter. J. Poult. Sci.* **9**, 298–304 (2010)
39. Heczko U., Abe A., Finlay B.B.: Segmented filamentous bacteria prevent colonization of enteropathogenic *Escherichia coli* O103 in rabbits. *J. Infect. Dis.* **181**, 1027–1033 (2000)
40. Higgins S.E, Wolfenden A.D, Tellez G., Hargis B.M., Porter T.E.: Transcriptional profiling of cecal gene expression in probiotic- and *Salmonella*- challenged neonatal chicks. *Poult. Sci.* **90**, 901–913 (2011)
41. Huang M.K., Choi Y.J., Houde R., Lee J.W., Lee B., Zhao X.: Effects of Lactobacilli and anacidophilic fungus on the production performance and immune responses in broiler chickens. *Poult. Sci.* **83**, 788–795 (2004)
42. Isolauri E., Salminen S., Ouwehand A.C.: Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 299–313 (2004)
43. Jin L.Z., Ho Y.W., Abdullah N., Jalaludin S.: Probiotics in poultry: Modes of action. *World's Poult. Sci. J.* **53**, 351–368 (1997)
44. Kawakami S.I., Yamada T., Nakanishi N., Cai Y.: Feeding of lactic acid bacteria and yeast affects fecal flora of Holstein calves. *J. Anim. Vet. Adv.* **10**, 269–271 (2011)
45. Lilly D.M., Stillwell R.H.: Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*, **147**, 747–748 (1965)
46. Iyer C., Kosters A., Sethi G., Kunnumakkara A.B., Aggarwal B.B., Versalovic J.: Probiotic *Lactobacillus reuteri* promotes TNF-induced apoptosis in human myeloidleukemia-derived cells by modulation of NF-êB and MAPK signalling. *Cell Microbiol.* **10**, 1442–1452 (2008)
47. Metchnikoff E. (1908). Prologation of Life. G.P. Putman and Sons, New York Miles RD and Bootwala FM. (1991). National Food Ingredient Association, West Des Moines, Iowa, U.S.A., pp. 117–132.
48. Ng S.C., Hart A.L., Kamm M.A., Stagg A.J., Knight S.C.: Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 300–310 (2009)
49. Ravikumar S., Syed Ali M., Anandh P., Ajmalkhan M. and Dhinakaraj M.: Antibacterial activity of *Cymodoce aserrulata* root extract against chosen poultry pathogens. *Indian J. Sci. Technol.* **4**, 98–100 (2011)
50. Rowghani E., Arab M., Akbarian A.: Effects of probiotic and other feed additives on performance and immune response of broiler chicks. *Int. J. Poult. Sci.* **6**, 261–265 (2007)
51. Saadia M.H., Soliman N.K.: Effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) adding to dietson intestinal microflora and performance of hy-line layers hens. *J. Am. Sci.* **6**, 159–169 (2010)
52. Salarmoini M., Fooladi M.H.: Efficacy of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic to Improve broiler chicks performance. *J. Agr. Sci. Tech.* **13**, 165–172 (2011)
53. Simon O., Jadamus A., Vahjen W.: Probiotic feed additives-effectiveness and expected modes of action. *J. Anim. Feed. Sci.* **10**, 51–67 (2001)

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 3, 125–132
DOI: 10.2478/am-2022-011

COVID-19 TRANSMISSION, RISKS FACTORS AND DISEASE CHARACTERISTICS IN ASTHMATICS PATIENTS

Shatha A. Alduraywish*

[1] Department of Family and Community Medicine, College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia
[2] Prince Sattam Research Chair for Epidemiology and Public Health, College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

Received in May, accepted in July 2022

Abstract: **Background** – The World Health Organizations (WHO) scientific brief on the coronavirus 2019 (COVID-19) pandemic and asthma from 2021, states individuals with asthma to be at a higher risk of respiratory infections as recorded in the annual influenza season. However, existing data from the COVID-19 pandemic does not till date establish an association of the disease with asthma. The disease burden of COVID-19 among asthmatic patients has not been very evident. This paucity of information forms the main rationale of our literature review, which is focused on collecting scattered literature around transmission, risks, as well as disease characteristics of COVID-19 among asthmatics world over including Saudi Arabia. **Methodology** – This study report has been generated after detailed literature survey using keywords "asthma", "coronavirus", "COVID-19" and SARS-CoV-2 including quality high impact publications on relevant focus area through Google Scholar, Web of Science, and PubMed. Publication between year 2019 and 2021 were selected in specific to ensure the focus of the current literature review does not lose relevance in space of time. **Results** – Our literature review identified elderly to have been reported to have high susceptibility to COVID-19; the risk being exacerbated among those with comorbidities. Further, no specific directives on asthma being one of the risk factors was found to be reported, especially with the current disease management strategy for COVID-19. The severely diseased COVID-19 patients also have been reported to exhibit increase in multiple cytokines, which may increase airway inflammation and exacerbate asthma attacks. However, contrary literature reports indicate an increase in T cells to reduce the disease impact of COVID-19. **Conclusion** – There is paucity in significant evidence as of writing this review article to highlight exclusive negative impact of COVID-19 on asthmatics. Asthma patients however need to be recommended care pertaining to having their controller medication as new data continue to emerge on the clinic-pathological factors of the novel coronavirus.

1. Introduction. 2. History of the pandemic. 3. Prevalence of COVID-19. 4. COVID-19: Risk factors, manifestation, complications. 5. Methodology. 6. COVID-19 and respiratory disorders. 7. COVID-19 and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) disorders. 8. COVID-19 and asthma. 9. Discussion

Keywords: asthma, COVID-19, pandemic, review, Saudi Arabia

1. Introduction

Asthma is a chronic disease characterized airflow limitation and is one of the most common chronic diseases in Saudi Arabia, with the prevalence rate of 11.3% among physician-diagnosed respiratory disease [1]. The Saudi Thoracic Society initiated the Saudi Initiative for Asthma (SINA) in the year 2008 to ensure best practices in pulmonary and respiratory medicine arein use. The updated 2021 guidelines apart from integrating recommendation around new medication, and evidence-based treatment updates, also included the coronavirus disease 2019 (COVID-19) management guidelines wherein the recommendations were stratified as per different age groups; adults (> 18 years), adolescents (13–18 years), children (5–12 years and < 5years) [2]. The novel coronavirus pandemic of 2019 had global implications on healthcare management, although in Saudi Arabia, a similar challenge was posed by the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) when the first case was detected in September 2012, in a 60-year-old from Bisha, Saudi Arabia [3]. Though MERS (1139 cases, 431 deaths) and severe acute respiratory syndrome (SARS; 8273 cases, 775 deaths) pandemic occurred in the past in the year 2013 and 2003 respectively, the numbers being registered in the ongoing severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection has been much more and world continue to fight multiple waves of increasing severity till date. The COVID-19 pandemic

* Corresponding Author: Shatha A. Alduraywish MBBS, MSc, PhD, Department of Family and Community Medicine, College of Medicine, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia; phone: +966114679860; e-mail: salduraywish@ksu.edu.sa
© 2022 Alduraywish Shatha
This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Table I
Historical data on Coronavirus epidemiology and transmission [71, 72]

Coronavirus	Affected host	Intermediate host	Potential reservoir host	Disease	Cell receptor
SARS-CoV	Humans	Himalayan palm civet/raccoon	Bat	SARS	ACE2
MERS-CoV	Humans	Dromedary camels	Bat	MERS	DPP4 (Dipeptidyl peptidase 4)
SARS-CoV-2	Humans	NA (No report)	NA (No report)	COVID-19	ACE2

has affected over 46 countries internationally, as the virus continues to mutate, and new strains are being isolated from different parts of the world. The major challenge in COVID-19 management continues to be an asymptomatic transmission, wherein a China CDC study found 80.9% of the asymptomatic or mild pneumonia cases to have released large amounts of viruses in early infection stage. Further, epidemiological data indicate the disease spectrum of SARS-CoV-2 to be different from the previous SARS and MERS [4]. A summary of host and reservoir for SARS-CoV-2 with the information has been detailed in Table I.

2. History of the pandemic

The COVID-19 pandemic began in December 2019, when a series of cases resembling viral pneumonia were recorded from Wuhan in China. The health authorities issued an epidemiological alert on 31st December 2019 as 59 suspected cases with symptoms of fever, and dry cough were transferred to a designated hospital even as all the pneumonia of unknown origin were found to have a shared history of exposure to the Huanan seafood market. Further, of the 59 suspected cases, 41 were confirmed to be affected by the 2019-nCoV, latter called SARS-CoV-2 by testing the respiratory specimen by next-generation sequencing (NGS) and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Further, chest radiography of the confirmed cases revealed abnormalities in all, and 98% exhibited bilateral involvement. The chest-CT findings among non-ICU patients included bilateral ground-glass opacity and subsegmental areas of consolidation. Further, all patients had pneumonia. As on Jan 2020, 15% of the 41 confirmed cases died, as the time between hospital admission and development of acute respiratory distress syndrome (ARDS) was found to be as short as 2 days [5].

The origin of coronaviruses; both SARS and MERS have been linked to bats and transmitted to humans through market civets and dromedary camels, and whole genome sequencing analysis of a SARS-CoV-2 revealed presence of human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor which enable virus to infect and replicate inside human cells using the [6,7]. The findings around pathogenicity of coronavirus in humans became highlighted only after the SARS epidemic of 2002 and 2003 in China, followed by MERS which emerged in the Middle Eastern countries in 2012 [8, 3]. The need to study the present coronavirus involved in the COVID-19 pandemic arises as it becomes one of the notorious infectious diseases to have arrived in recent times, and the risk of such outbreaks in the future continues to remain high. The existing virologic, epidemiologic, data establishes that the SARS-CoV-2 would have evolved from a beta-coronavirus even as the warning issued by a group of Scientists studying coronaviruses in the year 2007 which was ignored earlier. The warning clearly read "The presence of a large reservoir of SARS-CoV-like viruses in horseshoe bats is a time bomb. The possibility of the re-emergence of SARS and other novel viruses should not be ignored" [9]. Global reservoirs of coronaviruses have been identified in the America, the Africa, the Middle East, and the South East Asia including China [10].

These highlight the need for understanding transmission and risks involved in SARS-CoV-2pandemic, to ensure minimal damage to human life, and effective control measures can be devised in place. Aggressive monitoring of the hotspots has also been recommended by scientists to predict and prevent viral emergence and limiting zoonotic interaction is also a key. The COVID-19 pandemic has posed a broad challenge to the scientific and medical community towards identifying symptoms, devising rapid diagnostic methods, follow-up, in addition to managing the rising medical crisis. Furthermore, since this virus affects the respiratory system individuals with pre-existing respiratory health conditions including chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma, were categorized as high-risk with possibility of severe disease consequences [11, 12].

3. Prevalence of COVID-19

Global burden of the SARS-CoV-2 continues rise with multiple nations suffering from burden of waves of infection burden apart from insurgence of multiple variants. This is closely followed by India with number of infected at 2,96,36,638 and 379,652 deaths indicating a death rate of 1.3%. However, there are regions which have reported less than a lakh case including China

Mainland (91,471), Afghanistan (93,765), Singapore (62,339), Australia (30,274) to name a few. In terms of death per million (DPM), the highest ranking is Peru at 5665 (9.4% deaths), followed by Hungary at 3107 (3.7% deaths). The United Kingdom and the USA also report DPM of over 1000 at 1875 (2.8% deaths), and 1850 (1.8% deaths), respectively. Developing nations however, recorded low DPM for COVID-19, with India at 273, Nepal at 287; while China has a record low DPM at 3. In terms of Middle East, Saudi Arabia records a DPM of 215 (1.6% deaths), and the United Arab Emirates (UAE) at 173 (0.3% deaths) [13].

In case of Saudi Arabia, the number of confirmed cases stands at 468,175 and deaths at 7,606 until December 2021. The government of Saudi Arabia implemented early protective measures from the standard recommendations of social distancing, use of personal-protective-equipment, and stay-at-home to cancellation of the international Haj 2021. The rapid action could also be attributed to the fact that viral epidemics have been a part of the Saudi history from the Spanish flu of 1919, H1N1, MERS and now COVID-19, with the first case being reported on March 2nd, 2020, from the Kingdom. The state is also providing free medical treatment to their citizens affected by COVID-19 in both public and private sector healthcare institutes [14].

4. COVID-19: Risk factors, manifestation, complications

Scientific evidence around epidemiology and transmission aspects of the SARS-CoV-2 have indicated old age, male gender, pre-existing comorbidities, including diabetes, hypertension, heart disease, obesity, chronic lung disease, immunodeficiency, as well as pregnancy, to be the possible risk factors for COVID-19 progression [15]. The early months of the pandemic only painted a critical picture of the affected with patients in intensive care, struggling to breathe an in need for artificial ventilation. However, transmission studies further identified the benign nature of the infection in many individuals indicating "asymptomatic" presence [16]. Studies have also found the viral load and transmission risk to be comparable between the asymptomatic and the severely symptomatic and the only diagnostic distinguishing to be achieved through longitudinal testing [17, 16]. 41.1% and 44.8% of asymptomatic transmission was noted in a study from Italy which reported results from the two-pilot time sampling involving 85.9%, and 71.5% of Vo municipality population. Further, the authors reported none of the asymptomatic to develop symptoms in the two--week sampling window [18].

Controversy around susceptibility of adolescents, and youth towards SARS-CoV-2 has been recorded, as old age has been a documented risk factor. Many studies have reported low susceptibility among adolescents and data analysis from the Department of Health website of the US (six states) experiencing surges found prevalence to be significantly higher among adolescents (10–19 years) and youth (15–24 years) ($p < 0.00001$) [19] than older aged people. Recent studies have also indicated susceptibility to COVID-19 to be independent of age according to mathematical modeling outcomes on data from Japan, Spain, and Italy; but disease severity and mortality to be age dependent [20].

Disease manifestation in severe cases have been noted to include signs of dyspnea, blood oxygen saturation of ≤ 93%, partial pressure of arterial oxygen to fraction of inspired oxygen ratio < 300 mmHg, respiratory frequency ≥ 30/min, within 24–48 hours of time span [21]. Studies have evaluated the occurrence of dysphagia in COVID-19 due to neuromuscular complications, prolonged bed rest, and endotracheal intubation [22]. Studies have reported one-third of the hospitalized patients to exhibit neurological symptoms including loss of taste and smell due to cranial nerve manifestation, with a frequency of 5.6%, and 5.1% respectively [23]. Hypernatremia has also been recorded as a manifestation of COVID-19 wherein studies records show development of first-time therapy-resistant hypernatremia (plasma sodium concentration ≥ 150 mmol per liter) among critically ill between age groups of 57–84 years in medical ventilation [24]. In terms of oral manifestation, dysgeusia has been recorded which includes ulcer, pustule, vesicle, depapillated tongue, plaque, pigmentation, hemorrhagic crust, necrosis, swelling, and spontaneous bleeding; with tongue involvement being 38%, the labial mucosa at 26%, and the palate at 22% respectively. Further, oral lesions have also been recorded to be symptomatic among 68% of the cases [25]. Gastrointestinal symptoms have also been recorded among patients at frequency between 16% to 33% and has been associated with severe disease stage [26]. Ocular presentations of COVID-19 have also been reported in a case series from China, 31.6% of hospitalized patients exhibited ocular symptoms including conjunctival hyperemia, chemosis, epiphora, and increased secretions [27]. Skin manifestations of COVID-19 have also been recorded which include pseudo-chilblains, rashes with macules and papules, urticaria, vesicular, and vaso-occlusive lesion [28]. Neurological manifestations recorded include myalgia, headache, hyposmia, altered sensorium, apart from certain uncommon ones like intracerebral hemorrhage, ischemic stroke, acute myelitis, and encephalo-myelitis [29].

Studies have also recorded multiple comorbidities to increase disease severity including arterial hypertension

Table II
Common reported symptoms of COVID-19

Study	Chen N. *et al.*, [58]	Huang C. *et al.*, [5]	Alsofayan Y.M. *et al.*, [68]	Shabrawishi M. *et al.*, [52]
Patient count	99	41	1519	150
Age (mean, year)	55.5	49	37	46.1
Fever	83%	98%	86%	49%
Cough	82%	76%	89%	49%
Shortness of breath	31%	55%	–	20%
Myalgia	11%	44%	29%	3%
Hemoptysis	–	5%	–	0.4%
Sputum production	–	28%	–	3%
Confusion	9%	–	–	–
Sore throat	5%	–	82%	16%
Rhinorrhea	4%	–	72%	6%
Chest pain	2%	–	–	–
Diarrhea	–	3%	14%	1%
Headache	–	8%	27%	3%

(OR = 2.01, 95% CI: 1.3–3.2), diabetes (RR = 2.96, 95% CI: 2.31–3.79), obesity (OR = 3.0, 95% CI: 1.22–7.38), asthma (OR: 1.39, 95% CI: 1.13–1.71), and COPD (OR = 1.36, 95% CI: 1.15–1.60) [30–34].

The most common symptoms of COVID-19 have been summarized in Table II.

5. Methodology

Literature search was done to include research, longitudinal, observational, and case reports pertaining to the novel coronavirus disease of 2019. The keywords used for the search included "COVID-19", "SARS-CoV-2", "pandemic", "asthma", "coronavirus", "respiratory disease", and search engines including PubMed, Google Scholar, Scopus, and the Web of Science was used to select publications between the years 2019 to 2021.

6. COVID-19 and respiratory disorders

The initial viral interaction in the nasal mucosa among humans occurs by binding of the spike (S) protein with the ACE2 receptor and enters principally via the upper airway epithelium., followed by cleavage of viral S protein by host TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2), which aids in viral entry [35]. In terms of respiratory distress, the most common COVID-19 presentations include acute respiratory failure, disorders of the airway, lung parenchymal, and pulmonary vascular region [36]. Studies have also suggested the shunt physiology to be accompanied with severe abnormalities in the ventilation-perfusion (V/Q) matching with disordered hypoxic vasoconstriction [37]. Further, radiographic comparison between Computerized Tomography scans of COVID-19 affected, and other viral pneumonia has shown peripheral distribution of opacities, ground-glass and fine reticular appearance with vascular thickening to be prominent in the former [38]. Further, the infected epithelial cells have been shown to express high levels of inflammatory cytokines including C-X-C motif chemokine 10 (CXCL-10), and interferons [39]. An enhanced Th2 immune response and the elaboration of cytokines contribute to the induction of allergy and asthma. Studies have found the infected alveolar epithelium cells to produce pro-inflammatory chemicals including interleukins (IL-6, IL-8, IL-29), and chemokines (CCL5, CXCL9, CXCL10, and CXCL11) [40]. Interferon-γ, a Th1 cytokine, acts in conjunction with Th2 (IL-4, IL-13, and IL-5) in maintaining chronic allergic inflammation. The mechanisms leading to an enhanced Th2 response are still controversial. Th2-dominated immune responses may result from immune suppression of T-regulatory cells as well as Th1 cells. Understanding early-life immune mechanisms responsible for atopic diseases, specifically how cytokines of T-regulatory cells act to balance the Th1 and Th2 immune response, continues to be a fruitful area of research. The incidence of deep vein thrombosis has also been recorded to be high among hospitalized cases with studies reporting a frequency of up to 20% among the intensive care unit admission [41]. Evidence also indicates risk of potential sequela to the COVID-19 respiratory problems including fibrotic lung disease, pulmonary vascular disease, chronic cough, and bronchiectasis [42]. Recommendations from the British Thoracic Society include chest radiography to be done

3 months' post hospital discharge of all COVID-19 patients and those with history of severe disease, persistent symptoms, and radiological abnormalities should be investigated further [43].

7. COVID-19 and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) disorders

Studies have also evaluated COVID-19 disease outcome by stratifying comorbidities and one such from China found COPD (HR = 2.681 (1.424–5.048) 95% CI), diabetes (HR = 1.59 (1.03–2.45) 95% CI), hypertension (HR = 1.58 (1.07–2.32) 95% CI) and malignancy (HR = 3.50 (1.60–7.64) 95% CI) to be the risk factors of reaching the composite end-points and comorbid COVID-19 patients were found to exhibit poor clinical outcomes [44]. Studies have also evaluated the impact of COPD and smoking on COVID-19 disease outcome, and found COPD to be an increased risk factor for poor outcome (OR = 5.01; 3.06–8.22; 95% CI), mortality (OR = 4.36; 1.45–13.10; 95% CI), severe COVID-19 disease (OR = 4.62; 2.49–8.56; 95% CI), and ICU admission (OR = 8.33; 1.27–54.56; 95% CI). Further, smoking was also found to significantly increase risk of severe COVID-19 (OR 1.65; 1.17–2.34; 95% CI) [45].

8. COVID-19 and asthma

The presence of asthma, a chronic airway disease has been increasing since the year 1950, and more than 300 million people worldwide have been reported to be affected: by both allergic and non-allergic causes. It is a heterogeneous disease characterized by persistent cough, wheezing, and dyspnea; affecting the lower respiratory tract [46, 47]. Further, the management of asthma includes long-term exposure to systemic corticosteroids which increases risk of other disease conditions including hypertension, diabetes, and impaired humoral immunity [48]. In studying the relation between asthma exacerbation in COVID-19, published reports till date are divided in the findings, which continues to be intriguing as *Coronaviridae* have been associated with asthma exacerbation in up to 27% of the adults [49]. Since virus commonly trigger asthma exacerbations, asthma became listed as a risk factor for COVID-19 morbidity, as the symptoms presented also included the common acute asthma inclusions like shortness of breath and dry cough. Further, recommendations indicate benefit from use of oral steroids for patients with asthma with weak response to bronchodilators, although the same is not recommended to treat COVID-19 lung disease due to risk of increased viral replication [50]. A study conducted on 150 COVID-19 patients indicated IL-6 an indicator of death. Significant difference in levels of white blood cell counts, platelets, albumin, total bilirubin, blood urea nitrogen, blood creatinine, myoglobin, cardiac troponin, C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6) was found between the deceased group and the survivors [51].

Reports from Saudi Arabia indicated the prevalence of asthma to be 2.9%, 0%, and 7.7%, among patients with mild, moderate, and severe COVID-19 [52]. In a Brazilian retrospective study including 51,770 COVID-19 cases, the prevalence of moderate to severe asthma was found to be 1.5%, while in a Spanish study, the prevalence was noted to be 3.7% among the fatal cases, and 5.5% among the discharged cases [53, 54].

Studies have also focused on documenting the clinical course of COVID-19 among asthma patients using big data analytics and artificial intelligence. One such analysis including 71182 patients with asthma, found the frequency of COVID-19 to be 1.41%, and much higher than the recorded 0.86% among the general population. Further, the cohort majorly included older adults (55 *vs* 42 years), and female gender (66% *vs* 59%), apart from smoking, hypertension, diabetes, and obesity. This study found increased risk of COVID-19 hospitalization among asthma patients to be linked with age and comorbidity-related factors. Further, use of inhaled corticosteroids (ICS) and biologics to have a protective impact against severe disease as low rate of hospitalization was noted among both, and specifically 0.23% for biologics [55]. Another clinical study involving 1526 COVID-19 patients, found 14% to be asthmatics, and wherein the condition (OR = 0.96; 0.77–1.19; 95% CI), and use of ICS (RR = 1.39; 0.90–2.15; 95% CI) did not increase the risk of hospitalization in an adjusted model [56]. Multiple reports from China including one by Zhang J.J. et al., [57] involving 140 patients, and Chen N. et al., [58] involving 99 cases, did not find asthma or allergic disease as a risk factor or pre-existing comorbidity in COVID-19. Few studies however, have reported finding the presence of comorbid asthma among hospitalized COVID-19 patients. These include one report from 106 patients from the Chest Diseases Department of Strasbourg University Hospital, wherein 23 patients were found to have asthma. Further, no significant difference between patients with and without asthma was noted with respect to need of maximal oxygen flow, length of hospital stays, need for non-invasive ventilation or the intensive care transfer; and SARS-CoV-2 did not induce severe asthma exacerbation [59]. Another UK study involving 16749 hospitalized patients found asthma to be the fourth-common comorbidity at 14%, after chronic cardiac disease (29%), uncomplicated diabetes (19%), and non-asthmatic chronic pulmonary disease (19%) [60]. The inconclusive association between COVID-19 and asthma has

been reported in observational studies from different parts of the world including multiple reports from China, where the pandemic began. Few studies which have reported increased asthma prevalence among COVID-19 patients indicate underreporting, and under diagnosis to be the cause for inconclusive evidence. The data reported from the Center for Disease Control and Prevention found 27.3% of COVID-19 positive hospitalized patients to have listed asthma as a comorbidity from several hospitals across US [61].

Several Study reports also indicate asthma to be protective in COVID-19, wherein studies have found eosinophils to be reduced in SARS-CoV-2 infected peripheral blood, and it is speculated that increased eosinophils in the airway of asthmatics might be protective against the exaggerated inflammatory response in COVID-19 [57&62]. Another study involving 951 COVID-19 asthmatics found pre-existing eosinophilia (AEC ≥ 150 cells/μL) to be protective from COVID-19-associated admission, and development of eosinophilia during hospitalization to be associated with decreased mortality (mortality rate 9.6% vs 25.8%; OR = 0.006, 95% CI: 0.0001–0.64) [63]. Other protective factors against SARS-CoV-2 among patients with allergic asthma has been reported to be the asthma treatment, overproduction of mucus, and the T2 immune response [64–66]. Besides, the respiratory epithelial cells of asthma patients have been found to have reduced expression for *ACE2* receptors which may contribute to protection from SARS-CoV-2 infection [64 & 67]. A study from Saudi Arabia involving 1519 confirmed cases of COVID-19 found 71.6% of the cases to be hospitalized, 4.7% to be admitted to intensive care and 9.3% of people with COVID-19 did not show symptoms. The study did not specifically clarify the symptoms associated with them. The study did not add details about the development and severity of cases [68].

In terms of management, it has been noted that there is a concern in the medical community on the use of nebulizers in hospitals to treat patients with asthma, especially those with COVID-19, as it can cause possible transfer of contaminated droplets to the uninfected and the medical staff [69]. Further, there is a consensus among the medical community to treat asthma by replacing nebulizers with metered-dose inhalers (MDIs) without negatively affecting patient outcome and also avoid COVID-19 transmission [70].

9. Discussion

The literature review and the citations in this review highlights that asthmatic were exposed to SARS-CoV-2, but there was no serious impact on disease severity or outcome of the disease through appropriate medical intervention. It has been reported among majority with uncontrolled asthma and other chronic disease when exposed to SARS-CoV-2, there will likely be worsening of COVID-19 severity and the need for intensive care may arise.

However, this review is limited with respect to the number of available literatures studied to generate this review article. There are information on COVID-19 and asthma however conflicting reports are abundant. Further investigations and examination for various laboratory signs and clarification on *ACE2* and *TMPRSS2* expression and their involvement in COVID-19 and asthma is needed. This review is one of the few comprehensive literature studies on the impact of SARS-CoV-2 infection on patients with asthma.

References

1. Al Ghobain M., Algazlan S.S., Oreibi T.M.: Asthma prevalence among adults in Saudi Arabia. *Saudi Med J*. **39**, 179–184 (2018)
2. Al-Moamary M.S., Al-Hajjaj M.S., et al.: The Saudi initiative for asthma – 2021 update: Guidelines for the diagnosis and management of asthma in adults and children. *Ann Thorac Med*. **16**, 4–56 (2021)
3. Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M.: Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. **367**, 18–1820 (2012)
4. Wang Y., Wang Y., Chen Y., Qin Q.: Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J Med Virol*. **92**, 568–576 (2020)
5. Huang C., Cao B.: Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, **395**, 497–506 (2020)
6. Shang J., Wan Y., Luo C., Ye G., Geng Q., Auerbach A., Li F.: Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 26, **117**, 11727–11734 (2020)
7. Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H.: Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **23**, 3–20 (2022)
8. Zhong N.S., Guan Y. et al.: Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February 2003. *Lancet*, **362**, 1353–1358 (2003)
9. Bhat E.A., Sajjad N., Ali A., Aldakeel F.M., Mateen A., Alqahtani M.S., Syed, R.: SARS-CoV-2: insight in genome structure, pathogenesis and viral receptor binding analysis-an updated review. *International immunopharmacology*, **95**, p. 107493 (2021)
10. Morens D.M., Breman J.G., Calisher C.H., Doherty P.C, Hahn B.H., Keusch G.T., Kramer L.D., LeDuc J.W., Monath T.P., Taubenberger J.K.: The origin of COVID-19 and why it matters. *Am J Trop Med Hyg*. **103**, 955–959 (2020)
11. Lee S.C., Son K.J., Han C.H., Jung J.Y., Park S.C.: Impact of comorbid asthma on severity of coronavirus disease (COVID-19). *Nat Sci Rep*. **10**, 21805 (2020)
12. Lee S.C., Son K.J, Han C.H., Park S.C., Jung J.Y.: Impact of COPD on COVID-19 prognosis: A nationwide population--based study in South Korea. *Nat Sci Rep*. **11**, 3735 (2021)
13. COVID-19 Stats – Realtime coronavirus statistics with charts (epidemic-stats.com) Accessed on: 16th June 2021

14. Meo S.A.: COVID-19 pandemic: Saudi Arabia's role at national and international levels. *J Diabetes Sci Technol*. **14**, 758–759 (2020)
15. Gao Y., Akdis C.A. et al.: Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: a review. *Allergy*, **76**, 428–455 (2021)
16. Oran D.P., Topol E.J.: The proportion of SARS-CoV-2 infections that are asymptomatic: A systematic review. *Ann Intern Med*. **174**, 655–662 (2021)
17. Kimball A., Jernigan J.A. *et al*.: Public Health-Seattle & King County; CDC COVID-19 investigation team. Asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections in residents of a ong-term care skilled nursing facility – King County, Washington, March 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. **69**, 377 381 (2020)
18. Lavezzo E., Crisanti A. et al.: Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo. *Nature*, **584**, 425–429 (2020)
19. Rumain B., Schneiderman M., Geliebter A.: Prevalence of COVID-19 in adolescents and youth compared with older adults in states experiencing surges. *PLoS ONE*, **16**, e0242587 (2021)
20. Omori R., Matsuyama R., Nakata Y.: The age distribution of mortality from novel coronavirus disease (COVID-19) suggests no large difference of susceptibility by age. *Nat Sci Rep*. **10**, 16642 (2020)
21. Wu Z., McGoogan J.M.: Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72314 cases from the Chinese center for disease control and prevention. *JAMA*, **323**, 1239–1242 (2020)
22. Aoyagi Y., Inamoto Y., Shibata S., Kagaya H., Otaka Y., Saitoh E.: Clinical manifestation, evaluation, and rehabilitative strategy of dysphagia associated with COVID-19. *Am J Phys Med Rehabil*. **100**, 424–431 (2021)
23. Mao L., Hu B. et al.: Neurological manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. JAMA Neurol. 77, 683–690 (2021).
24. Zimmer M.A., Zink A.K., Weiber C.W., Vogt U., Michelsen A., Priebe H.J., Mols G.: Hypernatremia – A manifestation of COVID-19: A case series. *A A Pract*. **14(9)**, e01295 (2020)
25. Iranmanesh B., Khalili M., Amiri R., Zartab H., Aflatoonian M.: Oral manifestations of COVID-19 disease: A review article. *Dermatol Ther*. **34**, e14578 (2021)
26. Yildirim A.C., Ceviker S.A., Zeren S., Ekici M.F., Yaylak F., Algin M.C., Özlem A.R.I.K.: COVID-19 and related gastrointestinal symptoms: An observational study. *Marmara Medical Journal*, **35(2)**, pp. 244–248 (2022)
27. Wu P., Duan F., Luo C., Liu Q., Qu X., Liang L., Wu K.: Characteristics of ocular findings of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Hubei Province, China. *JAMA Ophthalmol*. **138**, 575–578 (2020)
28. Tan S.W., Tam Y.C., Oh C.C.: Skin manifestations of COVID-19: A worldwide review. *JAAD Int*. **2**, 119–133 (2021)
29. Nepal G., Rehrig J.H., Shrestha G.S., Shing Y.K., Yadav J.K., Ojha R., Pokhrel G., Tu Z.L., Huang D.Y.: Neurological manifestations of COVID-19: a systematic review. *Crit Care*, **24**, 421 (2020)
30. Li X., Zhao J. *et al*.: Risk factors for severity and mortality in adults COVID-19 inpatients in Wuhan. *J Allergy Clin Immunol*. **146**, 110–118 (2020)
31. Guo L., Shi Z., Zhang Y., Wang C., Moreira N.C.D.V., Zuo H., Hussain A.: Comorbid diabetes and the risk of disease severity or death among 8807 COVID-19 patients in China: A meta-analysis. *Diab Res Clin Pract*. **166,** 108346 (2020)
32. Gao F., Zheng K.I., Wang X.B., Sun Q.F., Pan K.H., Wang T.Y., Chen Y.P., Targher G., Byrne C.D., George J., Zheng M.H.: Obesity is a risk factor for greater COVID-19 severity. *Diabetes Care*, **43**, e72–e74 (2020)
33. Zhu Z., Hasegawa K., Ma B., Fujiogi M., Camargo Jr C.A., Liang L.: Association of asthma and its genetic predisposition with the risk of severe COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*. **146(2)**, 327–329 (2020)
34. Attaway A.A., Zein J., Hatipoglu U.S.: SARS-CoV-2 infection in the COPD population is associated with increased healthcare utilization: An analysis of Cleveland clinic's COVID-19 registry. *EClinicalMedicine*, **26**, 100515 (2020)
35. Hoffmann M., Pohlmann S. et al.: SARS-CoV-2 entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, **181**, 271–280 (2020)
36. Brosnahan S.B., Jonkman A.H., Kugler M.C., Munger J.S., Kaufman D.A.: COVID-19 and respiratory system disorders. Current knowledge, future clinical and translational research questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **40**, 2586–2597 (2020)
37. Gattinoni L., Chiumello D., Caironi P., Busana M., Romitti F., Brazzi L., Camporota L.: COVID-19 pneumonia: different respiratory treatments for different phenotypes? *Intensive Care Med*. **46**, 1099–1102 (2020)
38. Bai H.X., Liao W.H. et al.: Artificial intelligence augmentation of radiologist performance in distinguishing COVID-19 from pneumonia of other origin at chest CT. *Radiology*, **296**, E156 E165 (2020)
39. Tang N.L., Chan P.K., Wong C.K., To K.F., Wu A.K., Sung Y.M., Hui D.S., Sung J.J., Lam C.W.: Early enhanced expression of interferon-inducible protein-10 (CXCL-10) and other chemokines predicts adverse outcome in severe acute respiratory syndrome. *Clin Chem*. **51**, 2333–2340 (2005)
40. Wang J., Nikrad M.P., Phang T., Gao B., Alford T., Ito Y., Edeen K., Travanty E.A., Kosmider B., Hartshorn K., Mason R.J.: Innate immune response to influenza A virus in differentiated human alveolar. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **45(3)**, pp.582–591 (2011)
41. Middeldorp S., Coppens M., van Haaps T.F., Foppen M., Vlaar A.P., Muller M.C.A., Bouman C.C.S., Beenen L.F.M., Kootte R.S., Heijmans J., Smits L.P., Bonta P.I., van Es N.: Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients with COVID-19. *J Thromb Haemost*. **18**, 1995–2002 (2020)
42. Fraser E.: Long term respiratory complications of covid-19. *BMJ,* **370**, m3001 (2020)
43. British Thoracic Society.: Guidance on respiratory follow up of patients with a clinico-radiological diagnosis of covid-19 pneumonia. 2020. www.brit-thoracic.org.uk
44. Guan W.J, He J.X. et al.: China Medical Treatment Expert Group for COVID-19. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. *Eur Respir J*. **55**, 2000547(2020)
45. Pranata R., Soeroto A.Y., Huang I., Lim M.A., Santoso P., Permana H., Lukito A.A.: Effect of chronic obstructive pulmonary disease and smoking on the outcome of COVID-19. *Int J Tuberc Lung Dis*. **24**, 838–843 (2020)
46. Lofus P.A., and Wise S.K.: Epidemiology of asthma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. **24**, 245–249(2016)
47. McCracken J.L., Veeranki S.P., Ameredes B.T., Calhoun W.J.: Diagnosis and management of asthma in adults: A review. *JAMA*, **318**, 279–290(2017)
48. Gaga M., and Zervas E.: Oral steroids in asthma: a double-edged sword. *Eur Respir J*. **54**, 1902034 (2019)
49. Nicholson K.G., Kent J., Ireland D.C.: Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ*, **307**, 982–986 (1993)
50. Abrams E.M., Jong G.W., Yang C.L.: Asthma and COVID-19. *CMAJ, 192*, E551 (2020)

51. Ruan Q., Yang K., Wang W., Jiang L., Song J.: Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 2020; **46**, 846–848 (2020)
52. Shabrawishi M., Alwafi H. et al. Clinical, radiological, and therapeutic characteristics of patients with COVID-19 in Saudi Arabia. *PLoS One*, **15,** e 0237130 (2020)
53. Rezende L.F.M., Thome B., Schveitzer M.C., Souza-, Junior P.B de, Szwarcwald C.L.: Adults at high-risk of severe coronavirus disease-2019 (Covid-19) in Brazil. *Revista De Saúde Pública*, **54**, 50 (2020).
54. Borobia A.M., Arribas J.R. et al.: On behalf of the Covid Hulp Working Group. A cohort of patients with COVID-19 in a major teaching hospital in Europe. *J Clin Med*. **9**, 1733 (2020)
55. Izquierdo J.L., Almonacid C., Gonzalez Y., Rio-Bermudez C.D., Ancochea J., Cardenas R., Lumbreras S., Soriano J.B.: The impact of covid-19 on patients with asthma. *Eur Respir J*. **57**, 2003142 2020)
56. Chhiba K.D., Patel G.B., Vu T.H.T., Chen M.M., Guo A., Kudlaty E., Mai Q., Yeh C., Muhammad L.N., Harris K.E., Bochner B.S., Grammer L.C., Greenberger P.A., Kalhan R., Kuang F.L., Saltoun C.A., Schleimer R.P., Stevens W.W., Peters A.T.: Prevalence and characterization of asthma in hospitalized and nonhospitalized patients with COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*. **146**, 307–314(2020)
57. Zhang J.J., Dong X., Cao Y.Y., Yuan Y.D., Yang Y.B., Yan Y.Q., Akdis C.A., Gao Y.D.: Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*, **75**, 1730–1741 (2020)
58. Chen N., Zhang L. et al.: Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*, **395**, 507–513 (2020).
59. Grandbastien M., de Blay F. et al.: SARS-CoV-2 pneumonia in hospitalized asthmatic patients did not induce severe exacerbation. *J Allergy Clin Immunol Pract*. **8**, 2600–2607(2020)
60. Docherty A.B., Semple M.G. et al.: Features of 16,749 hospitalized UK patients with COVID-19 using the ISARIC WHO clinical characterization protocol. *BMJ,* 2020 (2020).
61. CDC COVID-19 Response Team.: Preliminary estimates of the prevalence of selected underlying health conditions among patients with coronavirus disease 2019 – United States, February 12 – March 28, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. **69**, 382–386 (2020)
62. Carli G., Cecchi L., Stebbing J., Parronchi P., Farsi A.: Is asthma protective against COVID-19? *Allergy*, 2020 (2020).
63. Ferastraoaru D., Hudes G., Jerschow E., Jariwala S., Karagic M., Vos G de., Rosenstreich D., Ramesh M.: Eosinophilia in asthma patients is protective against severe COVID-19 illness. *J Allergy Clin Immunol Pract*. **9**, 1152–1162 (2021)
64. Hughes-Visentin A., Paul A.B.M.: Asthma and COVID-19: What do we know now. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med*. **14**, 1179548420966242 (2020).
65. Halpin D.M.G., Singh D., Hadfield R.M.: Inhaled corticosteroids and COVID-19: a systematic review and clinical perspective. *Eur Respir J*. **55(5)**, 2001009(2020)
66. Farne H., Singanayagam A.: Why asthma might surprisingly protect against poor outcomes in COVID-19. *Eur Respir J*. **56(6)**, 2003045(2020).
67. Sajuthi S.P., Seibold M.A. et al.: Type 2 and interferon inflammation strongly regulates SARS-CoV-2 related gene expression in the airway epithelium. *Nat Comm*. **11**, 5139 (2020)
68. Alsofayan Y.M., Althunayyan S.M., Khan A.A., Hakawi A.M., Assiri A.M.: Clinical characteristics of COVID-19 in Saudi Arabia: A national retrospective study. *J Infect Public Health*, **13**, 920–925 (2020).
69. Shaker M.S., Greenhawt M. et al.: COVID-19: Pandemic contingency planning for the allergy and immunology clinic. *J Allergy Clin Immunol Pract*. **8(5)**, 1477–1488 (2020)
70. Levin M., Wong G.W.K. et al.: Acute asthma management during SARS-CoV-2 pandemic 2020. *World Allergy Org J*. **13(5)**, 100125 (2020)
71. Corman V.M., Muth D., Niemeyer D., Drosten C.: Hosts and sources of endemic human coronaviruses. *Adv Virus Res*. **100**, 163–188 (2018)
72. Guan Y., Poon L.L.M. *et al*.: Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. In: Learning from SARS: Preparing for the next disease outbreak: Workshop summary. Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats; Knobler S, Mahmoud A, Lemon S, et al., editors. Washington (DC): National Academies Press (US); 2004.

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 3, 133–145
DOI: 10.2478/am-2022-012

KRZTUSIEC I „EFEKT CZERWONEJ KRÓLOWEJ"

Karolina Ucieklak

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk

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

Streszczenie: Krztusiec jest zakaźną chorobą, typową dla wieku dziecięcego. Znamiennym objawem jest napadowy, silny i bezproduktywny kaszel, pogarszający się w nocy, który może prowadzić do wymiotów, bezdechu oraz sinicy. Pod względem klinicznym diagnostyka krztuśca jest problematyczna, ponieważ u zaszczepionych dzieci, nastolatków oraz dorosłych objawy mogą być znacznie łagodniejsze i mniej charakterystyczne, a więc trudniejsze do zdiagnozowania. Wprowadzenie szczepionki pełnokomórkowej (DTwP) oraz obowiązku szczepień skutecznie zredukowało liczbę przypadków. W wielu krajach, szczepionki DTwP zawierające pełne komórki bakteryjne, ze względu na swoją reaktogenność, zostały całkowicie lub częściowo, zastąpione szczepionkami bezkomórkowymi (DTaP) zawierającymi kilka wybranych i oczyszczonych białkowych antygenów bakteryjnych. Pomimo powszechności szczepień ochronnych notuje się wzrost zachorowań na krztusiec, nie tylko wśród najbardziej wrażliwej grupy – noworodków, ale również zaszczepionych nastolatków i dorosłych. Główną przyczyną wzrostu zachorowań jest niepełna ochrona oraz słaba skuteczność szczepionki bezkomórkowej w zapobieganiu transmisji *Bordetella pertussis*, która jest głównym czynnikiem etiologicznym krztuśca. Nowoczesne metody badawcze pozwalają także na identyfikację innych gatunków bakterii z rodzaju *Bordetella*, tj. *B. parapertussis* oraz *B. holmesii* wywołujących parakrztusiec o podobnych objawach. Obecnie stosowane szczepionki nie chronią przed szczepami gatunku *B. holmesii,* który staje się drugim, pod względem częstości zachorowań, czynnikiem etiologicznym krztuśca. Niedoskonałość dostępnych szczepionek jest przyczyną intensywnych poszukiwań nowych antygenów szczepionkowych i adiuwantów, powtórnego zainteresowania szczepionkami pełnokomórkowymi oraz podejścia hybrydowego przy projektowaniu szczepionki bezkomórkowej opartej o pęcherzyki zewnątrzbłonowe. Największe szanse na wprowadzenie ma szczepionka BPZE1, która jest osłabionym szczepem bakterii *B. pertussis* i jest przeznaczona do podawania w postaci żywej szczepionki donosowej.

1. Krztusiec. 2. Rodzaj *Bordetella*. 2.1. *Bordetella pertussis.* 2.2. *Bordetella parapertussis.* 2.3. *Bordetella bronchiseptica.* 2.4. *Bordetella holmesii.* 2.5. Nieklasyczne *Bordetellae*. 3. Morfologia i diagnostyka bakterii z klastra *B. bronchiseptica.* 3.1. Morfologia. 3.2. Diagnostyka krztuśca. 4. Epidemiologia pałeczek *Bordetellae* i udział poszczególnych gatunków w wywoływaniu zakażeń u ludzi. 5. Szczepionki przeciwkrztuścowe. 5.1. Szczepionki przeciwkrztuścowe pełnokomórkowe i bezkomórkowe. 5.2. Poszukiwania nowej szczepionki przeciwkrztuścowej. 6. Podsumowanie

PERTUSSIS AND THE RED QUEEN EFFECT

Abstract: Whooping cough is a contagious and typically childhood disease transmitted via droplets. Pertussis is especially dangerous for infants, but adults have become more susceptible. A pathognomonic symptom of pertussis is a severe spasmodic and unproductive cough that worsens at night and is accompanied by vomiting, apnea and cyanosis. The symptoms among vaccinated children, adolescents and adults, are milder, less characteristic, and therefore more difficult to diagnose. Whole-cell pertussis vaccine (DTwP) has been highly effective in reducing morbidity and mortality. However, in many countries DTwP vaccines, due to their reactogenicity, have been completely or partly replaced, by acellular pertussis vaccines (DTaP) that contain several purified bacterial protein antigens. In spite of the sustained high coverage of vaccinations, there is an increase of whooping cough cases in all age groups. The main cause of the increase is the lack of full protection from acellular vaccine in preventing transmission of *Bordetella pertussis*, which is the main etiological factor of whooping cough. Moreover, new diagnostic methods allow to identify other *Bordetella* species that cause pertussis-like symptoms, i.e. *B. parapertussis* and *B. holmesii*. The currently used vaccines do not provide a cross-protection against *B. holmesii* that has now become the second etiological factor of pertussis. Imperfections of existing vaccines are the reason for an intense development of improved anti-pertussis vaccines. Several research directions can be distinguished, such as identifying new components, designing an acellular vaccine based on the outer membrane vesicles or the renewed interest in whole cell vaccines.

1. Whooping cough. 2. Genus *Bordetella*. 2.1. *Bordetella pertussis.* 2.2. *Bordetella parapertussis.* 2.3. *Bordetella bronchiseptica.* 2.4. *Bordetella holmesii.* 2.5. Non-classical *Bordetellae*. 3. Morphology and diagnostics of bacteria from *B. bronchiseptica* cluster. 3.1 Morphology. 3.2. Pertussis diagnosis. 4. Epidemiological overview and species distribution. 5. Pertussis vaccines. 5.1. Whole cell and acellular pertussis vaccines. 5.2. Search for a new pertussis vaccine. 6. Summary

Słowa kluczowe: *Bordetella holmesii*, *Bordetella pertussis*, krztusiec, szczepionki
Keywords: *Bordetella holmesii*, *Bordetella pertussis*, pertussis, whooping cough, vaccines

* Autor korespondencyjny: Karolina Ucieklak, Pracownia Spektroskopii NMR, Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław; e-mail: karolina.ucieklak@hirszfeld.pl

** poniższa praca powstała na podstawie pracy doktorskiej zrealizowanej pod opieką dr hab. Tomasza Niedzieli

© 2022 Karolina Ucieklak
This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

1. Krztusiec

Terminy „hipoteza Czerwonej Królowej", „ewolucja Czerwonej Królowej", „efekt Czerwonej Królowej" czy „dynamika Czerwonej Królowej" używane są w różnych dziedzinach nauki do opisu sytuacji, w której opozycyjne gatunki (np. patogen-żywiciel czy drapieżnik-ofiara) próbują się wzajemnie „prześcignąć". Zmieniają swoje cechy fenotypowe, aby lepiej przystosować się do cech przeciwnika, jednak w efekcie pozostają we względnej homeostazie [17]. „Trzeba biec ile sił, żeby utrzymać się w tym samym miejscu"[1] słowa Czerwonej Królowej z książki pt. „Po drugiej stronie lustra" Lewisa Carrolla odzwierciedlają impas, w którym jako populacja znaleźliśmy się tracąc przewagę nad próbą ograniczenia rozprzestrzeniania się krztuśca. Wydawało się, że w momencie wprowadzenia pierwszej szczepionki przeciwkrztuścowej i obserwacji spektakularnych efektów jej działania droga do celu jest prosta, choć wymaga utrzymywania długotrwałego reżimu szczepień. Jednak od pewnego czasu, pomimo wysokiego poziomu wyszczepienia społeczeństwa, liczba przypadków utrzymuje minimalną aczkolwiek stałą tendencję wzrostową z nawracającymi cyklicznie falami. Wprowadzenie szczepionek znacznie ograniczyło liczbę przypadków krztuśca, ale przyspieszyło proces zmian geno- i fenotypowych u bakterii w celu ich lepszego przystosowania do nowej sytuacji.

Krztusiec jest zakaźną chorobą bakteryjną, znaną na całym świecie pod różnymi nazwami, które odnoszą się do czasu jej trwania („kaszel stu dni") lub charakterystycznego kaszlu (krztusiec, koklusz) przypominającego pianie koguta, który jest objawem patognomonicznym.

Pierwsze udokumentowane doniesienia o krztuścu datowane są na początek XV wieku w Korei. Prawie 100 lat później w perskim mieście Herat (obecnie zachodni Afganistan) doszło do wybuchu epidemii krztuśca, której opisy przypisywane są lekarzowi Baha al-Dawlah Raziemu [3]. Choroba charakteryzowała się wysoką zaraźliwością oraz śmiertelnością zarówno u dzieci jak i wśród dorosłych. Powszechnym „lekarstwem" był napar z jednego „mithkala" (6 g) imbiru. Kolejna fala epidemii, która nadeszła po pół roku miała już znacznie łagodniejszy przebieg oraz mniejszą śmiertelność [3]. Najwcześniejsze europejskie informacje o epidemii krztuśca pochodzą z Paryża z 1578 roku. Francuski lekarz Guillaume de Baillou również opisał dwie fale epidemii. Podczas pierwszej fali choroba zaatakowała zarówno niemowlęta, dzieci jak i dorosłych [3, 5]. Na początku XX wieku belgijscy badacze Jules Bordet i Octave Gengou zidentyfikowali czynnik etiologiczny krztuśca – pałeczki *Bordetella pertussis* [8].

Krztusiec uważany jest za wysoce zakaźną chorobę wieku dziecięcego. Współczynnik określający zakaźność choroby R_0 (rate of infection) dla krztuśca jest wysoki $R_0 = 15–17$ [1]. Pałeczka krztuśca przenoszona jest drogą kropelkową i jedynym znanym sposobem infekcji jest transmisja od zakażonej osoby. Często źródłem zakażenia jest bezobjawowy dorosły, który pomimo zaszczepienia, może stać się „cichym nosicielem" i nieświadomie brać udział w transmisji choroby. Zachorowalność na krztusiec uzależniona jest od stopnia uodpornienia, wieku oraz płci [19]. Wśród zaszczepionych dzieci, nastolatków oraz dorosłych objawy mogą być znacznie łagodniejsze i mniej specyficzne, a więc trudniejsze do zdiagnozowania. Zespół ekspertów z Global Pertussis Initiative (GPI), zaproponował wprowadzenie algorytmu rozpoznania krztuśca w zależności od grupy wiekowej: 0–3 miesięcy, 4 miesiące – 9 lat oraz od 10 lat [12].

W modelowym przebiegu krztuśca u nieszczepionych dzieci poniżej pierwszego roku życia można wyróżnić trzy stadia. W pierwszym stadium choroby, zwanym inaczej fazą kataralną obserwowane są mało specyficzne objawy jak przy typowym przeziębieniu, tj. suchy kaszel, ból gardła, nieżyt dróg oddechowych, katar, osłabienie, zapalenie spojówek oraz lekkie stany podgorączkowe. Po 7–14 dniach chory wchodzi w drugie stadium, zwane fazą napadowego kaszlu. Faza ta może trwać nawet do dwóch miesięcy. Typowe i bardzo charakterystyczne dla tej fazy objawy to: silny, paroksyzmowy i bezproduktywny kaszel, pogarszający się w nocy, o charakterystycznym świszczącym dźwięku, który może powodować bezdech, sinicę, a nawet wymioty. Trzecie stadium, które może trwać nawet 12 tygodni to faza rekonwalescencji, w której częstotliwość napadowego kaszlu wyraźnie maleje [88]. Zakażenie *B. pertussis* prowadzi do wielu, dość często pojawiających się powikłań takich jak przepuklina pachwinowa, krwotok spojówkowy, drgawki, encefalopatia, zespół zaburzeń oddychania, zapalenie płuc. Wystąpienie tego rodzaju komplikacji, szczególnie u noworodków, może doprowadzić do bezdechu i nagłej śmierci [31].

Bakteria *B. pertussis* jest wyłącznym czynnikiem etiologicznym krztuśca w klasycznym podejściu. Niektóre przypadki są jednak infekcjami mieszanymi wywołanymi przez *B. pertussis* oraz dodatkowo przez *Bordetella parapertussis* lub *Bordetella holmesii*. *B. parapertussis* i *B. holmesii* niezależnie są w stanie wywołać chorobę o niezwykle podobnych objawach, pod względem klinicznym praktycznie nieodróżnialną od typowego krztuśca, ale o łagodniejszym przebiegu – tzw. parakrztusiec. Obecnie uważa się, że krztusiec może być wywoływany przez trzy gatunki bakterii z rodzaju *Bordetella*: *B. pertussis*, *B. parapertussis* oraz *B. holmesii* [28, 49, 54, 63].

[1] Lewis Carroll, Alicja w krainie czarów. Po drugiej stronie lustra, Wydawnictwo Vesper, In Rock Music Press, 2012.

2. Rodzaj *Bordetella*

Bordetellae to zazwyczaj aerobowe, niewielkie, Gram-ujemne bakterie o kształcie pośrednim między ziarniakiem, a pałeczką. Rodzaj *Bordetella* należy do rodziny *Alcaligenceae* [4]. Na podstawie badań molekularnych rybosomalnego 16S RNA (rRNA) w ciągu ostatnich dwudziestu lat do listy gatunków z rodzaju *Bordetella* dopisano nowe, niektóre początkowo uważane za niechorobotwórcze, a obecnie klasyfikowane jako patogenne. Do rodzaju *Bordetella* zalicza się szesnaście gatunków:

- *B. pertussis*,
- *B. parapertussis*,
- *B. bronchiseptica*,
- *B. holmesii*,
- *B. petrii*,
- *B. hinzii*,
- *B. pseudohinzii*,
- *B. trematum*,
- *B. avium*,
- *B. ansorpii*,
- *B. flabillis*,
- *B. bronchialis*,
- *B. sputigena*,
- *B. muralis*,
- *B. tumulicola*,
- *B. tumbae*.

Patogenne gatunki z rodzaju *Bordetella*, blisko spokrewnione i wywołujące zakażenia układu oddechowego u ssaków określane są mianem „klastra *Bordetella bronchiseptica*" i są to tak zwane klasyczne *Bordetellae*. Do tej grupy należą *B. pertussis*, *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica*, które kolonizują drogi oddechowe wywołując infekcje oskrzeli i płuc u zwierząt i ludzi [84].

2.1. *Bordetella pertussis*

Gatunek *B. pertussis* jest najbardziej rozpoznawanym przedstawicielem bakterii z rodzaju *Bordetella*. Jedynym znanym rezerwuarem tego patogenu jest człowiek, przy czym od takiej osoby bakterie można wyizolować jedynie w początkowych etapach zakażenia, w fazie kataralnej [8].

Analiza filogenetyczna wykazała, że niesłychanie szybkie rozprzestrzenienie się pałeczek krztuśca w populacji ludzkiej nastąpiło w ciągu ostatnich 500 lat. Szczepy, które obecnie krążą w populacji można przyporządkować do dwóch znacznie różniących się między sobą rozgałęzień. Do rozgałęzienia I zaliczana jest niewielka liczba szczepów, natomiast rozgałęzienie II zawiera 97,3% szczepów. Istnieją dwie koncepcje, których autorzy próbują wyjaśnić to nierównomierne zróżnicowanie. Według jednej z teorii, około 2000 lat temu dwie linie uległy rozdzieleniu, z kolei według drugiej hipotezy zaadaptowały się niezależnie od siebie do populacji ludzkiej z nieznanego rezerwuaru [5]. Zmienność genetyczna *B. pertussis* jest ekstremalnie niska ($\pi = 0{,}004\%$) co sugeruje, że pałeczki *B. pertussis* jako gatunek doświadczyły efektu „wąskiego gardła" (gdy liczebność gatunku zmniejszyła się na skutek katastrofy co ograniczyło pulę genową) lub/i szybkiej klonalnej ekspansji [41]. Wielkość genomu *B. pertussis* wynosi w przybliżeniu ~ 4 000 kilo par zasad, czyli w porównaniu z innymi bakteriami z rodzaju *Bordetella* genom jest mniejszy o 10%. Prawdopodobnie w trakcie adaptowania się do pasożytniczego trybu życia bakterie *B. pertussis* utraciły część genomu, aby móc skolonizować niszę i przetrwać w nowych warunkach środowiskowych [84].

2.2. *Bordetella parapertussis*

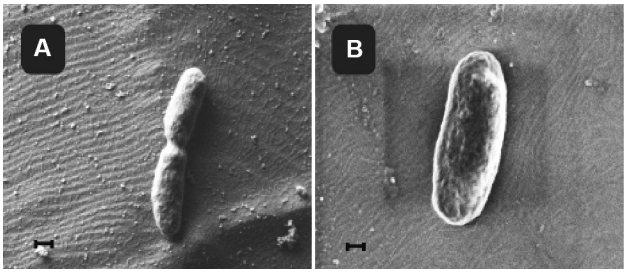
Drugim gatunkiem (według częstości izolacji) z rodzaju *Bordetella,* który wywołuje krztusiec, jest *B. parapertussis*. Krztusiec wywoływany przez *B. parapertussis* ma znacznie łagodniejszy przebieg i nazywany jest parakrztuścem [6].

2.3. *Bordetella bronchiseptica*

Najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem patogennym i środowiskowym jest *B. bronchiseptica*. Bakterie te nie są ograniczone tylko do jednego typu gospodarza. Mają zdolność do wywoływania zakażenia u wielu gatunków ssaków, szczególnie zwierząt towarzyszących człowiekowi, zwierząt gospodarskich, ale także dzikich, u których wywołuje infekcje dróg oddechowych. Pałeczki *B. bronchiseptica* izolowane są często od kotów, psów, królików, świń, koni a nawet kawii domowych. W miejscach o dużym zagęszczeniu zwierząt (schroniska, gospodarstwa rolne) bakterie te mogą się szybko rozprzestrzeniać zwłaszcza, że zakażenie u zwierząt może być przewlekłe oraz bezobjawowe [26]. Pierwszych izolacji *B. bronchiseptica* dokonano u psów z infekcjami dróg oddechowych. W niektórych przypadkach, również człowiek może zostać zakażony. Najczęściej dotyczy to osób mających codzienny kontakt ze zwierzętami np. w gospodarstwie [94]. Infekcje są również częste u osób z osłabionym układem odpornościowym, pacjentów immunosupresyjnych [18, 94], pacjentów z chorobą nowotworową [69], czy po przeszczepieniach narządów [51]. Badania filogenetyczne wskazują, że przodek *B. bronchiseptica* może być również wspólnym przodkiem *B. pertussis* oraz *B. parapertussis* [96].

2.4. *Bordetella holmesii*

Pałeczki *B. holmesii* (Ryc. 1) początkowo zostały opisane jako bakterie wywołujące zakażenia u pacjentów immunosupresyjnych po resekcji śledziony [87], a dopiero później zostały wyizolowane od pacjentów z objawami przypominającymi krztusiec [95]. *B. holmesii* nie jest typowym przykładem patogennych ssaczych *Bordetellae.* Około 66% genów współdzieli z *B. pertussis* oraz *B. parapertussis*. Na podstawie analiz sekwencji 16S rRNA początkowo ustalono, że pałeczka *B. holmesii* jest blisko spokrewniona z *B. pertussis* [4, 87], jednak szersze analizy całego genomu wskazują,



Ryc. 1. *B. holmesii* ATCC 51541
(A) szerokość pola widzenia FOV 2,8 µm, powiększenie 100 000x, wskaźnik skali 200 nm, detektor Everhard – Thornley (B) szerokość pola widzenia FOV 2,0 µm, powiększenie 150 000x, wskaźnik skali 100 nm, detektor InLens SE1; fot. dr hab. Marek Drab.

że jest to dalsze pokrewieństwo [41]. Biorąc pod uwagę zawartość genomu jest on bardziej zbliżony do genomów *B. avium* oraz *B. petrii*. Przodkiem *B. holmesii* były prawdopodobnie ptasie *Bordetellae* [16]. W przypadku *B. holmesii* dość łatwo zachodzi poziomy transfer genów. Aż 400 genów (ok. 12,5%) opisanych w różnych izolatach *B. holmesii* nie występuje u innych gatunków bakterii z rodzaju *Bordetella*. Każdy szczep posiada od 24 do 114 unikalnych genów, a jeden z wykrytych genów został zidentyfikowany także w genomie *Escherichia coli*. Pałeczki *B. holmesii* poprzez horyzontalny transfer genów mogły uzyskać zdolność do wywoływania parakrztuśca od *B. pertussis* [30]. Różnorodność genetyczna *B. holmesii* jest jeszcze mniejsza niż różnorodność *B. pertussis*, co również sugeruje jej niedawne przystosowanie do ludzkiego gospodarza [41].

Pałeczki *B. holmesii* przenoszą się prawdopodobnie drogą kropelkową [35]. Bakterie te początkowo izolowano od pacjentów z podejrzeniem krztuśca, na poziomie ok. 0,4% [28]. Późniejsze wyniki badań wskazują, że *B. holmesii* rozprzestrzenia się po całym świecie. Wykrywane są w 20% próbek pobranych od dorosłych pacjentów we Francji [54], czy do 29% w Ohio (Stany Zjednoczone) diagnozowanych w kierunku krztuśca [63]. Obecnie zakażenia o etiologii *B. holmesii* nie wydają się być zbytnim powodem do obaw i zagrożeniem dla zdrowia publicznego. Jednak ich hipotetyczna zdolność do zwiększania chorobotwórczości przez horyzontalny transfer czynników wirulencji może być przyczyną częstszego pojawiania się ostrych infekcji [58].

2.5. Nieklasyczne *Bordetellae*

Pozostałe gatunki bakterii z rodzaju *Bordetella* również są zdolne do kolonizacji układu oddechowego i wywołania infekcji oskrzeli oraz płuc, zakażenia ran [70, 77, 80], a także posocznicy [66]. Duże znaczenie ekonomiczne dla hodowców ptaków ma *B. avium*. Jest głównym czynnikiem etiologicznym kataru u indyczych piskląt [36]. Z dróg oddechowych drobiu izolowane są również pałeczki *B. hinzii,* które czasami ulegają przeniesieniu z ptaka na człowieka [78]. Szczepy blisko spokrewnionego gatunku *B. pseudohinzii* są izolowane z dróg oddechowych myszy laboratoryjnych [33]. Od pacjentów chorych na mukowiscydozę czasami izolowane są *B. flabillis*, *B. bronchialis* oraz *B. sputigena* [79]. Gatunki takie jak *B. trematum* [77] oraz *B. ansorpii* [38] związane są z infekcjami ran oraz ucha. Pierwszym opisanym środowiskowym gatunkiem z rodzaju *Bordetella* jest *B. petrii* wyizolowana z osadu rzecznego [92]. Stwierdzono też obecność *B. petrii* w materiałach pobranych z zakażonej tkanki kostnej [23, 68], czy u pacjentów z mukowiscydozą [67]. Do nowoodkrytych gatunków niepatogennych należą *B. tumbae, B. tumulicola* i *B. muralis* wyizolowane z malowideł naściennych w starożytnych chińskich grobowcach [72].

Wiele gatunków *Bordetellae* jest szeroko rozpowszechnionych i izolowanych z różnych nisz środowiskowych [20, 53, 72, 80, 92]. Pałeczki *B. bronchiseptica* oraz *B. hinzii* zachowały zdolność do wzrostu na ekstrakcie glebowym, pomimo przystosowania do zwierzęcego i ludzkiego gospodarza [29]. Sugeruje to, że gleba może być naturalnym środowiskiem dla *Bordetellae.* Istnieje możliwość, że wiele innych, niepoznanych jeszcze, patogennych *Bordetella* spp. może bytować w środowisku glebowym.

3. Morfologia i diagnostyka bakterii z klastra *B. bronchiseptica*

3.1 Morfologia

Gatunek *B. pertussis* należy do bakterii o dużych wymaganiach wzrostowych, pod względem warunków hodowlanych. Wzrost uzyskuje się na podłożu Bordeta-Gengou, Regan-Lowe lub alternatywnie na agarze węglowym wzbogaconym odwłóknioną krwią baranią w temperaturze 37°C, w czasie 3 do 7 dni, w warunkach tlenowych. Kolonie pałeczek krztuśca pojawiające się po około 3 dniach są drobne, gładkie, wypukłe i perłowe. Ze względu na kolor określa się je mianem „kropli Merkurego". Jednak dalsze obserwacje wskazały, że kolor kolonii bakteryjnych zależy od fazy wzrostu *B. pertussis*. Typowe kolonie fazy I (faza wzrostu „logarytmicznego") są małe i lśniące. Kolonie *B. parapertussis* pojawiają się wcześniej i ze względu na wytwarzanie barwnika mogą być bardziej brązowe. Oba gatunki w fazie I wykazują zdolność do hemolizy krwinek obecnych w podłożu hodowlanym. Kolonie fazy II i III nie zmieniają wyglądu, ale z czasem tracą właściwości hemolityczne. W fazie IV kolonie zmieniają się na bardziej białe i płaskie [88]. Kolonie pałeczek *B. holmesii* również są niewielkich rozmiarów, ale pojawiają się po ok. 2 dniach i w kolejnych 2–3 dniach hodowli bakterie wytwarzają brązowy barwnik. W hodowli

Tabela I
Morfologia bakterii z klastra *B. bronchiseptica* oraz *B. holmesii*

	B. pertussis	*B. parapertussis*	*B. bronchiseptica*	*B. holmesii*
Czas wzrostu na podłożu Bordeta-Gengou	3–4 dni	2–3 dni	1 dzień	3–4 dni
Temperatura	37°C	37°C	37°C	35°C
Atmosfera podczas hodowli	tlenowa	tlenowa	tlenowa	5% CO_2
Oksydaza	+	–	+	–
Ureaza	–	+	+	–
Ruch	+	–	+	–
Właściwości hemolityczne	+	+	+	+
Wytwarzanie barwnika	żółty –	żółty brązowy	żółty –	żółty brązowy

(„+" obecność; „–" brak)

płynnej bakterie z klastra *B. bronchiseptica* uwalniają do syntetycznej pożywki Stainer-Scholte słomkowo-żółty barwnik, który zidentyfikowano jako ryboflawinę (witamina B_2). W warunkach niskiej gęstości pałeczki *B. pertussis* w I i II fazie wzrostu wytwarzają ryboflawinę, która stymuluje ich namnażanie do optymalnego poziomu [55]. Dodatkowo zarówno *B. parapertussis* jak i *B. holmesii* po 48 godzinach hodowli w obecności jonów żelaza wytwarzają niezidentyfikowany jeszcze brązowy barwnik.

Pałeczki krztuśca wytwarzają wiele czynników zjadliwości. Toksyna krztuścowa (pertussis toxin, PT) jest jednym z najważniejszych czynników wirulencji biorących udział w patogenezie krztuśca i w zinaktywowanej formie jest najbardziej istotnym komponentem szczepionek przeciwkrztuścowych. Egzotoksyna PT, wytwarzana jest wyłącznie przez *B. pertussis*, ale to nie jedyny gatunek z rodzaju *Bordetella*, który posiada geny kodujące PT. Geny te u *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica* są transkrypcyjnie nieaktywne i w efekcie PT nie jest wytwarzana [2]. Wśród pozostałych czynników chorobotwórczości istotne są hemaglutynina włókienkowa (filamentous hemagglutinin adhesin, FHA), pertaktyna (pertactin, PRN) oraz fimbrie (fimbriae, FIM), które mogą być składnikami szczepionek. Pozostałe antygeny takie jak toksyna dermonekrotyczna (dermonecrotic toxin, DNT), cyklaza adenylanowa (adenylate cyclase toxin, ACT), cytotoksyna tchawicza (tracheal cytotoxin, TCT), białko BrkA (*Bordetella* resitance to killing A) oraz endotoksyna (lipopolisacharyd, LPS) nie są składnikami szczepionek podjednostkowych, ale są komponentami obecnymi w szczepionkach pełnokomórkowych [27].

Tabela II
Czynniki wirulencji bakterii z klastra *B. bronchiseptica* oraz *B. holmesii*

Czynnik wirulencji	*B. pertussis*	*B. parapertussis*	*B. bronchiseptica*	*B. holmesii*
PT	+	–	–	–
FHA	+	+	+	–
ACT	+	+	+	–
DNT	+	+	+	–
PRN	+	+	+	–
FIM	+	–	+/–	–
TCT	+	+	+	–
LOS/LPS	+	+	+	+

„+" obecność, „–" brak

3.2 Diagnostyka krztuśca

Zazwyczaj krztusiec diagnozowany jest na podstawie wystąpienia patognomonicznego objawu – kaszlu przypominającego pianie koguta. Objawy krztuśca u nastolatków oraz dorosłych są jednak mało specyficzne i charakterystyczny kaszel może w ogóle nie występować. Podstawą rozpoznania krztuśca jest przeprowadzenie badań mikrobiologicznych, serologicznych oraz coraz częściej badań molekularnych [88].

Klasyczna diagnostyka krztuśca polega przede wszystkim na hodowli kolonii bakteryjnych na odpowiednim podłożu. W standardowej diagnostyce w kierunku *B. pertussis* do podłoża hodowlanego Bordeta-Gengou dodawany jest antybiotyk cefaleksyna. Jednak dodatek tego antybiotyku hamuje wzrost *B. holmesii,* co zafałszowuje wynik badania mikrobiologicznego [46]. *B. pertussis* należy do bakterii długo rosnących, dlatego coraz powszechniejsze stają się badania molekularne oparte o *real-time* PCR wykrywające DNA bakteryjne. W porównaniu do hodowli kolonii bakteryjnych (typowy czas wzrostu dla izolatu to 7 dni) jest to metoda znacznie szybsza i bardziej czuła, niestety dosyć kosztowna.

Najczęściej wykorzystywaną sekwencją do identyfikacji bakterii w diagnostyce krztuśca jest sekwencja *IS481*. Występuje ona w genomie *B. pertussis* w liczbie 50–200 kopii [25]. Obecna jest również w genomie

Tabela III
Sekwencje docelowe w DNA klastra *B. bronchiseptica* i *B. holmesii*

Sekwencja	IS481	IS1001	h-IS1001	IS1002	ptxP	ptxS1	recA
B. pertussis	■			■	■	■	
B. parapertussis		■		■		■	
B. bronchiseptica	Niektóre szczepy	Niektóre szczepy		■		■	
B. holmesii	■		■				■

■ obecność sekwencji,
▒ częściowa obecność sekwencji,
□ brak sekwencji

B. holmesii (8–10 kopii) oraz niektórych szczepów *B. bronchiseptica* (< 5 kopii) [71]. Drugą najczęściej stosowaną sekwencją w diagnostyce molekularnej jest sekwencja *IS1001* charakterystyczna dla *B. parapertussis* (~ 20 kopii). Na podstawie jej braku można wyeliminować krztusiec wywoływany przez *B. pertussis*, nie pozwala natomiast na odróżnienie *B. parapertussis* od *B. bronchiseptica*, które również posiadają kilka kopii (1–7 kopii) tej sekwencji [74, 96]. Na podstawie obecności homologicznej sekwencji *h-IS1001* (1 kopia) identyfikowane są pałeczki *B. holmesii* [70]. Podobne znaczenie potwierdzające zakażenie *B. holmesii* pełni sekwencja *recA* [45]. Na wykluczenie zakażenia *B. holmesii* pozwala sekwencja *IS1002,* która obecna jest w genomie *B. parapertussis* (9 kopii), *B. pertussis* (4–9 kopii) oraz kilku szczepów *B. bronchiseptica* (1 kopia) [96]. *B. pertussis*, jako jedyny gatunek z rodzaju *Bordetella* wytwarza toksynę krztuścową, dlatego wydawałoby się, że najbardziej odpowiednią sekwencją pozwalającą zidentyfikować pałeczki krztuśca byłaby sekwencja *ptxS1*, która koduje podjednostkę S1 toksyny krztuścowej. Jednakże u *B. parapertussis* oraz *B. bronchiseptica* geny kodujące toksynę krztuścową są obecne, ale na skutek mutacji w regionie promotorowym uległy wyciszeniu [71]. Sekwencja promotorowa *ptxP* (1 kopia) jest swoistym markerem identyfikującym *B. pertussis* [88]. Wadą stosowania sekwencji jednokopijnej *ptxP* jest niska czułość diagnostyczna testu. Do identyfikacji poszczególnych gatunków wywołujących krztusiec potrzebny jest algorytm oparty o zestaw różnych sekwencji, aby móc właściwie zinterpretować wyniki.

W laboratoriach mikrobiologicznych coraz bardziej powszechna staje się metoda identyfikacji bakterii oparta o spektrometrię mas (mass spectrometry, MS). Jest to technika polegająca na pomiarze stosunku masy do ładunku (*m*/*z*) jonów wytworzonych w trakcie jonizacji analizowanych cząsteczek. Jako metodę jonizacji stosuje się desorpcję/jonizację laserem wspomaganą matrycą (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI). Biotypowanie techniką MALDI-TOF MS (time of flight, TOF) polega na analizie uzyskanych bakteryjnych profili białkowych, charakterystycznych dla danego gatunku. Wygenerowane widma masowe porównuje się z wzorami referencyjnymi zamieszczonymi we wciąż rozbudowywanych bazach danych. Przykładowymi systemami stosowanymi w biotypowaniu bakterii są Biotyper (Bruker) i Vitek MS (bioMérieux, Inc.). Do przeprowadzenia analizy wystarczy niewielka ilość materiału (zwykle 1 kolonia), a całe biotypowanie można przeprowadzić w krótkim czasie kilkunastu minut od momentu pobrania kolonii, co jest istotną zaletą w porównaniu do standardowych metod biochemicznych. Biotypowanie sprawdza się również w przypadku zakażeń mieszanych i nadaje się do identyfikacji klasycznych *Bordetellae* [98], ale nie jest powszechnie przyjętą metodą w diagnostyce mikrobiologicznej krztuśca.

4. Epidemiologia pałeczek *Bordetellae* i udział poszczególnych gatunków w wywoływaniu zakażeń u ludzi

Pałeczki krztuśca stale krążą w populacji ludzkiej, co kilka lat wywołując lokalny, gwałtowny wzrost liczby zakażeń. Za zdecydowaną większość przypadków odpowiada *B. pertussis*. Rozkład gatunkowy różni się w zależności od regionu i zmienia się w czasie.

W stanie Massachusetts, w USA w latach 1995–1998 rozkład ten przedstawiał się następująco. Za 85% przypadków krztuśca odpowiedzialne były pałeczki *B. pertussis*, w 11% próbek wykryto *B. parapertussis*, a *B. holmesii* w 3,7% prób [46]. Podczas epidemii w Ohio w latach 2010–2011 *B. pertussis* wykryto w 68% przypadków. Na drugim miejscu wykryto gatunek *B. holmesii,* który był odpowiedzialny za 29% przypadków. Kolejne 2% przypadków to zakażenia mieszane *B. pertussis* i *B. holmesii. B. parapertussis* wykryto w 1,4% badanych próbek [63]. W podobnym okresie w Kanadzie (2007–2008) pałeczki *B. holmesii* zostały zidentyfikowane w zaledwie 0,007% przypadków. Głównym czynnikiem etiologicznym była *B. pertussis* – 96% badanych prób. *B. parapertussis* wykryto w 2,5% przypadków, a zakażenia mieszane z udziałem *B. pertussis* oraz *B. parapertussis* oscylowały na poziomie 0,007% [28].

W latach 2009–2012 w Szwajcarii krztusiec był wywoływany głównie przez *B. pertussis* (97%), niewielki odsetek przypadków zidentyfikowano, jako zakażenie *B. parapertussis* (3%), natomiast nie wykryto *B. holmesii* [57]. W latach 2009–2010 we Francji jako główny czynnik etiologiczny krztuśca dominowały pałeczki *B. pertussis* (92%). Znikomy odsetek przypadków (0,6%) zidentyfikowano, jako jednoczesne zakażenie *B. pertussis* oraz *B. parapertussis* lub *B. bronchiseptica.* DNA *B. holmesii* wykryto w 6,8% próbek [54].

W Barcelonie w okresie maj 2016 – kwiecień 2017 na 69 potwierdzonych przypadków krztuśca *B. pertussis* zidentyfikowano w 91,3% prób, *B. holmesii* – 7,2%, a *B. parapertussis* – 1,5% [76]. W ciągu kilku lat skokowo do poziomu 8,8% wzrosła liczba przypadków o etiologii *B. holmesii* [49].

5. Szczepionki przeciwkrztuścowe

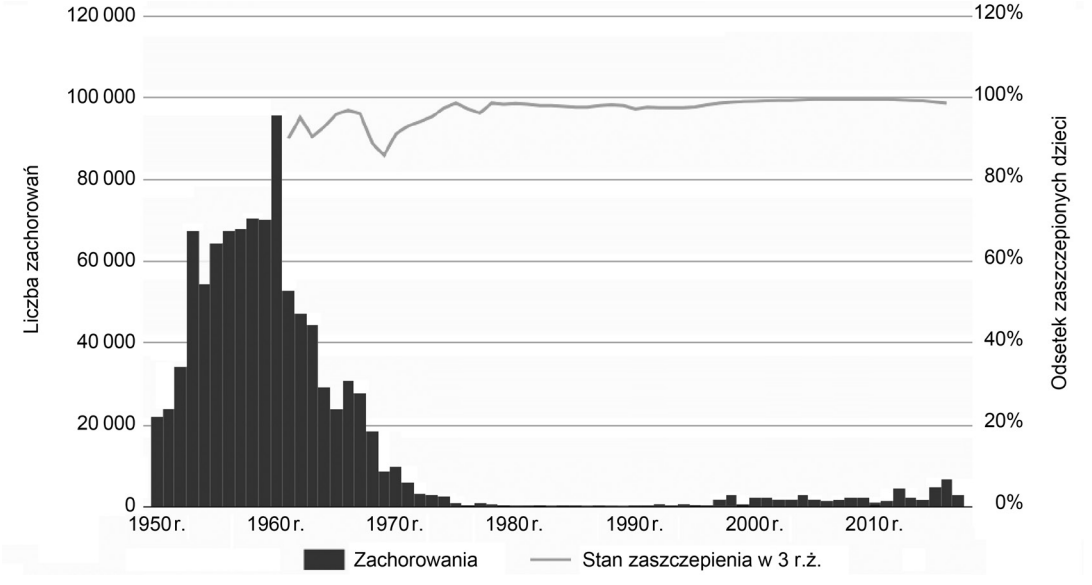
Do momentu wprowadzenia powszechnych szczepień przeciwkrztuścowych, krztusiec uważany był za bardzo zakaźną i często śmiertelną chorobę wieku dziecięcego. Szacuje się, że przed wynalezieniem szczepionki, każdego roku na krztusiec umierało 760 000 niemowląt [88]. Przełomem okazały się lata 40. XX wieku, kiedy to wprowadzono powszechny obowiązek szczepień. Od tego momentu zaobserwowano znaczący spadek śmiertelności. W 2018 roku przy globalnym poziomie wyszczepienia populacji trzema dawkami szczepionki przeciwkrztuścowej na poziomie 86% zidentyfikowano 151 074 przypadki krztuśca [90]. Także w Polsce po wprowadzeniu obowiązku szczepień zachorowalność na krztusiec zauważalnie zmalała (Ryc. 2).

Z upływem czasu zaobserwowano, że powszechne szczepienia zredukowały liczbę zachorowań i umieralność wśród niemowląt oraz wpłynęły na przesunięcie wieku zachorowań. Według najnowszego europejskiego raportu epidemiologicznego 62% przypadków krztuśca dotyczy nastolatków i dorosłych [19]. Dorośli są głównym źródłem transmisji choroby i przenoszą pałeczki krztuśca na wrażliwe niemowlęta. Dla noworodków krztusiec jest najbardziej niebezpieczny. Ponad 41% przypadków wśród dzieci poniżej pierwszego roku życia wymaga hospitalizacji. U dzieci poniżej 3 miesięcy ten odsetek wzrasta do 66% [19].

5.1. Szczepionki przeciwkrztuścowe pełnokomórkowe i bezkomórkowe

Pierwszym typem szczepionki wprowadzonym do powszechnego użytku była szczepionka pełnokomórkowa skojarzona (whole-cell pertussis; wP, DTwP, DTP) przeciwko błonicy (Diphtheria), tężcowi (Tetanus) oraz krztuścowi (Pertussis) zawierająca toksoid błoniczy, toksoid tężcowy oraz inaktywowane bakterie wybranych szczepów *B. pertussis.* Do produkcji szczepionki pełnokomórkowej wykorzystuje się bakterie *B. pertussis* hodowane na syntetycznym płynnym podłożu. Bakterie są zabijane chemicznie lub/i termicznie i po dostosowaniu do odpowiedniej gęstości, adsorbowane na solach glinu [34].

Drugim typem wprowadzonej szczepionki jest szczepionka bezkomórkowa (acellular pertussis; aP,



Ryc. 2. Stan epidemiologiczny krztuśca w Polsce w latach 1950–2017

Źródło danych: biuletyny roczne „Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce" oraz „Szczepienia ochronne w Polsce" (wyd: NIZP-PZH, GIS). Data ostatniej aktualizacji 10.12.2021 http://szczepienia.pzh.gov.pl/szczepionki/krztusiec/3/#jak-wiele-zachorowan-na-krztusiec-wystepuje-w-Polsce).

DTaP), która zawiera toksoid błoniczy, toksoid tężcowy oraz kilka wybranych, wyizolowanych i oczyszczonych antygenów bakteryjnych *B. pertussis*. Antygenami są: toksyna krztuścowa (PT), hemaglutynina włókienkowa (FHA), pertaktyna (PRN) oraz fimbrie (FIM2 i FIM3). W zależności od producenta skład i proporcje antygenów białkowych różnią się.

W wielu krajach, szczepionki acelularne (DTaP) częściowo lub całkowicie zastąpiły szczepionki DTwP. Głównym powodem było to, że szczepionki DTwP są reaktogenne. W miejscu podania szczepionka DTwP może wywołać bolesność, zaczerwienienie i obrzęk. Miejscowe odczyny poszczepienne są krótkotrwałe, ale mogą powodować pewien dyskomfort. Najczęściej do ogólnych obserwowanych odczynów należy wzrost temperatury powyżej 38°C, senność, wymioty i uporczywy płacz [21]. Za reaktogenność szczepionek DTwP odpowiedzialny jest lipopolisacharyd, który jest integralnym składnikiem błony zewnętrznej bakterii i jego zawartość w szczepionce jest zmienna. Ilość tego antygenu waha się w granicach 0,9–2,8 μg/ml, z czego większość to LPS uwolniony do roztworu. LPS jest uwalniany z komórki bakteryjnej wraz z upływem czasu przechowywania szczepionki. Po około sześciu miesiącach nawet 80% LPS może zostać uwolnione [32].

Szczepionki DTaP nie zawierają LPS, a więc są znacznie mniej reaktogenne i ewentualne odczyny poszczepienne są rzadziej obserwowane [13]. Jednakże wraz z podaniem kolejnej dawki i z wiekiem dziecka, reaktogenność szczepionki DTaP wzrasta pomimo braku LPS w składzie [7]. Dla starszych dzieci i dorosłych rekomendowane są szczepionki dTap z obniżoną zawartością antygenów błoniczych i krztuścowych (pisane małymi literami dla odróżnienia od szczepionki DTaP). W przypadku kolejnych dawek miejscowe odczyny poszczepienne są słabsze [65] lub różnice pomiędzy odczynami nie są znaczące [83].

Przechorowanie krztuśca nie gwarantuje dożywotniej ochrony przed ponownym zakażeniem. W zależności od szczepów krążących w populacji, maksymalny czas ochrony może trwać ~20 lat. Jednak zazwyczaj okres ochronny jest znacznie krótszy, dlatego tak istotne jest doszczepienie nastolatków i dorosłych. Działanie ochronne po immunizacji szczepionką pełnokomórkową DTwP jest dłuższe niż po immunizacji szczepionką DTaP i może trwać nawet do 12 lat [86]. Ochrona po zaszczepieniu szczepionką bezkomórkową DTaP zanika dość szybko i po upływie ok. 8 lat chronionych pozostaje jedynie 10% dzieci [47]. Najkrótszy efekt ochronny zaobserwowano dla szczepionek dTap, który to obniża się już po 4 latach z poziomu 68,8% do 8,9% [37]. Po przeanalizowaniu wielu wyników badań nad skutecznością wszystkich rodzajów szczepionek określono ich efektywność na poziomie 94% dla DTwP, 85% dla DTaP [24] oraz 67% dla dTap [63].

Pomimo zaprojektowania dwóch rodzajów szczepionek przeciwkrztuścowych wiele antygenów nie zostało jeszcze zidentyfikowanych i nie do końca również wiadomo, które są kluczowe w aktywacji danego typu odpowiedzi immunologicznej. Trudność w prowadzonych badaniach sprawia zidentyfikowanie antygenów wywołujących odpowiedź immunologiczną i ustalenie czy działając niezależnie, czy w synergii z innym antygenem są w stanie zapewnić zadowalający poziom ochrony. Typ wywoływanej odpowiedzi jest główną cechą, odróżniającą szczepionki bezkomórkowe od komórkowych. W modelu badań przeprowadzonych na szympansach wykazano, że naturalne zakażenie oraz w mniejszym stopniu zaszczepienie DTwP indukuje odpowiedź typu Th17 oraz Th1, a zaszczepienie DTaP indukuje powstawanie limfocytów pomocniczych Th1 oraz Th2 [81]. Brak aktywacji komórek Th17 na błonach śluzowych nosogardła przez szczepionkę DTaP jest jej główną wadą. Na modelu zwierzęcym wykazano, że DTaP chroni przed rozwojem choroby, ale w przeciwieństwie do szczepionki pełnokomórkowej nie zapobiega transmisji i infekcji *B. pertussis* [82]. W wyniku zaszczepienia DTaP w górnych drogach oddechowych nie powstają rezydentne komórki pamięci (tissue-resident memory T cells, T_{RM}), które zachowują pamięć immunologiczną na powierzchni błon śluzowych i są w stanie jako pierwsze zareagować na zakażenie i zrekrutować komórki odpowiedzi wrodzonej i humoralnej [91].

Skład szczepionki DTaP jest ściśle zdefiniowany i zawiera 3–5 antygenów białkowych. Natomiast zawartość różnych antygenów *B. pertussis* w szczepionkach DTwP nie jest do końca określona i obejmuje ponad 3 000 antygenów, z czego więcej niż 20 może mieć właściwości ochronne [11]. W zależności od warunków hodowli lub / i od szczepu liczba oraz ilość poszczególnych antygenów może ulegać zmianom.

Uważa się, że możliwe odczyny poszczepienne pojawiające się po zaszczepieniu szczepionką DTwP były głównym czynnikiem, który zadecydował o zmianie szczepionki pełnokomórkowej na bezkomórkową w programach szczepień wielu krajów [93]. Najnowsze analizy wskazują na wiele innych czynników, które miały zasadniczy wpływ na podjęcie decyzji o tej zmianie. W badanych europejskich krajach (Dania, Szwecja, Francja, Wielka Brytania) były to czynniki, które można przypisać do 3 grup: naukowych, socjologicznych i pragmatycznych. W Wielkiej Brytanii głównym powodem zamiany DTwP na DTaP w programie szczepień, była nie obawa o skutki uboczne, ale epidemia *poliomyelitis*. Preparat szczepionki bezkomórkowej dodatkowo zawierał inaktywowane wirusy polio i to był decydujący argument o zmianie typu szczepionki przeciwkrztuścowej. We Francji głównym powodem były preferencje lekarzy w stosowaniu szczepionki DTaP i w konsekwencji względy pragmatyczne w utrzymaniu tylko jednej linii

produkcyjnej szczepionki. Polska jest jedynym krajem w Unii Europejskiej, który kontynuuje szczepienia podstawowe szczepionką pełnokomórkową DTwP [93]. Obowiązujący kalendarz szczepień przewiduje czterokrotne zaszczepienie dziecka szczepionką DTwP (w 2, 3–4, 5–6 i 16–18 miesiącu życia) oraz dawką przypominającą w 6 roku życia szczepionką DTaP. Szczepionki pełnokomórkowe DTwP stosowane są w krajach o niskim i średnim dochodzie. W 2018 roku GPI wydało rekomendacje, aby kraje te, nie zmieniały rodzaju szczepionki w programie szczepień noworodków, a dążyły do standaryzacji preparatów [22].

Pomimo powszechności szczepień przeciwkrztuścowych na całym świecie notuje się trend wzrostu zachorowań. Może to być wywołane kilkoma czynnikami. Pierwszym jest naturalnie zanikająca odporność. Z upływem czasu maleje ilość ochronnych przeciwciał, ale utrzymanie ich odpowiedniego poziomu może być kontrolowane poprzez szczepienia dawkami przypominającymi. Drugim powodem wzrostu zachorowań jest stosowanie szczepionek bezkomórkowych. Liczba antygenów stosowanych w szczepionkach DTaP została ograniczona do maksymalnie 5 białek. Co prawdopodobnie spowodowało wystąpienie mutacji w allelach genów kodujących antygeny (dryf antygenowy). Sekwencjonowanie genów kodujących PT, w różnych szczepach krążących na przestrzeni kilkudziesięciu lat ujawniło polimorfizm tych genów (*ptx1*, *ptx2*, *ptx3*) oraz polimorfizm w regionie promotora (*ptxP*), który obniża poziom ekspresji toksyny [50]. W efekcie wyewoluowały szczepy bakteryjne, które wytwarzają antygeny szczepionkowe w zmienionej formie lub w ogóle ich nie wytwarzają. Dotyczy to wszystkich antygenów szczepionkowych, ale najczęściej obserwowane są zmiany w ekspresji pertaktyny. Do tego stopnia, że szczepy niewytwarzające PRN dominują w niektórych krajach stosujących tylko szczepionkę bezkomórkową DTaP [56]. Podobne zmiany w wolniejszym tempie obserwuje się również w krajach, które stosują szczepionkę pełnokomórkową np. w Polsce [59].

5.2. Poszukiwania nowej szczepionki przeciwkrztuścowej

Obecnie stosowane szczepionki nie są jednak idealne. Globalnie dostępne bezkomórkowe szczepionki przeciwkrztuścowe nie zapewniają ochrony przeciwko *B. holmesii.* Pałeczki *B. holmesii* nie wytwarzają PT, FHA, PRN i FIM, które są antygenami szczepionkowymi obecnymi w szczepionce DTaP [64]. Poliklonalne przeciwciała indukowane szczepionką DTaP, rozpoznają tylko jeden nieokreślony antygen z niską efektywnością, a przeciwciała indukowane szczepionką pełnokomórkową DTwP rozpoznają jedynie antygeny o masie niższej niż 60 kDa [97]. Jedynym znanym wspólnym antygenem białkowym *B. holmesii* i *B. pertussis* jest białko BipA, którego sekwencja aminokwasowa wykazuje 59% homologii i 89% podobieństwa [64]. W badaniach na modelu mysim wykazano jego właściwości ochronne przeciwko infekcji *B. holmesii.* Jednak głównym problemem w zastosowaniu tego białka, jako antygenu szczepionkowego jest jego wysoka niestabilność [64]. Brak wspólnych antygenów białkowych *B. holmesii* oraz *B. pertussis* jest przyczyną braku efektywności rekomendowanej dla dorosłych szczepionki dTap (36%) [63].

Dane o antygenach ochronnych *Bordetellae* są skąpe i trudno ustalić, które są kluczowe, jako składniki szczepionek podjednostkowych. Podejmowane są próby zwiększenia skuteczności szczepionek bezkomórkowych poprzez uzupełnienie ich składu o dodatkowe antygeny białkowe jak cyklaza adenylowa i białko BrkA, które jednak pojedynczo nie indukują wytwarzania ochronnych przeciwciał. Jedynie w obecności pozostałych antygenów są w stanie zwiększyć efektywność szczepionki bezkomórkowej [10]. Efektywność zwiększana jest również poprzez dodanie adiuwantu. We wszystkich szczepionkach bezkomórkowych DTaP jako adiuwant stosowany jest wodorotlenek glinu lub jego sole. W szczepionkach pełnokomórkowych rolę dodatkowego adiuwantu pełni endotoksyna. Ze względu na dużą reaktogenność natywna pełna cząsteczka LPS nie może być stosowana jako adiuwant. Centrum toksyczności endotoksyny stanowi lipid A, który warunkuje aktywność biologiczną poprzez oddziaływanie z kompleksem receptorów dla LPS. Pochodna lipidu A, czyli monofosforylowany lipid A (MPL) charakteryzuje się znacznie mniejszą toksycznością i stosowany jest, jako adiuwant w szczepionkach przeciw HPV oraz WZW B [10].

Lipopolisacharyd jest integralnym składnikiem błony zewnętrznej. W wyniku immunizacji pełnymi komórkami bakteryjnymi produkowane są swoiste i często bakteriobójcze przeciwciała skierowane przeciwko LPS [60]. Dlatego LPS wydaje się być idealnym źródłem antygenów polisacharydowych. Szczepionki polisacharydowe rozwijane są od ponad 50 lat, ale ich główną wadą jest to, że sam polisacharyd jest antygenem T – niezależnym. Wywołana przez niego odpowiedź immunologiczna jest słaba i krótkotrwała. Zwiększenie immunogenności polisacharydu następuje po jego koniugacji z silnie immunogennym białkiem np. toksoidem tężcowym lub błoniczym. Powstały glikokoniugat nabiera cech antygenu T – zależnego [43]. Powszechnie stosuje się szczepionki skoniugowane, które zawierają polisacharydy otoczkowe *Streptococcus pneumoniae*, *Neiseria meningitidis* oraz *Haemophilus influenzae* typu b [85]. Oprócz lipidu A, który ze względu na toksyczność nie może zostać składnikiem szczepionki, drugim najbardziej stabilnym ewolucyjnie regionem LPS jest region oligosacharydu rdzenia.

Oligosacharyd (OS) *B. pertussis* jest nonasacharydem, który w zależności od szczepu może być podstawiony pojedynczą podjednostką. OS z przyłączonym dystalnym trójcukrem jest dodekasacharydem [9]. Struktury OS rdzenia innych bakterii z rodzaju *Bordetella* oraz pałeczki *B. holmesii* wykazują duże podobieństwo [75], dlatego OS i jego pochodne wydają się być odpowiednimi kandydatami na antygeny szczepionkowe. Glikokoniugaty OS z toksoidem tężcowym indukują powstawanie specyficznych przeciwciał, rozpoznających epitopy LPS na powierzchni komórek bakteryjnych [43]. Metodą deaminacji z lipooligosacharydu *B. pertussis* 186 wyizolowano pentasacharydowy fragment zawierający dystalny trójcukier, który ze względu na immunodominujący charakter jest istotnym elementem glikokoniugatu [52]. Glikokoniugaty pentasacharyd-PT i OS-PT, w których jako białko nośnikowe zastosowano toksynę krztuścową, indukują powstawanie przeciwciał o właściwościach bakteriobójczych [39]. W Instytucie Butantan (Brazylia) opracowana została alternatywna szczepionka pełnokomórkowa „wPlow". W wyniku chemicznego procesu ze szczepionki DTwP usunięto LPS, który jest najbardziej reaktogennym antygenem. Względy ekonomiczne były głównym motywatorem modyfikacji szczepionki DTwP, w kierunku mniejszej reaktogenności. Koszt wyprodukowania szczepionki DTaP jest ponad 300-krotnie wyższy niż szczepionki DTwP [14]. W pierwszej fazie badań klinicznych udało się obniżyć reaktogenność przy zachowaniu podobnego poziomu immunogenności i ochrony poszczepiennej w porównaniu ze standardowo stosowaną szczepionką DTwP [15]. Szczepionka „wPlow" musi przejść dodatkowe badania kliniczne przed wprowadzeniem do kalendarza szczepień, ale wiele wskazuje na to, że w Brazylii zastąpi szczepionkę DTwP. Dodatkową korzyścią jest wyprodukowanie, w trakcie procesu pozbawiania *B. pertussis* LPS, silnego szczepionkowego adiuwantu – MPL [61].

Zespół prof. Lochta opracował szczepionkę BPZE1, która naśladuje naturalne zakażenie pałeczkami *B. pertussis*. Wybrany szczep bakteryjny został genetycznie zmodyfikowany. Modyfikacjom zostały poddane geny kodujące toksyny. W efekcie tych modyfikacji *B. pertussis* nie wytwarza toksyny dermonekrotycznej, obniżono poziom produkcji cytotoksyny tchawiczej, a główny antygen, czyli toksyna krztuścowa jest nieaktywna. Zmieniona została również metoda podania szczepionki na donosową, aby imitować sposób rozprzestrzeniania się pałeczki krztuśca. W szczepionce BPZE1 bakterie zostały atenuowane [48]. W badaniach przeprowadzonych na szympansach wykazano wysoką skuteczność szczepionki BPZE1, która chroniła przed infekcją i kolonizacją górnych dróg oddechowych oraz przed rozwojem krztuśca [42]. W połowie 2020 roku zakończona została druga faza badań klinicznych. Jedna dawka szczepionki BPZE1 indukuje odpowiedź typu Th1, podobnie jak szczepionka pełnokomórkowa. W porównaniu ze szczepionką bezkomórkową wywołuje powstawanie przeciwciał o szerszym zakresie działania [40]. Obecnie trwają prace nad otrzymaniem stabilnego preparatu w formie liofilizatu aby można było dopuścić szczepionkę do dalszych badań i komercjalizacji [73].

Nowością jest również projekt szczepionki bezkomórkowej podawanej donosowo opartej o pęcherzyki zewnątrzbłonowe (outer membrane vesicles, OMVs) wydzielane przez *B. pertussis*. Pęcherzyki zawierają większość powierzchniowych antygenów wytwarzanych przez pałeczkę krztuśca w ich natywnej formie. Zapewniają podobny poziom ochrony jak szczepionki pełnokomórkowe [62]. Szczepionka OMV w przeciwieństwie do bezkomórkowej szczepionki DTaP zapobiega kolonizacji bakterii w płucach i jest skuteczna nawet dla szczepów nie wytwarzających pertaktyny [99].

6. Podsumowanie

Pod koniec lat 90. XX wieku WHO zakwalifikowała krztusiec, jako jedną z nawracających chorób o potencjale epidemiologicznym [89]. Przejście ze szczepionek pełnokomórkowych na bezkomórkowe w podstawowym schemacie szczepień niemowląt jest coraz częściej uważane za najbardziej prawdopodobne wyjaśnienie nawrotu krztuśca. Żadna ze szczepionek nie wywołuje tak silnej, długotrwałej ochrony jak naturalna infekcja, przy czym odporność zależna od szczepionek aP zanika znacznie szybciej. Co więcej, szczepionki bezkomórkowe nie zapobiegają kolonizacji górnych dróg oddechowych, ułatwiając tym samym przenoszenie pałeczek *B. pertussis* przez bezobjawowych nosicieli w populacjach w pełni zaszczepionych.

Obecna definicja krztuśca różni się od definicji sprzed kilkudziesięciu lat. Nowoczesne metody badawcze pozwoliły zidentyfikować gatunki, wywołujące chorobę o identycznych objawach, ale o mniejszym nasileniu, przez co mogą być trudniejsze w rozpoznaniu. Za zdecydowaną większość zdiagnozowanych przypadków krztuśca odpowiada *B. pertussis*. Coraz częściej jednak krztusiec wywoływany jest przez pałeczki *B. holmesii*. Z bakterii wywołującej początkowo jedynie zakażenia u pacjentów immunosupresyjnych, szybko została drugą, pod względem częstości diagnozowania, bakterią wywołującą krztusiec [49, 54, 63, 76].

Zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw zanikającej odporności i niewystarczającej ochrony przed zakażeniem/przenoszeniem, zarówno na poziomie błony śluzowej, jak i na poziomie ogólnoustrojowym, wpływa na testowanie nowych, skutecznych strategii immunizacji. Próby wprowadzenia nowych szczepionek przeciwkrztuścowych, świadczą o tym, że istnieje potrzeba stworzenia nowej szczepionki, która

indukowałaby skuteczną i długotrwałą odporność. Idealna szczepionka przeciwkrztuścowa byłaby podawana w okresie niemowlęcym, jako jedna dawka donosowo, aby naśladować naturalne zakażenie. Nowa szczepionka wywoływałaby silną, szeroką i trwałą odporność śluzówkową i ogólnoustrojową. Indukowałaby powstawanie specyficznych dla krztuśca przeciwciał sIgA(/IgG) wraz z rezydentnymi komórkami pamięci. W ten sposób zapewniona zostałaby ochrona przed zapaleniem płuc, jak również kolonizacją nosogardła i późniejszą transmisją.

Na całym świecie, przez różne zespoły badawcze, podejmowane są próby zaprojektowania nowych szczepionek przeciwkrztuścowych z nadzieją, że może tym razem uda się wyprzedzić krztusiec w tym wyścigu i przezwyciężyć efekt Czerwonej Królowej.

Piśmiennictwo

1. Anderson R.M., May R.M.: Immunisation and herd immunity. *Lancet*, **335**, 641–645 (1990)
2. Aricò B., Rappuoli R.: *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J. Bacteriol.* **169**, 2847–2853 (1987)
3. Aslanabadi A., Ghabili K., Shad K., Khalili M., Sajadi M.M. Emergence of whooping cough: notes from three early epidemics in Persia. *Lancet Infect. Dis.* **15**, 1480–1484 (2015)
4. Austin B.: The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria (w) The Family Alcaligenaceae, red. E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt i F. Thompson, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014, s. 729–757
5. Bart M.J., Mooi F.R. i wsp.: Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *MBio*, **5**, e01074 (2014)
6. Bergfors E., Trollfors B., Taranger J., Lagergård T., Sundh V., Zackrisson G.: Parapertussis and pertussis: Differences and similarities in incidence, clinical course, and antibody responses. *Int. J. Infect. Dis.* **3**, 140–146 (1999)
7. Blennow M., Granström M.: Adverse reactions and serologic response to a booster dose of acellular pertussis vaccine in children immunized with acellular or whole-cell vaccine as infants. *Pediatrics*, **84**, 62–67 (1989)
8. Bordet J., Gengou O.: Le microbe de la coqueluche. 'Ann Inst Pasteur', s. 731–741. (Institut Pasteur: Paris) http://archive.org/details/bulletindelinst00pastgoog (1906)
9. Caroff M., Brisson J., Martin A., Karibian D.: Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *FEBS Lett*. **477**, 8–14 (2000)
10. Chasaide C.N., Mills K.H.G.: Next-generation pertussis vaccines based on the induction of protective T cells in the respiratory tract. *Vaccines*, **8**, 621 (2020)
11. Cherry J.D. The 112-year odyssey of pertussis and pertussis vaccines-mistakes made and implications for the future. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc*. **8**, 334–341 (2019)
12. Cherry J.D., Tan T., Wirsing von König C.-H., Forsyth K.D., Thisyakorn U., Greenberg D., Johnson D., Marchant C., Plotkin S.: Clinical definitions of pertussis: summary of a global pertussis initiative roundtable meeting, February 2011. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 1756–1764 (2012)
13. Decker M.D., Edwards K.M., Steinhoff M.C., Rennels M.B., Pichichero M.E., Englund J.A., Anderson E.L., Deloria M.A., Reed G.F.: Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: adverse reactions. *Pediatrics*, **96**, 557–566 (1995)
14. Dias W.O., Raw I. i wsp.: An improved whole cell pertussis vaccine with reduced content of endotoxin. *Hum. Vaccin. Immunother*. **9**, 339–348 (2013)
15. Dias W.O., Prestes A.F.R.O., Cunegundes P., Silva E.P., Raw I. Immunization against Pertussis: An almost solved problem or a headache in public health. *Vaccines*, doi:10.5772/intechopen.69283 (2017)
16. Diavatopoulos D.A., Cummings C.A., van der Heide H.G.J., van Gent M., Liew S., Relman D.A., Mooi F.R.: Characterization of a highly conserved island in the otherwise divergent *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis* Genomes. *J. Bacteriol.* **188**, 8385–8394 (2006)
17. Dieckmann U., Marrow P., Law R.: Evolutionary cycling in predator-prey interactions: population dynamics and the red queen. *J. Theor. Biol.* **176**, 91–102 (1995)
18. Dworkin M.S., Sullivan P.S., Buskin S.E., Harrington R.D., Olliffe J., MacArthur R.D., Lopez C.E.: *Bordetella bronchiseptica* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin. Infect. Dis.* **28**, 1095–1099 (1999)
19. ECDC (2020). Pertussis – Annual Epidemiological Report for 2018. European Centre for Disease Prevention and Control, (Stockholm) https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/pertussis-annual-epidemiological-report-2018
20. Eriksson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G., Mohn W.W.: Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 275–284 (2003)
21. Fine P.E., Clarkson J.A.: Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev. Infect. Dis.* **9**, 866–883 (1987)
22. Forsyth K.D., Tan T., von König C.-H. W., Heininger U., Chitkara A.J., Plotkin S.: Recommendations to control pertussis prioritized relative to economies: A Global Pertussis Initiative update. *Vaccine*, **36**, 7270–7275 (2018)
23. Fry N.K., Duncan J., Malnick H., Warner M., Smith A.J., Jackson M.S., Ayoub A.: *Bordetella petrii* clinical isolate. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1131–1133 (2005)
24. Fulton T.R., Phadke V.K., Orenstein W.A., Hinman A.R., Johnson W.D., Omer S.B.: Protective effect of contemporary pertussis vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **62**, 1100–1110 (2016)
25. Glare E.M., Paton J.C., Premier R.R., Lawrence A.J., Nisbet I.T.: Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1982–1987 (1990)
26. Goodnow R.A.: Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Rev.* **44**, 722–738 (1980)
27. Guiso N.: *Bordetella pertussis* (w) Molecular Medical Microbiology (wyd. 2.) red. Y-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton i J. Schwartzman, s. 1507–1527, Academic Press: Boston, 2015
28. Guthrie J.L., Robertson A.V., Tang P., Jamieson F., Drews S.J.: Novel duplex real-time pcr assay detects *Bordetella holmesii* in specimens from patients with pertussis-like symptoms in Ontario, Canada. *J. Clin. Microbiol*. **48**, 1435–1437 (2010)
29. Hamidou Soumana I., Linz B., Harvill E.T.: Environmental origin of the genus *Bordetella*. *Front. Microbiol.* **8**, 28 (2017)
30. Harvill E.T., Goodfield L.L., Ivanov Y., Smallridge WE., Meyer J.A., Cassiday P.K., Tondella M.L., Brinkac L., Sanka R., Kim M., Losada L.: Genome sequences of nine *Bordetella holmesii* strains isolated in the United States. *Genome Announc*. **2**, doi:10.1128/genomeA.00438-14 (2014)
31. Heininger U.: Update on pertussis in children. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther*. **8**, 163–173 (2010)

32. Ibsen P., Møller S., Heron I.: Lipopolysaccharides in a traditional pertussis vaccine. *J. Biol. Stand.* **16**, 299–309 (1988)
33. Ivanov Y.V., Harvill E.T. i wsp. Identification and taxonomic characterization of *Bordetella pseudohinzii* sp. nov. isolated from laboratory-raised mice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 5452–5459 (2016)
34. Jefferson T., Rudin M., Di Pietrantonj C.: Adverse events after immunisation with aluminium-containing DTP vaccines: systematic review of the evidence. *Lancet Infect. Dis.* **4**, 84–90 (2004)
35. Kamiya H., Okabe N. i wsp.: Transmission of *Bordetella holmesii* during pertussis outbreak, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 1166–1169 (2012)
36. Kersters K., Hinz K.-H., Hertle A., Segers P., Lievens A., Siegmann O., De Ley J.: *Bordetella avium* sp. nov., isolated from the respiratory tracts of turkeys and other birds. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **34**, 56–70 (1984)
37. Klein N.P., Bartlett J., Fireman B., Baxter R.: Waning Tdap effectiveness in adolescents. *Pediatrics*, **137**, e20153326 (2016)
38. Ko K.S., Peck K.R., Oh WS., Lee N.Y., Lee J.H., Song J.-H.: New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2516–2519 (2005)
39. Koj S., Ługowski C., Niedziela T.: *Bordetella pertussis* lipooligosaccharide-derived neoglycoconjugates – new components of pertussis vaccine. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **69**, 1013–1030 (2015)
40. Lin A., Loré K. i wsp.: Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 induces a broad antibody response in humans. *J. Clin. Invest.* **130,** 2332–2346 (2020)
41. Linz B., Harvill E.T. i wsp.: Acquisition and loss of virulence--associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species. *BMC Genomics*, **17**, 1–17 (2016)
42. Locht C., Papin J.F., Lecher S., Debrie A.-S., Thalen M., Solovay K., Rubin K., Mielcarek N.: Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *Bordetella pertussis* disease and infection. *J. Infect. Dis.* **216**, 117–124 (2017)
43. Lugowski C., Niedziela T., Jachymek W.: Anti-endotoxin antibodies directed against *Escherichia coli* R-1 oligosaccharide core-tetanus toxoid conjugate bind to smooth, live bacteria and smooth lipopolysaccharides and attenuate their tumor necrosis factor stimulating activity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **16**, 31–38 (1996)
44. Lund S.J., Rowe H.A., Parton R., Donachie W.: Adherence of ovine and human *Bordetella parapertussis* to continuous cell lines and ovine tracheal organ culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **194**, 197–200 (2001)
45. Martini H., Detemmerman L., Soetens O., Yusuf E., Piérard D.: Improving specificity of *Bordetella pertussis* detection using a four target real-time PCR. *PLoS ONE*, **12**, e0175587 (2017)
46. Mazengia E., Silva E.A., Peppe J.A., Timperi R., George H.: Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms: use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2330–2333 (2000)
47. McGirr A., Fisman D.N.: Duration of pertussis immunity after DTaP immunization: a meta-analysis. *Pediatrics*, **135**, 331–343 (2015)
48. Mielcarek N., Debrie A.-S., Raze D., Bertout J., Rouanet C., Younes A.B., Creusy C., Engle J., Goldman W.E., Locht C.: Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog.* **2**, e65 (2006)
49. Mir-Cros A., González-López J.J. i wsp.: Emergence of *Bordetella holmesii* as a causative agent of whooping cough, Barcelona, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **23**, 1856–1859 (2017)
50. Mooi F.R., Mertsola J. i wsp.: *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1206–1213 (2009)
51. Ner Z., Ross L.A., Horn M.V., Keens T.G., MacLaughlin E.F., Starnes V.A., Woo M.S.: *Bordetella bronchiseptica* infection in pediatric lung transplant recipients. *Pediatr. Transplant.* **7**, 413–417 (2003)
52. Niedziela T., Letowska I., Lukasiewicz J., Kaszowska M., Czarnecka A., Kenne L., Lugowski C.: Epitope of the vaccine-type *Bordetella pertussis* strain 186 lipooligosaccharide and antiendotoxin activity of antibodies directed against the terminal pentasaccharide-tetanus toxoid conjugate. *Infect. Immun.* **73**, 7381–7389 (2005)
53. Nisola G.M., Tuuguu E., Farnazo D.M.D., Han M., Kim Y., Cho E., Chung W.-J.: Hydrogen sulfide degradation characteristics of *Bordetella* sp. Sulf-8 in a biotrickling filter. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **33**, 1131–1138 (2010)
54. Njamkepo E., Bonacorsi S., Debruyne M., Gibaud S.A., Guillot S., Guiso N.: Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 4347–4348 (2011)
55. Odanaka K., Iwatsuki M., Satho T., Watanabe M.: Identification and characterization of a brilliant yellow pigment produced by *Bordetella pertussis*. *Microbiol. Immunol.* **61**, 490–496 (2017)
56. Pawloski L.C., Tondella M.L. i wsp.: Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin. Vaccine Immunol.* **21**, 119–125 (2014)
57. Pittet L.F., Emonet S., François P., Bonetti E.-J., Schrenzel J., Hug M., Altwegg M., Siegrist C.-A., Posfay-Barbe K.M.: Diagnosis of whooping cough in Switzerland: differentiating *Bordetella pertussis* from *Bordetella holmesii* by polymerase chain reaction. *PLoS ONE*, **9**, e88936 (2014)
58. Pittet L.F., Posfay-Barbe K.M.: *Bordetella holmesii* infection: current knowledge and a vision for future research. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **13**, 965–971 (2015)
59. Polak M., Zasada A.A., Mosiej E., Krysztopa-Grzybowska K., Witkowski L., Rzeczkowska M., Piekarska K., Lutyńska A.: Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in Poland-a country with whole-cell pertussis primary vaccination. *Microbes and Infection*, doi:10.1016/j.micinf.2018.12.001 (2018)
60. Rappuoli R.: From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nature Med.* **10**, 1177–1185 (2004)
61. Raw I.: Developing countries can innovate and produce vaccines: the case of Butantan in Brazil. Vaccines – the History and Future, doi:10.5772/intechopen.83351 (2019)
62. Roberts R., Moreno G., Bottero D., Gaillard M.E., Fingermann M., Graieb A., Rumbo M., Hozbor D.: Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine*, **26**, 4639–4646 (2008)
63. Rodgers L., Diorio M. i wsp.: Epidemiologic and laboratory features of a large outbreak of pertussis-like illnesses associated with cocirculating *Bordetella holmesii* and *Bordetella pertussis*--Ohio, 2010–2011. *Clin. Infect. Dis.* **56**, 322–331 (2013)
64. Saito M., Odanaka K., Otsuka N., Kamachi K., Watanabe M.: Development of vaccines against pertussis caused by *Bordetella holmesii* using a mouse intranasal challenge model. *Microbiol. Immunol.* **60**, 599–608 (2016)
65. Scheifele D.W., Halperin S.A., Ferguson A.C.: Assessment of injection site reactions to an acellular pertussis-based combination vaccine, including novel use of skin tests with vaccine antigens. *Vaccine*, **19**, 4720–4726 (2001)
66. Shepard C.W., Daneshvar M.I., Kaiser R.M., Ashford D.A., Lonsway D., Patel J.B., Morey R.E., Jordan J.G., Weyant R.S., Fischer M.: *Bordetella holmesii* bacteremia: a newly recognized clinical entity among asplenic patients. *Clin. Infect. Dis.* **38**, 799–804 (2004)
67. Spilker T., Liwienski A.A., LiPuma J.J.: Identification of *Bordetella* spp. in respiratory specimens from individuals with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 504–506 (2008)

68. Stark D., Riley L.A., Harkness J., Marriott D.: *Bordetella petrii* from a clinical sample in Australia: isolation and molecular identification. *J. Med. Microbiol.* **56**, 435–437 (2007)
69. Szvalb A.D., Rolston K.V., Mori N., Tarrand J.J., Mulanovich V.E.: Infections with the agent of 'kennel cough' in patients with cancer. *J. Infect.* doi:10.1016/j.jinf.2018.07.010 (2018)
70. Tatti K.M., Sparks K.N., Boney K.O., Tondella M.L.: Novel multitarget real-time PCR assay for rapid detection of *Bordetella* species in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 4059–4066 (2011)
71. Tatti K.M., Wu K.-H., Tondella M.L., Cassiday P.K., Cortese M.M., Wilkins P.P., Sanden G.N.: Development and evaluation of dual--target real-time polymerase chain reaction assays to detect *Bordetella* spp. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **61**, 264–272 (2008)
72. Tazato N., Handa Y., Nishijima M., Kigawa R., Sano C., Sugiyama J.: Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: *Bordetella* muralis sp. nov., *Bordetella* tumulicola sp. nov. and *Bordetella* tumbae sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 4830–4838 (2015)
73. Thalen M., Debrie A.-S., Coutte L., Raze D., Solovay K., Rubin K., Mielcarek N., Locht C.: Manufacture of a stable lyophilized formulation of the live attenuated pertussis vaccine BPZE1. *Vaccines*, **8**, doi:10.3390/vaccines8030523 (2020)
74. Tizolova A., Guiso N., Guillot S.: Insertion sequences shared by *Bordetella* species and implications for the biological diagnosis of pertussis syndrome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **32**, 89–96 (2013)
75. Ucieklak K., Koj S., Niedziela T.: *Bordetella holmesii* lipopolysaccharide hide and seek game with pertussis: structural analysis of the O-Specific polysaccharide and the core oligosaccharide of the type strain ATCC 51541. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020)
76. Valero-Rello A., Henares D., Acosta L., Jane M., Jordan I., Godoy P., Muñoz-Almagro C.: Validation and implementation of a diagnostic algorithm for DNA detection of *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. holmesii* in a pediatric referral hospital in Barcelona, Spain. *J. Clin. Microbiol.* **57**, doi:10.1128/JCM.01231-18 (2019)
77. Vandamme P., Heyndrickx M., Vancanneyt M., Hoste B., De Vos P., Falsen E., Kersters K., Hinz K.H.: *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rüger and Tan 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 849–858 (1996)
78. Vandamme P., Hommez J., Vancanneyt M., Monsieurs M., Hoste B., Cookson B., Wirsing von König C.H., Kersters K., Blackall P.J.: *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 37–45 (1995)
79. Vandamme P. A., Peeters C., Cnockaert M., Inganäs E., Falsen E., Moore E.R. B., Nunes O.C., Manaia C.M., Spilker T., LiPuma J.J.: *Bordetella bronchialis* sp. nov., *Bordetella flabilis* sp. nov. and *Bordetella sputigena* sp. nov., isolated from human respiratory specimens, and reclassification of *Achromobacter sediminum* Zhang et al. 2014 as *Verticia sediminum* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 3674–3682 (2015)
80. Wang F., Grundmann S., Schmid M., Dörfler U., Roherer S., Charles Munch J., Hartmann A., Jiang X., Schroll R.: Isolation and characterization of 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil. *Chemosphere*, **67**, 896–902 (2007)
81. Warfel J.M., Merkel T.J.: *Bordetella pertussis* infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunol.* **6**, 787–796 (2013)
82. Warfel J.M., Zimmerman L.I., Merkel T.J.: Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **111**, 787–792 (2014)
83. Wei S.-H., Chao Y.-N., Huang S.-E., Lee T.-F., and Chang L.-Y.: Adverse effects of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid, and acellular pertussis vaccine in 6- to 7-year-old children. *Pediatr. Neonatol.* **52**, 38–41 (2011)
84. Weiss A.: The Genus *Bordetella*. (w) The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses, red. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K-H. Schleifer i E. Stackebrandt, Springer New York: New York, NY, 2006, s. 648–674
85. Wen Z., and Zhang J.-R.: Bacterial Capsules (w) Molecular Medical Microbiology (wyd. 2.), red. Y-W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton, J. Schwartzman, Academic Press: Boston, 2015, s. 33–53
86. Wendelboe A.M., Van Rie A., Salmaso S., Englund J.A.: Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **24**, 58–61 (2005)
87. Weyant R.S., Hollis D.G., Weaver R.E., Amin M.F., Steigerwalt A.G., O'Connor S.P., Whitney A.M., Daneshvar M.I., Moss C.W., Brenner D.J.: *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 1–7 (1995)
88. WHO. Laboratory Manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis*: update 2014. World Health Organization, Technical documents WHO/IVB/14.03. http://apps.who.int/iris/handle/10665/127891 (2014)
89. WHO. 'The immunological basis for immunization series: module 4: pertussis.' (World Health Organization) http://apps.who.int/iris/handle/10665/259388 (2017)
90. WHO. Pertussis Overview. Pertussis. https://www.who.int/westernpacific/health-topics/pertussis (2021)
91. Wilk M.M., Borkner L., Misiak A., Curham L., Allen A.C., Mills K.H.G. Immunization with whole cell but not acellular pertussis vaccines primes CD4 TRM cells that sustain protective immunity against nasal colonization with *Bordetella pertussis*. *Emerg. Microbes Infect.* **8**, 169–185 (2019)
92. von Wintzingerode F., Schattke A., Siddiqui R.A., Rösick U., Göbel U.B., Gross R.: *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1257–1265 (2001)
93. Wong A., Opinel A., Combes S. J.-B., Toubiana J., Brisse S.: Determining factors for pertussis vaccination policy: a study in five EU countries. *Vaccines*, **8**, 46 (2020)
94. Woolfrey B.F., Moody J.A.: Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 243–255 (1991)
95. Yih W.K., Silva E.A., Ida J., Harrington N., Lett S.M., George H.: *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg. Infect. Dis.* **5**, 441–443 (1999)
96. van der Zee A., Groenendijk H., Peeters M., Mooi F.R.: The differentiation of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* from humans and animals as determined by DNA polymorphism mediated by two different insertion sequence elements suggests their phylogenetic relationship. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 640–647 (1996)
97. Zhang X., Weyrich L.S., Lavine J.S., Karanikas A.T., Harvill E.T.: Lack of cross-protection against *Bordetella holmesii* after pertussis vaccination. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 1771–1779 (2012)
98. Zintgraff J., Irazu L., Lara C.S., Rodriguez M., Santos M.: The classical *Bordetella* species and MALDI-TOF technology: a brief experience. *J. Med. Microbiol.* **67**, 1737–1742 (2018)
99. Zurita M.E., Wilk M.M., Carriquiriborde F., Bartel E., Moreno G., Misiak A., Mills K.H.G., Hozbor D.A.: Pertussis outer membrane vesicle-based vaccine induces lung-resident memory CD4 t cells and protection against *Bordetella pertussis*, including pertactin deficient strains. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9** (2019)

O D R E D A K C J I

Szanowni Czytelnicy,

Z dużym smutkiem zawiadamiamy P.T. Czytelników o stwierdzeniu znamiona plagiatu wśród kolejnych publikacji, wydanych przez nasz kwartalnik.

Wszystkie siedem prac zespołu Autorów związanych z pracami zgłoszonymi w poprzednim zeszycie *Postępów Mikrobiologii* zostały dokładnie przeanalizowane przez Redakcję, Prezesa PTM, niezależnego Recenzenta oraz Specjalistę w dziedzinie patologii w nauce. Wyniki analiz niestety w większości przypadków świadczą o bardzo dużym podobieństwie do publikacji wydanych wcześniej przez inne czasopisma, wskazującym na niedozwolone przejęcie z innych publikacji koncepcji pracy, układu treści i rozległych fragmentów tekstu.

Umożliwiliśmy Autorom ustosunkowanie się do decyzji Redakcji, większość Autorów skorzystała z tej możliwości. W niektórych przypadkach Redakcja zgodziła się z uwagami Autorów, dwie z siedmiu publikacji pozostawiamy w naszych zbiorach. Niestety aż pięć prac kierujemy do retrakcji. W bieżącym zeszycie, na kolejnej stronie naszego kwartalnika, publikujemy notę retrakcyjną w której przedstawiamy listę prac, które ulegają retrakcji wraz z uzasadnieniem.

Na kolejnych stronach, w dziale LISTY DO REDAKCJI, publikujemy oświadczenia Autorów w tej sprawie.

z wyrazami szacunku,
Redakcja

N O T A R E T R A K C Y J N A

1. Sebastian Gnat, Aneta Nowakiewicz, Przemysław Zięba: Taksonomia dermatofitów – systemy klasyfikacyjne się zmieniają, problemy identyfikacyjne pozostają te same. *Postępy Mikrobiologii*, 2019, **58**, 1, 49–58. DOI: 10.21307/PM-2019.58.1.049
   Redakcja wycofuje wyżej wymienioną pracę ze względu na fakt, że treść publikacji S. Gant i wsp. jest w zdecydowanej większości tożsama z wcześniejszą pracą, która ukazała się w czasopiśmie *Mycopathologia*:
   de Hoog, G.S., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., ... & Gräser, Y. (2017). Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, *182* (1), 5–31.

2. Sebastian Gnat, Dominik Łagowski, Aneta Nowakiewicz, Mariusz Dyląg: Molekularne metody diagnostyki dermatomykoz – przegląd dostępnych technik oraz ocena ich zalet i wad w implementacji do rutynowego stosowania. *Postępy Mikrobiologii,* 2019, **58**, 4, 483–494. DOI: 10.21307/PM-2019.58.4.483
   Redakcja dokonuje retrakcji powyższej pracy ze zwględu na rozległe podobieństwo do opublikowanej wcześniej pracy w czasopiśmie *Mycopathologia*:
   Verrier, J., & Monod, M. (2017). Diagnosis of dermatophytosis using molecular biology. *Mycopathologia*, *182* (1), 193–202.

3. Dominik Łagowski, Sebastian Gnat, Aneta Nowakiewicz: Mechanizmy powstawania oporności dermatofitów na substancje przeciwgrzybicze. *Postępy Mikrobiologii*, 2020, **59**, 2, 153–165. DOI: 10.21307/PM-2020.59.2.012
   Powyższa praca ulega retrakcji z powodu powtórzenia większości informacji i treści zawartych we wcześniejszym artykule opublikowanym we *Frontiers in Microbiology*:
   Martinez-Rossi, N.M., Bitencourt, T.A., Peres, N.T., Lang, E.A., Gomes, E.V., Quaresemin, N.R.I wsp. oraz Rossi, A. (2018). Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1108.

4. Sebastian Gnat, Dominik Łagowski, Aneta Nowakiewicz: Zastosowanie techniki MALDI-TOF MS do identyfikacji dermatofitów. *Postępy Mikrobiologii,* 2020, **59**, 3, 315–324. DOI: 10.21307/PM-2020.59.3.23
   Praca zespołu S. Gnat i wsp. zawiera rozległe fragmenty tekstu tożsame z treścią wcześniejszej publikacji, która ukazała się w periodyku *Mycopathologia*:
   L'Ollivier, C., & Ranque, S. (2017). MALDI-TOF-based dermatophyte identification. *Mycopathologia*, *182* (1), 183–192.

5. Sebastian Gnat, Dominik Łagowski, Mariusz Dyląg, Aneta Nowakiewicz: Ludzki mykobiom w stanach normobiozy i dysbiozy – charakterystyka i metody analizy. *Postępy Mikrobiologii*, 2021, **60**, 1, 31–46. DOI: 10.21307/PM-2021.60.1.04
   Przedstawiona publikacja jest praktycznie tożsama z poniżej wymienioną pracą, wydaną przez czasopismo *Mycopathologia*:
   Tiew, P. Y., Mac Aogain, M., Ali, N., Thng, K. X., Goh, K., Lau, K. J., & Chotirmall, S. H. (2020). The mycobiome in health and disease: emerging concepts, methodologies and challenges. *Mycopathologia*, *185* (2), 207–231.

Wrocław, 11. sierpnia 2022 r.

Szanowna Redakcjo,

W odpowiedzi na otrzymane w dniu 03.08.2022 roku drogą e-mailową zawiadomienie o wykryciu praktyk plagiatowych w pracach poglądowych opublikowanych w czasopiśmie Postępy Mikrobiologii o następujących danych bibliograficznych: 2019.58.4.; 2020.59.1. i 2021.60.1 kieruję do Redakcji Postępów Mikrobiologii (PM) niniejszy list zawierający obszerne wyjaśnienie. Ufam, że zamieszczenie niniejszego Listu do Redakcji w najbliższym numerze Postępów Mikrobiologii pozwoli dostrzec nawet nieznającym sprawy czytelnikom, że moja osoba nie miała nic wspólnego z wykrytymi w tych pracach nadużyciami, co więcej z racji podjętego współautorstwa stałem się mimowolnie ofiarą ujawnionego procederu. Z pełną odpowiedzialnością oświadczam, że w każdej z wymienionych wyżej trzech publikacji moja rola ograniczała się wyłącznie do korekty i edycji nadsyłanych przez pierwszego (głównego) i zarazem korespondencyjnego autora kompletnych pierwszych wersji manuskryptów. Wspomniane już prace poglądowe opublikowane w zeszytach PM o numerach: 2019.58.4., 2020.59.1. i 2021.60.1 w pierwszej wersji (pierwotne maszynopisy) otrzymałem odpowiednio: 14.06.2019 r., 25.09.2019 r. i 27.07.2020 r. Każdorazowo, po wprowadzeniu niezbędnej (w moim przekonaniu) korekty językowej, sprawdzeniu pracy pod kątem stosowanej terminologii i wartości merytorycznej prezentowanych zagadnień oraz opatrzeniu tekstu pracy stosownymi komentarzami odsyłałem manuskrypty głównemu autorowi, który odpowiadał za ich finalny kształt i kontakty z Redakcją PM. Manuskrypty opublikowane w wymienionych wyżej zeszytach PM odesłałem wspomnianemu już autorowi korespondencyjnemu odpowiednio w dniach: 19.06.2019 r., 27.09.2019 r. i 26.08.2020 r. Dla zapewnienia pełnej transparentności wyjaśnień odnoszących się do mojej roli w powstaniu wspomnianych trzech publikacji do wiadomości Redakcji PM załączyłem oryginalne maszynopisy przesłane mi przez głównego autora oraz wersje manuskryptów po wprowadzonej przeze mnie korekcie. Pragnę zauważyć, że każdy z załączonych plików (wersji pracy) został dokładnie opisany tj. został opatrzony numerem zeszytu PM, datą i godziną wpływu manuskryptu na moją skrzynkę e-mailową oraz datą odesłania pracy po korekcie do autora korespondencyjnego. Z uwagi na fakt, że nad każdym z trzech manuskryptów pracowałem w trybie śledzenia zmian, w odsyłanych pracach, nietrudno zauważyć jakie konkretnie zmiany w pracy stanowią o moim udziale i wartości dodanej. Ilość i jakość wprowadzonych przeze mnie poprawek świadczą o moim zaangażowaniu i dbałości o ostateczny kształt każdej z nadsyłanych prac. Już sam ten fakt świadczy o tym, że byłem głęboko przekonany, że pracuję nad edycją oryginalnych manuskryptów pisanych na wysokim jakościowo poziomie. Osobiście jestem głęboko przekonany, że poddanie analizie z wykorzystaniem tego samego programu anty-plagiatowego iThenticate obydwu wersji manuskryptów (przed i po moich korektach) pozwoli jednoznacznie wykazać, że przeprowadzona przeze mnie edycja tekstu nie zawyżyła, a jedynie mogła obniżyć wartości współczynników podobieństwa wskazujących na znamiona plagiatu. Ufam, że dostarczony przeze mnie Redakcji materiał dowodowy oraz złożone obszerne i konkretne wyjaśnienia są wystarczające, pozwolą dostrzec mój rzeczywisty udział w powstaniu tych prac oraz będą stanowić podstawę do oczyszczenia mojej osoby z zarzutu udziału w rzekomych praktykach plagiatowych. Wyrażam też nadzieję, że osoba(y) odpowiedzialne za ujawnione nadużycia wykażą się odpowiedzialnością cywilną i uczciwością wobec pozostałych osób, które tak jak ja pracowały rzetelnie i w dobrej wierze nad przesyłanymi pierwszymi wersjami manuskryptów. Transparentność i rzetelność w pracy naukowej jest wartością nadrzędną, dlatego też każdemu badaczowi uczciwie pracującemu na swój dorobek naukowy powinno zależeć na dogłębnym wyjaśnieniu tego typu spraw godzących w jego dobre imię.

Niestety, w trakcie pracy nad otrzymanymi wersjami maszynopisów, nie zwróciłem uwagi na aktualnie ujawniony przez Redakcję problem braku oryginalności prac. Wynika to z faktu, że nie dysponuję odpowiednimi programami anty-plagiatowymi, przez co nie byłem nawet świadomy tego typu nieprawidłowości i w dobrej wierze pracowałem nad edycją manuskryptów.

Szanowna Redakcjo dziękując za możliwość złożenia stosownych wyjaśnień nie ukrywam, że bardzo liczę na uczciwe dla wszystkich rozwiązanie tej sprawy i zamieszczenie na łamach czasopisma noty adekwatnej do roli poszczególnych autorów. Pragnę zauważyć, że nie jednemu dobrze już znanemu w środowisku naukowym badaczowi mogła zdarzyć się podobna sytuacja, gdzie nieświadomy swej roli po pewnym czasie odkrywa, że pracował nad dziełem, które jest obciążone brakiem oryginalności.

Z wyrazami szacunku,
Mariusz Dyląg

Lublin, 17. sierpnia 2022 r.

Szanowna Redakcjo,

W związku z otrzymaniem wiadomości dotyczącej podejrzenia plagiatów w pracach, w których jestem współautorem, a mianowicie:

- Taksonomia dermatofitów – systemy klasyfikacyjne się zmieniają, problemy identyfikacyjne pozostają te same. *Postępy Mikrobiologii* 2019.58.1
- Prewalencja symptomatycznych dermatofitoz u psów i kotów oraz patomechanizm infekcji dermatofitowych. *Postępy Mikrobiologii* 2019.58.2

Chciałbym się ustosunkować do przedstawionych zarzutów.

Osobiście potępiam w całej rozciągłości wszelkie formy plagiatu.

Nieznane mi są przesłanki kierujące autorem Panem Sebastianem Gnatem, które skłoniły go do umieszczenia mojego nazwiska w obu tych publikacjach. O moim udziale jako współautora dowiedziałem się na długo po opublikowaniu obu prac. Wnoszę, że była to grzecznościowa forma podziękowania mi za współpracę jaką realizuję z Zakładem Mikrobiologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w zakresie konsultacji o charakterze diagnostycznym w zakresie medycyny weterynaryjnej oraz współpracy w zakresie dydaktyki. Jednocześnie nadmieniam, że jestem pracownikiem laboratorium diagnostycznego nie jednostki naukowej, a w instytucji tej, publikacje nie są wliczane do jakiejkolwiek okresowej oceny pracownika, czy też nie warunkują awansu zawodowego oraz nagród finansowych.

Z poważaniem,
Przemysław Zięba

Lublin, 25. sierpnia 2022 r.

Szanowni Państwo,

W związku z otrzymanym dnia 03.08.2022 roku drogą e-mailową zawiadomieniu o wykryciu praktyk plagiatowych w artykule opublikowanym w 2019.58.2 zeszycie Postępów Mikrobiologii, którego jestem współautorem, przesyłam wyjaśnienie dotyczące mojej roli w powstaniu manuskryptu.

Oświadczam, że w pracy o następujących danych bibliograficznych: „Prewalencja symptomatycznych dermatofitoz u psów i kotów oraz patomechanizm infekcji dermatofitowych". Łagowski D., Gnat S., Nowakiewicz A., Osińska M., Zięba P. Postępy Mikrobiologii. 2019 T. 58 z. 2 s. 165–176, DOI: 10.21307/PM-2019.58.2.165 mój udział polegał na uczestnictwie w zbieraniu pozycji literaturowych do powstania pierwotnej wersji manuskryptu oraz na zapoznaniu się z ostateczną wersją manuskryptu bez wprowadzania istotnych zmian mających wpływ na jego wartość merytoryczną.

Z wyrazami szacunku,
Marcelina Osińska

Lublin, 2. września 2022 r.

Szanowni Państwo,

w związku z otrzymaniem od Państwa w dniu 3 sierpnia 2022 r. informacji, jakoby w odniesieniu do wskazanych w tej wiadomości prac (dalej również jako „Prace naukowe" lub „Artykuły naukowe"), których jestem współautorem, miało dojść do plagiatu (przypisania sobie autorstwa cudzego utworu) **oświadczam niniejszym, że zaprzeczam w całości mojej odpowiedzialności za taki czyn i wskazuję co następuje.**

I. Wśród materiałów przesłanych przez Państwa na moją prośbę w dniu 8 sierpnia 2022r. (wiadomość od Pana Radosława Stachowiaka), mających rzekomo potwierdzać zaistnienie plagiatu, brak jest wystarczających dowodów na to, że rzeczywiście doszło do plagiatu. Wynika to w szczególności z tego, że w odniesieniu do Artykułów naukowych nie została dokonana ich pogłębiona i prawidłowa weryfikacja za pomocą dostępnych w tym zakresie środków. Ponadto, opinie dotyczące rzekomego wystąpienia plagiatu w niniejszej sprawie budzą również szereg wątpliwości merytorycznych, co zostało przeze mnie opisane szeroko w wiadomości skierowanej wyłącznie do wiadomości Redakcji czasopisma Postępy Mikrobiologii.

II. Ze względu na to, iż tematyka spornych Artykułów naukowych nie stanowi głównego nurtu mojej działalności naukowej, mój wkład w powstanie przedmiotowych Prac naukowych nie miał charakteru wiodącego, lecz akcesoryjny. Moja rola w ich powstaniu ograniczyła się bowiem co do zasady do kwestii pomocniczych (zebranie literatury i merytoryczna korekta), a jednocześnie nie byłam autorką kwestionowanych przez Państwa fragmentów Prac naukowych.

III. Podkreślam, że otrzymując przygotowaną przez pozostałych współautorów wersję publikacji poszczególnych Artykułów naukowych, działałam w zaufaniu, że wersje manuskryptu przekazane mi przez te osoby (wśród których są również samodzielni pracownicy naukowi) nie zawierają w jakimkolwiek zakresie niedozwolonych zapożyczeń (ergo nie stanowią plagiatu).

IV. Niezależnie od ostatecznej oceny sprawy, tj. niezależnie od tego, czy rzeczywiście w zakresie Artykułów naukowych mamy do czynienia z plagiatem (czemu na ten moment stanowczo zaprzeczam), pragnę podkreślić, że od samego początku swojej kariery naukowej potępiałam plagiat i wszelkie jego przejawy. Stąd też, wyrażam ubolewanie, że zaistniała jakakolwiek potrzeba rozważania tego, czy Prace naukowe których jestem współautorem, w jakimkolwiek zakresie mogą być w ogóle rozważane w kategoriach plagiatu.

Z poważaniem,
Aneta Nowakiewicz

Lublin, 7 wrzesień 2022 r.

Szanowna Redakcjo,

Nawiązując do wiadomości oraz informacji z dnia 27 czerwca 2022 r. zawierającej stwierdzenie, że zgodnie ze zdaniem Redakcji w pracy „*Mechanizmy powstawania oporności dermatofitów na substancje przeciwgrzybicze*" autorstwa D. Łagowski, S. Gnat, A. Nowakiewicz, Postępy Mikrobiologii 2020, 59, 2, 153–165 wykryto znamiona plagiatu, co w konsekwencji prowadzić ma do dokonania retrakcji przedmiotowego artykułu oraz w kontynuacji wątku poruszonego w późniejszych pismach, w którym przedstawiono możliwość odniesienia się do całej sytuacji niniejszym w liście do Redakcji oraz Czytelników, we własnym imieniu chciałem odnieść się do przedmiotowej sprawy.

Aby możliwie skutecznie wyjaśnić wszelkie wątpliwości, które narosły należy odnieść się do stanu faktycznego z jakim mamy do czynienia.

W pierwszej kolejności postanowiłem ustosunkować się do sprawy artykułu „*Mechanizmy powstawania oporności dermatofitów na substancje przeciwgrzybicze*".

Redakcja dopatrzyła się, że ww. artykuł miałby zostać zaczerpnięty z publikacji autorstwa Martinez-Rossi et al. 2018. *Dermatophyte resistance to antifungal drugs: mechanisms and prospectus, Frontiers in Microbiology* z 2018 r. (doi.org/10.3389/fmicb.2018.01108)

Wyjątkowo zaskoczony i zaniepokojony tym faktem zwróciłem się do pełnomocnika, który to w moim imieniu uzyskał od Redakcji materiały, które miały przesądzać o przypisania artykułowi ww. negatywnych cech.

Oficjalny komunikat kwartalnika informował o wykryciu cech noszących znamiona plagiatu w opublikowanych pracach różnych autorów w tym m.in. mojej, ale również innych pracowników – dr hab. Sebastiana Gnata, mgr inż. Marceliny Osińskiej, prof. dr hab. Anety Nowakiewicz, dr Mariusza Dyląga, dr Przemysława Zięby.

Określenie „*znamiona plagiatu*" jakie zostało użyte nie oznacza, że takowy plagiat został faktycznie popełniony, a jedynie, że dzieło wedle oceniających zawiera cechy, które identyfikują je jako plagiat. Jeśli zaś takowe naruszenia prawa autorskiego faktycznie występuje to nie zostało ustalone kto jest za niego odpowiedzialny.

Aktualnie prezentowane stanowisko jest niczym innym jak wewnętrznym przekonaniem Redakcji o tym, że taki plagiat został dokonany.

Czytając wszystkie te informacje wychodziłem z założenia, że z racji powagi zarzutów, ale również ze względu na renomę jaką cieszy się Redakcja, sprawa została potraktowana niezwykle poważnie. Po uzyskaniu materiałów dot. analizy tekstów w kierunku plagiatu w toku sprawdzenia zebranej dokumentacji ujawniły się daleko idące wątpliwości, zarówno odnośnie miary staranności, jaką dołożono przy zbieraniu materiału dowodowego, jak i przede wszystkim samej jego oceny.

Analiza oraz ocena zgromadzonych materiałów pomimo, że została dokonana wedle twierdzeń Redakcji bez pośpiechu zawiera w sobie informacje, które istotnie przeczą wysnuwanym i rozpowszechnianym tezom.

Krytyczna ocena Redakcji została wywołana na podstawie anonimowej recenzji zawierała niemal dogmatyczne twierdzenia odnośnie rzekomego plagiatu. Jednocześnie stwierdzono, że do tłumaczenia porównania tekstu użyto aplikacji Google Translator, co słusznie jest wskazywane jako narzędzie obarczone dużym marginesem błędu. Recenzja anonimowego autora nie odniosła się do charakterystycznych cech wskazujących na plagiat, co więcej nie nosiła znamion profesjonalizmu, zawierała zaś jedynie przeświadczenie jej anonimowego autora o tym, że jego postrzeganie faktu jest obiektywne i znajdujące pokrycie w prawdzie. Można pokusić się o pytanie, czy analiza innych tekstów przez tegoż recenzenta spotkałaby się z tożsamym stwierdzeniem.

Pan dr hab. Marek Wroński, który wcielił się w rolę eksperta przedstawił na polecenie Redakcji swoją opinię oraz raporty pracy programów antyplagiatowych.

Program antyplagiatowy iThenticate, którego Pan dr hab. Marek Wroński jest wiernym orędownikiem i który zgodnie z treścią pisma od Redakcji będzie stosowany do oceny artykułów jest niewątpliwie niezwykle przydatnym narzędziem informatycznym dedykowanym do zwalczania negatywnych zjawisk.

Sam dobór narzędzia nie przesądza o tym, że dochowane zostaną standardy staranności przy jego użyciu oraz że wyniki będą interpretowane obiektywnie i z poszanowaniem wytycznych twórców aplikacji.

Raporty wskazują jednoznacznie, że sprawdzający nie zastosował przy porównywaniu opcji wykluczenia bibliografii (*exclude bibliography*), a także nie zastosował opcji wykluczenia źródeł (*exclude sources*), co prowadziło w prosty sposób do zawyżenia skali podobieństwa prac.

Warto nadmienić, że w przypadku jakichkolwiek tekstów zgodnie z informacjami zawartymi na stronie producenta programu indeks podobieństwa na poziomie 10% jest naturalnym poziomem dla dowolnego tekstu porównywanego tekstu – stosownej wzmianki oraz wspomnienia w przedmiotowych opiniach nie występują.

Ocena eksperta, która zaważyła zapewne na opinii Redakcji zawarta w jednostronicowych opiniach pisemnych całkowicie nie pokrywa się z danymi oraz raportami wygenerowanymi przez program – często wręcz stojąc wobec nich w oczywistej sprzeczności. Oceniający nie zadał sobie również wymaganego przy formowaniu tak poważnych oskarżeń trudu weryfikacji z jakich artykułów pochodzą fragmenty, które są zbliżone do wcześniejszych prac – w większości są to publikacje autorstwa tych samych osób. Jeśli stosowany jest dany program to jego wyniki powinny zostać zinterpretowane oraz przedstawione w odniesieniu do skali.

Celem unaocznienia skali zjawiska wyniki raportów programu iThenticate zawarte zostały w tabeli poniżej.

L.p.	Nazwa artykułu	iThenticate Indeks podobieństwa (zasoby internetu)	iThenticate Indeks podobieństwa (porównanie dokumentów)	Data, czas opracowania oraz główna teza z opinii
1	Mechanizmy powstawania oporności dermatofitów na substancje przeciwgrzybicze	34%	19%	Opinia z 27.06 dot. materiałów przekazanych 24.06– *„...polscy autorzy przejęli prawie cały tekst, łącznie z kontekstem i planem przetłumaczonego artykułu. Jest to niewątpliwe poważne naruszenie prawa autorskiego i plagiat naukowy."*
2	Prewalencja symptomatycznych dermatofitoz u psów i kotów oraz patomechanizm infekcji dermatofitowych	39%	2%	b.d
3	Molekularne metody diagnostyki dermatymykoz – przegląd dostępnych technik oraz ocena ich zalet i wad w implementacji do rutynowego stosowania	19%	5%	Opinia z 13.07 dot. materiałów przekazanych 5.07. *„Jest to naruszenie prawa autorskiego i stanowi plagiat naukowy w publikacji".*
4	Nowe syntetyczne i naturalne antymykotyki w kontekście terapii dermatomykoz	29%	b.d.	b.d
5	Zastosowanie techniki MALDI-TOF MS do identyfikacji dermatofitów	41%	31%	Opinia z 12.07 dot. materiałów przekazanych 5.07 *„Jest to poważne naruszenie prawa autorskiego i stanowi plagiat naukowy pracy Zastosowanie techniki MALDI-TOF MS do identyfikacji dermatofitów".*
6	Ludzki mykobiom w stanach normobiozy i dysbiozy – charakterystyka i metody analizy	18%	15%	Opinia z 11.07 dot. materiałów przekazanych 5.07 *„Jest to poważne naruszenie prawa autorskiego i stanowi plagiat naukowy* dotyczący publikacji...".

Dodatkowo, celem lepszego wskazania wiarygodności wyników, zleciłem weryfikację wybranych artykułów przy pomocy innego programu antyplagiatowego Antyplagiat. Na marginesie należy wyraźnie podkreślić, że program ów był uprzednio niezwykle dobrze oceniany jako doskonałe narzędzie do zwalczania zjawiska plagiatu właśnie przez dr hab. Marka Wrońskiego,

Zgodnie z zaleceniami producenta wysokie wartości współczynników podobieństwa nie oznaczają automatycznie plagiatu. Raport powinien zostać przeanalizowany przez kompetentną i upoważnioną osobę. Uznaje się jednak, że wyniki wysokie wymagające szczegółowej analizy, to takie, których, jeśli WP 1 wynosi ponad 50%, a WP 2 ponad 5%.

L.p.	Tytuł pracy	Współczynnik podobieństwa	Główne źródło potencjalnego zapożyczenia i procent	Uwagi
1	Mechanizmy powstawania oporności dermatofitów na substancje przeciwgrzybicze	Wartość A 9,45% Wartość B 20,78%	**12,56%** Mechanisms Of Dermatophyte Resistance To Antifungal Substances autorstwa: Dominik Łagowski, Sebastian Gnat, Aneta Nowakiewicz	Niski współczynnik wynikaja z faktu uznania podobieństwa treści do artykułów autorstwa tych samych autorów.
2	Molekularne metody diagnostyki dermatymykoz – przegląd dostępnych technik oraz ocena ich zalet i wad w implementacji do rutynowego stosowania	Wartość A 67,42% Wartość B 39,13%	**63,23 %** The Prevalence Of Symptomatic Dermatophytoses In Dogs And Cats And The Pathomechanism Of Dermatophyte Infections autorstwa: Dominik Łagowski, Sebastian Gnat, Aneta Nowakiewicz, Marcelina Osińska Przemysław Zięba	Wysokie czynniki wynikają z faktu uznania podobieństwa treści do artykułów autorstwa tych samych autorów.
3	Lekooporność rodzaju *enterococcus* – aktualny problem wśród ludzi i zwierząt	Wartość A 45,00% Wartość B 22,26%	**43,01%** Lekooporność rodzaju *enterococcus* – aktualny problem wśród ludzi i zwierząt autorstwa: Katarzyna Talaga-Ćwiertnia, Małgorzata Bulanda	Przykładowy artykuł innych autorów opublikowany w *Postępach* Mikrobiologii w roku 2018 r., który ma zbliżone wyniki jak artykuł uznany jako plagiat.

Krzyżowe sprawdzenie innym programem nie wykazało również istnienia plagiatu – opinia eksperta jest jednak całkowicie odmienna i sprzeczna z raportami.

Artykuły, których byłem autorem były uprzednio recenzowane, czytane przez licznych ludzi nauki oraz były jednym z elementów dorobku naukowego nie tylko mojego, ale również innych autorów. Prace powinny zostać sprawdzone przy pomocy innych programów antyplagiatowych.

Co więcej chciałbym zwrócić uwagę, że nie jest znany mi stosunek Redakcji do tego jak wyglądają wewnętrzne procedury analizy tekstów przesyłanych oraz publikowanych w czasopiśmie a także jaka jest procedura ich recenzji. Na przykładzie moim oraz z korespondencji wyłania się obraz, że bazowano na oświadczeniach autorów ale nie prowadzono wewnętrznej kontroli przy pomocy programów antyplagiatowych. W takim razie jakie jest kryterium oraz próg podobieństwa który Redakcja uzna za dopuszczalny a jaki za niedopuszczalny? Czy Redakcja będzie kierować się zaleceniami producenta takiego programu czy też pozostawi wolną ręką recenzentowi lub innej formy kontroli wewnątrz redakcyjnej. W przypadku kiedy program nie uznaje danego dzieła za zapożyczone z innego a recenzent przedstawia odmienne stanowisko to jak taki problem będzie rozstrzygany? Nietrudno sobie wyobrazić sytuację kiedy jedna praca oceniana przy pomocy tych samych programów przez kilku recenzentów zostanie uznana za prawidłową a inny o niezwykłej wrażliwości będzie uznawał każdą za plagiat oraz ciężkie naruszenie prawa domagając się ich retrakcji.

Rozważenie tych kwestii oraz przedstawienie sposobu postępowania w takich sprawach ma istotne znaczenie również dla renomy oraz funkcjonowania całego czasopisma.

Chęć eradykacji tekstów, które są owocami nieuczciwości jest działaniem, które działa z korzyścią dla środowiska naukowego – nie należy jednak zapominać o tym, że publiczne oraz dogmatyczne kreowanie oskarżeń może prowadzić do pokrzywdzenia osób, którym nie można przypisać winy. Aprioryczne uznawanie za jedyne właściwe opinie jednego z ekspertów nie powinny w mojej opinii zostać tak potraktowane, tak jak się to stało w przedmiotowej sprawie.

Plagiat zgodnie z normą art. 115 ust. 1 ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych o treści „*Kto przywłaszcza sobie autorstwo albo wprowadza w błąd co do autorstwa całości lub części cudzego utworu albo artystycznego wykonania, podlega grzywnie, karze ograniczenia wolności albo pozbawienia wolności do lat 3.*" to czyn stanowiący przestępstwo, a więc kategorię zachowania, która jest zabroniona ustawą, karalna, o szkodliwości społecznej większej niż znikoma, zaś osoba, która się go dopuszcza jest powszechnie określana jako przestępca.

Ostrożność w formowaniu takich tez jest wysoce wskazana i pożądana szczególnie w ramach sfery publicznej, gdzie chociażby podejrzenie powoduje daleko idące negatywne zjawiska oraz niedogodności. Ten aspekt funkcjonowania człowieka jest na tyle istotny, że obrona czci i dobrego imienia jest możliwa nie tylko na gruncie prawa cywilnego w kwestii o ochronę dóbr osobistych, ale również na gruncie prawa karnego, który przewiduje odpowiedzialność karną za fałszywe oskarżenie.

Mogę wyrazić swoje głębokie ubolewanie, że pewne kwestie zostały przeniesione do dyskursu publicznego, a sam ponoszę z tego powodu daleko idące konsekwencje, łącznie z aktualnie dokonanym wstrzymaniem przyznanej uprzednio nagrody naukowej PTM im. prof. Edmunda Mikulaszka I stopnia za cykl monotematyczny 6 prac opublikowanych w latach 2020–2021 dotyczący dermatofitów najczęściej izolowanych od zwierząt oraz z przypadków zoonoz w krajach europejskich tj. *Trichophyton verrucosum* i *Trichophyton mentagrophytes*.

Jednocześnie przyznano jednoznacznie, że nagroda została przyznana za cykl innych artykułów, których ani autorstwo ani wartość nie jest kwestionowana, ale na ocenę o „cofnięciu" nagrody wpłynęły i przesądziły kwestie moralne.

Poza ww. konsekwencjami w tym utratą wyróżnienia i nagrody pieniężnej, a także będąca niejako uzupełnieniem sankcji rozproszonej jest kwestia artykułu, który pojawił się w czasopiśmie Forum Akademickie Nr FA 7–8/2022 pt. „*Plagiatowe problemy na UP w Lublinie*" autorstwa dr hab. Marka Wrońskiego, w którym w sposób całkowicie autorytarny przedstawił winę, wskazując imiennie mojego Mocodawcę, stanowi na chwilę obecną poważne naruszenie dóbr osobistych. Od eksperta, który zajmuje się tematyką oraz którego opinia wywołała całą sytuację można by oczekiwać większej wstrzemięźliwości w formułowaniu osądów.

Odnosząc się ostatecznie do pytania ze strony Redakcji odnośnie tego jaką rolę miałem w każdej z wymienionych w korespondencji prac informuję uprzejmie, że prezentuje się następująco:

Ludzki mykobiom w stanach normobiozy i dysbiozy – charakterystyka i metody analizy (Human mycobiome in normobiosis and dysbiosis states characteristics and analysis methods). [Aut. koresp.] Sebastian Gnat, [Aut.] Dominik Łagowski, Mariusz Dyląg, Aneta Nowakiewicz. Postępy Mikrobiol. 2021 T. 60 z. 1 s. 31–46, il., bibliogr., sum.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dodaniu bibliografii w manuskrypcie pierwotnym oraz po otrzymaniu recenzji oraz wykonanie Ryciny 1 i 2.

Zastosowanie techniki MALDI-TOF MS do identyfikacji dermatofitów (Application of the maldi-tof ms technique for identification of dermatophytes). [Aut. koresp.] Sebastian Gnat, [Aut.] Dominik Łagowski, Aneta Nowakiewicz. Postępy Mikrobiol. 2020 T. 59 z. 3 s. 315–324, il., bibliogr., sum. DOI: 10.21307/PM-2020.59.3.23

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dodaniu bibliografii w manuskrypcie pierwotnym oraz po otrzymaniu recenzji, a także wykonaniu Ryciny 1 i 2.

Mechanizmy powstawania oporności dermatofitów na substancje przeciwgrzybicze. [Aut.] Dominik Łagowski, [Aut. koresp.] Sebastian Gnat, [Aut.] Aneta Nowakiewicz. Postępy Mikrobiol. 2020 T. 59 z. 2 s. 153–165, il., bibliogr., sum. DOI: 10.21307/PM-2020.59.2.012

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu konspektu manuskryptu, opracowaniu bibliografii w manuskrypcie pierwotnym oraz po recenzji, wykonaniu Ryciny 1 oraz pierwotnej wersji Tabeli I. W trakcie powstawania tego manuskryptu był on wielokrotnie poprawiany przez mojego promotora dr hab. Sebastiana Gnata. Dotyczyło to zarówno wersji pierwotnej, jak i wersji po recenzjach.

Nowe syntetyczne i naturalne antymykotyki w kontekście terapii dermatomykoz (Clinically used and potential antimycotics in the context of therapy of dermatomycoses). [Aut. koresp.] Sebastian Gnat, [AUT.] DOMINIK ŁAGOWSKI, Aneta Nowakiewicz, Mariusz Dyląg. Postępy Mikrobiol. 2020 T. 59 z. 1 s. 63–74, il., bibliogr., sum.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dodaniu bibliografii w manuskrypcie pierwotnym oraz po recenzji, a także wykonaniu Ryciny 1.

Molekularne metody diagnostyki dermatomykoz – przegląd dostępnych technik oraz ocena ich zalet i wad w implementacji do rutynowego stosowania (Molecular methods for diagnostics of dermatomycoses – review of available techniques and evaluation of their advantages and disadvantages in implementation for in routine use). [Aut. koresp.] Sebastian Gnat, [Aut.] Dominik Łagowski, Aneta Nowakiewicz, Mariusz Dyląg. Postępy Mikrobiol. 2019 T. 58 z. 4 s. 483–494, il., bibliogr., sum.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dodaniu bibliografii w manuskrypcie pierwotnym oraz po recenzji.

Prewalencja symptomatycznych dermatofitoz u psów i kotów oraz patomechanizm infekcji dermatofitowych (The prevalence of symptomatic dermatophytoses in dogs and cats and the pathomechanism of dermatophyte infections.) [Aut.] Dominik Łagowski, [Aut. koresp.] Sebastian Gnat, [Aut.] Aneta Nowakiewicz, Marcelina Osińska, Przemysław Zięba. Postępy Mikrobiol. 2019 T. 58 z. 2 s. 165–176, il., bibliogr., sum. DOI: 10.21307/PM-2019.58.2.165

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przygotowaniu konspektu manuskryptu, opracowaniu bibliografii w manuskrypcie pierwotnym oraz po recenzji, wykonaniu pierwotnej wersji Tabeli 1. Był to mój pierwszy samodzielny artykuł. W trakcie powstawania tego manuskryptu, był on wielokrotnie poprawiany przez mojego promotora dr hab. Sebastiana Gnata, tak samo w wersji pierwotnej oraz wersji po recenzjach. Pierwotny zarys manuskryptu zaczął powstawać od 6 stycznia 2019 r.

Wersja manuskryptu, która miała zostać wysłana do PM, została mi przesłana przez dr hab. Sebastiana Gnata 29 stycznia 2019 r. Całą korespondencję związaną z wysłanie manuskryptu, opłatą za publikację i kontaktem z PM prowadził wyłącznie dr hab. Sebastian Gnat.

Ufam, że całościowe przedstawienie tematu w tymże liście w taki sposób pozwoli na pełniejsze wyjaśnienie przedmiotowej sprawy i rzuci przynajmniej nowe światło na cały tryb postępowania w przedmiotowej sprawie, a sama sprawa zostanie wyjaśniona w sposób aprobowany w środowisku naukowym bez toczenia niepotrzebnych sporów, który nie służy dobru polskiej nauki.

Dominik Łagowski

POSTĘPY MIKROBIOLOGII – ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY
2022, 61, 3, 157–161

INFORMACJE Z POLSKIEGO TOWARZYSTWA MIKROBIOLOGÓW

Od ostatniej informacji o działalności Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, zamieszczonej w zeszytach nr 2 z 2022 r. kwartalników *Advancements of Microbiology – Postępy Mikrobiologii* i *Polish Journal of Microbiology*, ZG PTM zajmował się następującymi sprawami:

1. Krakowski Oddział PTM wraz z Polskim Towarzystwem Mykologicznym zaprosił na wykład pod tytułem: „Właściwości dietetyczne i lecznicze grzybów jadalnych", który w dniu 30.06.2022 r. wygłosiła on-line prof. dr hab. Bożena Muszyńska z Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum.
2. Krakowski Oddział PTM przekazał smutną wiadomość o śmierci w dniu 20.06.2022 r. Pani prof. dr hab. Jadwigi Szostak-Kot, członka PTM, byłej kierownik Katedry Mikrobiologii Wydziału Terenoznawstwa Uniwersytetu Ekonomicznego w Krakowie.
3. Z dużą satysfakcją informujemy, że współczynniki Impact Factor JCR obliczone za 2021 r. dla obu czasopism PTM wzrosły:
   Polish Journal of Microbiology z IF (2020) = 1,280 do **IF (2021) = 2,091**
   Advancements of Microbiology – *Postępy Mikrobiologii* z IF (2020) = 0,947 do **IF (2021) = 1,118.**
4. Wystosowano pismo do MEiN w sprawie zwiększenia punktacji obu czasopism PTM na liście MEiN.
5. Ze smutkiem zawiadamiamy, że w dniu 13 września 2022 r. zmarła Pani prof. dr hab. Zofia Tynecka, Członek Honorowy Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Pani profesor przez wiele lat kierowała Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Lublinie. Prowadziła pionierskie badania z zakresu procesów bioenergetycznych na modelu *Staphylococcus aureus* i mechanizmu obronnego tych bakterii przed toksycznym działaniem kadmu.
6. Podjęto **Uchwałę nr 21-2022** w sprawie przyjęcia nowych Członków Zwyczajnych PTM.
7. Podjęto **Uchwałę nr 22-2022** w sprawie retrakcji z kwartalnika *Postępy Mikrobiologii – Advancements of Microbiology*, 5 publikacji: PM 2021, 60 (1) 31–46; PM 2020, 59 (3) 315–324; PM 2020, 59 (2) 153–165; PM 2019, 58 (4) 483–494; PM 2019, 58 (1) 49–58. Podstawą decyzji o retrakcji było stwierdzenie w ww. 5 publikacjach obecności istotnych fragmentów tekstów skopiowanych z publikacji zagranicznych, po przeprowadzeniu analizy podobieństwa tekstów oraz zapoznaniu się z opiniami prof. Marka Wrońskiego – specjalisty od patologii w nauce, w tym plagiatów.
8. W związku ze stwierdzonymi przez Redaktora Naczelnego kwartalnika *Postępy Mikrobiologii* plagiatami publikacji zamieszczonymi w tym czasopiśmie PTM, w nawiązaniu do **Uchwały Nr 20-2022,** podjęto **Uchwałę nr 23-2022** w sprawie wykluczenia Panów: dr hab. Sebastiana Gnata prof. Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie i lek. wet. Dominika Łagowskiego członków zwyczajnych PTM Oddziału Terenowego PTM w Lublinie z Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „za czyny nie licujące z godnością członka Towarzystwa", Statut PTM, par. 15, ust. 1, p. 4 na podstawie opinii Komisji ds. etyki członków PTM i załączonych do niej materiałów.
9. Podjęto **Uchwałę nr 24-2022** w sprawie objęcia patronatem honorowym PTM Konferencji Naukowo-Szkoleniowej: XVIII Regionalne Forum Medycyny Zakażeń – od teorii do praktyki" organizowanej w dniach 05–07.10.2022 r. w Ełku przez firmę „Pro-Medica" Sp. z o.o., Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum UJ w Krakowie, Polskie Towarzystwo Zakażeń Szpitalnych, Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej UM w Białymstoku oraz firmę Medicare.
10. Podjęto **Uchwałę nr 25-2022** w sprawie objęcia patronatem honorowym PTM międzynarodowej konferencji naukowej z okazji 200-lecia urodzin Ludwika Pasteura „The last word belongs to microbes", która odbędzie się 29–30.11.2022 r. w Warszawie, organizowanej przez Uniwersytet Warszawski i Oddział PTM w Warszawie, (https://www.pasteur2022.com/).
11. Podjęto **Uchwałę nr 26-2022** w sprawie objęcia patronatem honorowym PTM Konferencji „Światowy Dzień Gruźlicy 2022" z uroczystą sesją naukową z okazji Jubileuszu Pani Profesor dr hab. Zofii Zwolskiej, Członka Honorowego PTM. Konferencja organizowana jest przez Polskie Towarzystwo Chorób Płuc, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Polskie Towarzystwo Mikrobiologów i Krajową Izbą Diagnostów Laboratoryjnych, 14 października 2022 r., w Pałacu Staszica w Warszawie.

12. Podjęto **Uchwałę nr 27-2022** w sprawie objęcia patronatem honorowym PTM Seminarium Naukowego „Biopreparaty mikrobiologiczne w przemyśle, rolnictwie i środowisku" organizowanego 29.09.2022 r. przez Katedrę Biotechnologii Środowiskowej, Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej.
13. Podjęto **Uchwałę nr 28-2022** w sprawie przyjęcia nowych Członków Zwyczajnych PTM.
14. **Najważniejszym wydarzeniem w omawianym okresie był XXIX Ogólnopolski Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, który odbył się w dniach 15–17 września 2022 r. w Warszawie.**

Ten Zjazd, który miał odbyć się 2 lata temu przysporzył nam bardzo wiele kłopotów. Trzykrotnie zmienialiśmy lokalizację Zjazdu i termin oraz okres trwania. Ze względu na niebywale trudności w pozyskiwaniu środków finansowych musieliśmy skrócić zjazd z planowanych 4 do 3 dni. Okres pandemii, warunki lokalowe i finansowe spowodowały także ograniczenie liczby uczestników, chociaż pierwotnie planowaliśmy Zjazd na 800 osób.

Cieszymy się jednak, że nasz Zjazd wreszcie doszedł do skutku. Naszym pierwotnym założeniem było, aby Zjazd odbywał się nie w formie on-line, czy hybrydowej, ale tradycyjnej umożliwiającej bezpośredni kontakt uczestników, aby zlokalizowany był w jednym miejscu, bez konieczności przemieszczania się po mieście. Ostatecznie z sukcesem udało się zorganizować XXIX Zjazd PTM w hotelu Arche Krakowska – wobec tego w jednym miejscu wygłaszane były wykłady i prezentacje ustne, prezentowane plakaty, odbyła się wystawa firm, istniała możliwość posiłków i noclegów. Dla osób o skromnych możliwościach finansowych wprowadziliśmy formę e-uczestnika i e-plakatów.

Podkreślamy, że jedynym organizatorem merytorycznym Zjazdu był Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Nie było żadnych współorganizatorów Zjazdu – instytucji, uczelni, organizacji naukowych, państwowych i terytorialnych. Uważamy, że jest to nasze święto, odbywające się co 4 lata, tym razem po 6 latach. Wsparcie finansowe otrzymaliśmy z Ministerstwa Edukacji i Nauki, Federacji Europejskich Towarzystw Mikrobiologicznych – FEMS oraz Międzynarodowego Towarzystwa Ekologii Drobnoustrojów – ISME, a także od Firm – Sponsorów, za co bardzo dziękujemy.

Komitet Naukowy Zjazdu obejmujący wszystkich członków Zarządu Głównego PTM opracował program Zjazdu skumulowany w 16 sesjach tematycznych, sesji dotyczącej prac doktorskich i habilitacyjnych, sesji sponsorowanej przez firmę Berlin-Chemie/Menarini oraz wykładów i warsztatów firmowych (bioMérieux, Pall Poland, Becton Dickinson, Roche Diagnostics oraz Diasorin). Zarejestrowanych było 508 uczestników Zjazdu, w tym 43 e-uczestników i 80 przedstawicieli firm. Wygłoszono 58 wykładów, 76 doniesień ustnych, przedstawiono 155 plakatów i 72 e-plakatów. Strona zjazdowa (https://zjazdptm2022.pl/).

Szereg osób, zwłaszcza Pani dr hab. **Agnieszka E. Laudy** Sekretarz Zarządu Głównego PTM i Sekretarz Komitetu Organizacyjnego Zjazdu oraz Panie **Renata Dyka** i **Agnieszka Chmielarska-Wojtczak**, z firmy Medicare Spółka Cywilna jako Organizator Logistyczny, starało się odpowiednio zaplanować i zorganizować Zjazd w tym pozyskać sponsorów, a także opracować materiały organizacyjne, informacyjne i naukowe, za co składamy im szczególne podziękowanie.

Gorące podziękowania składamy wszystkim członkom Komitetów Naukowego i Organizacyjnego za trud i czas poświęcony przygotowaniu tego Zjazdu. Składamy również wielkie podziękowanie sponsorom i wystawcom firm powiązanych z mikrobiologią, zwłaszcza firmie bioMérieux – Sponsorowi Głównemu Zjazdu, którzy uczestniczyli w Zjeździe i wsparli jego organizację.

Materiały zjazdowe są dostępne na stronie https://zjazdptm2022.pl/materialy-zjazdowe/.

W ramach Zjazdu odbyły się także dwie specjalnie zorganizowane dla uczestników zjazdu bezpłatne wycieczki po Warszawie w dniach 15–16.09.2022.

W drugim dniu Zjazdu odbyło się **Walne Zgromadzenie Delegatów PTM**, podsumowano trudną, 6. letnią kadencję dotychczasowych władz Stowarzyszenia oraz przeprowadzono wybory nowych władz Stowarzyszenia na kadencję 2022–2026.

Nowe Władze Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów na kadencję 2022–2026 wybrane na Walnym Zgromadzeniu Delegatów PTM w dniu 16 września 2022 w Warszawie:

Prezydium ZG PTM:

Prezes PTM	– Prof. dr hab. Stefan Tyski
I Wiceprezes PTM	– Prof. dr hab. Elżbieta Anna Trafny
II Wiceprezes PTM	– Prof. dr hab. Jacek Międzobrodzki
Sekretarz ZG PTM	– Dr hab. Agnieszka Ewa Laudy
Członek	– Dr hab. Beata Sadowska, prof. nadzw. UŁ
Członek	– Dr hab. Elżbieta Stefaniuk, prof. nadzw. UŁ
Członek	– Dr Joanna Jursa-Kulesza

Główna Komisja Rewizyjna PTM:

Przewodnicząca	– Prof. dr hab. Alina Małgorzata Olender
Sekretarz	– Dr hab. Urszula Kosikowska, prof. nadzw. UMLub
Członek	– Prof. dr hab. Beata Gutarowska
Członek	– Dr hab. Tomasz Jarzembowski
Członek	– Dr Jacek Grzyb

W ramach obrad Walnego Zgromadzenia Delegatów, które trwało ponad 6 godzin, przedstawiono sprawy i problemy, a także Uchwały podejmowane w trakcie 6. letniej kadencji władz PTM. Podsumowując w skrócie co udało się osiągnąć w kadencji 2016–2022:

1) W Krakowie w dniach 22–23.09.2017 r. zorganizowano „Konferencję Naukową 90 lat Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, PTM wczoraj – dziś – jutro", w ramach której zwołano pierwsze w historii PTM Nadzwyczajne Walne Zgromadzenie Delegatów, na którym dokonano aktualizacji Statutu PTM i wprowadzono poprawki;
2) Uporządkowano listę członków zwyczajnych PTM;
3) Utworzono po raz pierwszy konto PTM w mediach społecznościowych – facebooku;
4) Opracowano nową stronę internetową PTM;
5) Pozyskano Członków Wspierających PTM;
6) Na bieżąco, co kwartał, w czasopismach PTM zamieszczano informacje o pracach Prezydium i ZG PTM;
7) Wypracowano stanowisko PTM w sprawie przyznania absolwentom uniwersyteckich studiów magisterskich na kierunku Mikrobiologia prawa wykonywania zawodu Diagnosty Laboratoryjnego;
8) Wpłynięto na rozwój czasopism PTM i ich finansowanie co zaowocowało dynamicznym zwiększeniem ich wartości parametrycznych;
9) Zorganizowano po raz pierwszy w Polsce obrady FEMS Council;
10) Udzielano wsparcia i patronatu honorowego kilkudziesięciu konferencjom i sympozjom;
11) Opracowano cztery Regulaminy ważne dla statutowej działalności Towarzystwa;
12) Oddziały Terenowe PTM uzyskały możliwości finansowe, a zasady postępowania zostały określone w opracowanym „Regulaminie wydatkowania i rozliczania środków pieniężnych przez Oddziały Terenowe PTM";
13) Zorganizowano dla młodych członków PTM trzy edycje 2016–2017, 2018–2019 i 2020–2021 konkursu o Naukową Nagrodę PTM im. prof. Edmunda Mikulaszka;
14) Rozwiązano OT PTM w Puławach z powodu małej liczby członków;
15) Powołano nowy OT PTM w Rzeszowie;
16) Zostały powołane i rozpoczęły swoją działalność dwie sekcje w ramach PTM, tj. Sekcja Mikrobiologii Farmaceutycznej oraz Sekcja Mikrobiologii Środowiskowej;
17) Już w pierwszym tygodniu trwającej napaści Rosji na Ukrainę zajęto zdecydowane stanowisko w sprawie wojny na Ukrainie i przekazano je do FEMS, IUMS i ESCMID. W opracowanym stanowisku także wnioskowano o blokadę artykułów, w czasopismach wydawanych przez FEMS/IUMS, nadsyłanych przez autorów z Rosji i Białorusi aż do zakończenia wojny
18) Spowodowano zorganizowanie po raz pierwszy nadzwyczajnego posiedzenia FEMS Council w kwietniu 2022 r. poświęconego podjęciu sankcji wobec towarzystw mikrobiologicznych z Rosji i Białorusi;
19) Wprowadzono blokadę artykułów, w czasopismach PJM i AM-PM (wydawanych przez PTM), nadsyłanych przez autorów z Rosji i Białorusi aż do zakończenia wojny;
20) Po raz pierwszy w historii PTM usunięto z grona członków PTM osoby za „czyny nie licujące z godnością członka Towarzystwa".
21) Zorganizowano XXIX Ogólnopolski Zjazd PTM (15–17.09.2022 r. w Warszawie) i w jego ramach Walne Zgromadzenie Delegatów PTM.

W sprawozdaniu ze współpracy PTM z FEMS, zwrócono uwagę na niedostateczne wykorzystywanie możliwości korzystania z grantów przyznawanych przez FEMS oraz innych korzyści jakie członkowie PTM mogą uzyskać z FEMS. Zachęcamy do wnikliwego zapoznania się ze stroną FEMS: https://fems-microbiology.org/ i korzystania z dostępnych możliwości.

Na Walnym Zgromadzeniu Delegatów PTM podjęto uchwały w sprawie nadania siedmiu osobom zasłużonym dla Towarzystwa godności Członka Honorowego PTM:

Pani Prof. dr hab. Ewie Augustynowicz-Kopeć
Pani Prof. dr hab. Małgorzacie Bulanda
Pani Prof. dr hab. Eugenii Gospodarek-Komkowskiej
Pani Prof. dr hab. Barbarze Zawilińskiej
Panu Prof. dr hab. Włodzimierzowi Doroszkiewiczowi
Panu Prof. dr hab. Wiesławowi Kacy
Panu dr Zbigniewowi Poteć

W końcowej części WZD rozpatrzono odwołanie, jakie radca prawny mec. Bartosz Dąbek przedstawił w imieniu lek. wet. Dominika Ługowskiego, dotyczące **Uchwały nr 20-2022,** odnośnie nie przyznawania lek. wet. D. Łagowskiemu Nagrody Naukowej PTM im. Prof. Edmunda Mikulaszka ze względu na plagiat. Po odbytej dyskusji z udziałem mec. B. Dąbka i szeregu członków PTM, Delegaci na WZD uznali Uchwałę Nr 20-2022 za słuszną i tym samym lek. wet D. Łagowski nie otrzyma tej prestiżowej dla PTM nagrody.

Pan mec. Bartosz Dąbek przedstawił również odwołanie od decyzji Prezydium ZG PTM dotyczącej wykluczenia lek. wet. Dominika Łagowskiego z Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „za czyny nie licujące z godnością członka Towarzystwa", Statut PTM, par. 15, ust. 1, p. 4., zawartej w **Uchwale nr 23-2022.**

Przypominamy, że już w **Uchwale nr 20-2022**, Prezydium ZG PTM zobowiązało Redaktora Naczelnego PM-AM, aby spowodował wnikliwe sprawdzenie pod kątem ewentualnych plagiatów 7 publikacji współautorstwa dr hab. Sebastiana Gnata prof. nadzw. Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (pierwszy autor w 5 i autor korespondencyjny we wszystkich 7 publikacjach) i lek. wet. D. Łagowskiego (pierwszy autor w 2 publikacjach i współautor w 4 kolejnych publikacjach), które w ciągu 3 lat (2019–2021) opublikowano w PM-AM w języku polskim. Wnioskowaliśmy, aby pełne materiały dokumentujące plagiaty zostały przekazane Komisji ds. etyki członków PTM.

W opinii Prezydium ZG PTM zamieszczanie plagiatów prac w czasopismach, jest niedopuszczalne i naganne, a w tym przypadku jest działaniem na szkodę zarówno Stowarzyszenia jak również niszczy dobrą renomę czasopisma PTM. Prezydium uważa, że główną odpowiedzialność za jakość manuskryptu wysyłanego do redakcji czasopisma ponosi pierwszy autor i autor korespondencyjny.

Prezydium ZG PTM zwróciło się do Pani prof. dr hab. Stefanii Giedrys-Kalemby Przewodniczącej Komisji ds. etyki członków PTM, o rozpatrzenie postępowania członków PTM – dr hab. S. Gnata prof. nadzw. UPLub i lek wet. D. Łagowskiego w kontekście plagiatów i działania tych osób na szkodę Stowarzyszenia, w tym czasopisma PTM.

Po rozpatrzeniu sprawy, Komisja ds. etyki członków PTM rekomendowała ZG PTM usuniecie z grona członków zwyczajnych PTM zarówno dr hab. Sebastiana Gnata jak i lek. wet. D. Łagowskiego zgodnie z par. 15 Statutu PTM „Członkostwo zwyczajne ustaje na skutek: ust. 4: wykluczenia z Towarzystwa za działalność na szkodę Towarzystwa, za czyny nie licujące z godnością członka Towarzystwa".

Pomimo jednoznacznego stanowiska Prezydium ZG PTM i Komisji ds. etyki członków PTM, po odbytej dyskusji, z udziałem mec. B. Dąbka oraz szeregu członków zwyczajnych i honorowych PTM, Delegaci na WZD postanowili jednak uchylić decyzję zawartą w **Uchwale nr 23-2022** w zakresie lek. wet. D. Łagowskiego i pozostawić go w gronie członków PTM.

Drugi z wymienionych w **Uchwale nr 23-2020**, dr hab. Sebastian Gnat prof. nadzw. Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, członek zwyczajny PTM Oddziału Terenowego PTM w Lublinie nie odwoływał się od wykluczenia z Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „za czyny nie licujące z godnością członka Towarzystwa", Statut PTM, par. 15, ust. 1, p. 4 i tym samym nie jest już członkiem PTM.

Warszawa, 23.09.2022 r.

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

PREZES
Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
prof. dr hab. Stefan Tyski

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

A. P. Sreekantan, P. P. Rajan, M. Mini, P. Kumar – Pompy oporności wielolekowej u bakterii i ich inhibitory 105
S. Yousaf, H. M. Nouman, I. Ahmed, S. Husain, M. Waseem, S. Nadeem, M. Tariq, O. Sizmaz, M. F. Z. Chudhry – Przegląd zastosowań probiotyków u drobiu: Poprawa odporności i korzystne efekty na produkcję i zdrowie 115
S. A. Alduraywish – Transmisja COVID-19, czynniki ryzyka i charakterystyka choroby u pacjentów chorych na astmę 125
K. Ucieklak – Krztusiec i „efekt Czerwonej Królowej" 133
OD REDAKCJI 147
NOTA RETRAKCYJNA 148
LISTY DO REDAKCJI 149
KOMUNIKATY, INFORMACJE 157

CONTENTS

A. P. Sreekantan, P. P. Rajan, M. Mini, P. Kumar – Multidrug efflux pumps in bacteria and efflux pump inhibitors 105
S. Yousaf, H. M. Nouman, I. Ahmed, S. Husain, M. Waseem, S. Nadeem, M. Tariq, O. Sizmaz, M. F. Z. Chudhry – A review of probiotic applications in poultry: improving immunity and having beneficial effects on production and health 115
S. A. Alduraywish – COVID-19 transmission, risks factors and disease characteristics in asthmatics patients 125
K. Ucieklak – Pertussis and "the Red Queen effect" 133
EDITORIAL 147
RETRACTION NOTE 148
LETTERS TO THE EDITOR 149
NEW REPORTS, INFORMATION 157

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%