

**Marian Binek**

Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedry Nauk Przedklinicznych  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, w Warszawie  
ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: marian\_binek@sggw.pl

1. Wstęp. 2. Wirusy a postulatory Kocha. 3. Kwasy nukleinowe jako źródło informacji genetycznej a postulatory Kocha. 4. Chorobotwórczość versus choroba. 5. Podsumowanie

### **A glance at Koch's postulates 100 years after his death**

*Abstract:* Koch's postulates were derived from Robert Koch's work on infectious diseases, such as anthrax and tuberculosis. The postulates served the emerging science of microbiology well during its early years, and gave experimental consistency to the investigation of causal relationships. However, significant limitations to the postulates were soon recognized and restricted their wider scientific application. Rapidly, it became apparent that although there are many microbes, most infections were caused by only a few. Some microbes were classified as pathogens although they did not cause disease in every host, and some microbes were considered as non-pathogens although they did cause disease in certain hosts. The description of the carrier state further muddled the existing definitions of pathogens. It was apparent that pathogenicity was neither an invariant nor a stable characteristic of most microbes and that the acquisition of pathogenic microbes was not necessarily synonymous with disease. Now over a century later, a more rigorous method to test causality still has to be developed. Technological advances led to the discovery of viruses, prions and new classes of microbes that cannot be propagated in pure culture and therefore cannot fulfill Koch's postulates. The discovery of nucleic acids as a source of genetic information enforced the revision of guidelines for defining a causal relationship between a microbe and disease and as a result, Koch postulates have modified. Rivers proposed several approaches to establish causal relationship between a virus and a disease, while Falkov recognized the need for more rigorous genetic criteria for the determinants of disease, and modeled his proposals for molecular biology of pathogenesis on Koch postulates. In the integrated theory of microbial pathogenesis the contribution of both host and pathogen are taken into consideration. The outcome of infection is the result of an interplay between host and microbial factors for a particular microbe in a particular host. This interplay permits some microbes to be commensals in some hosts but to cause disease in others. It seems that the host damage is the relevant outcome of that host-microbe interaction. The colonization, persistence and disease represent the continued presence of microbe(s) in the host with a variable degree of host damage. Progressive damage, which results from colonization and persistency, may lead to disease and death. Disease is a clinical manifestation of the damage. The possibility that the occurrence, course and outcome of infection might be influenced at all levels of biological organization was named biocomplexity. This concept blurred the distinction between pathogens and nonpathogens and challenged our thinking about microbial pathogenesis which was based on Koch's postulates. Still at the time when they were formulated the postulates were essential for the progress of knowledge about infectious diseases.

1. Introduction. 2. Viruses versus Koch's postulates. 3. Nucleic acids sequence technology and the difficulties in proving causation. 4. Pathogenicity versus disease. 5. Concluding remarks

---

**Słowa kluczowe:** postulatory Kocha, związek przyczynowy, chorobotwórczość versus choroba

**Key words:** Koch's postulates, causal relationship, pathogenicity versus disease

---

## **1. Wstęp**

Pomimo dostrzeżanego już wcześniej związku pomiędzy drobnoustrojami i chorobą, bakteryjna etiologia wielu z nich została udowodniona dopiero pod koniec XIX wieku po akceptacji przez ówczesny świat naukowy tzw. postulatów Kocha, zgodnie z którymi taki związek można było udowodnić. Robert Koch był lekarzem i w swojej pracy koncentrował się głównie na kwestiach ontologii chorób, w tym nad doświadczalnym odtworzeniem choroby człowieka na modelu zwierzęcym. Zajmowały go kwestie mające związek z praktyką i w mniejszym stopniu pryncypia składające się na idee naukowe [14, 15, 19, 26, 40]. W 1884 r.,

Friedrich Löffler współpracownik Kocha opisał warunki, jakie musi spełnić drobnoustrój (izolacja, hodowla *in vitro* i zakażenie), aby został uznany za czynnik chorobotwórczy [24]. To odkrycie przypisywane Kochowi, czy raczej Kochowi i Henlemu było przełomem w naukach medycznych ponieważ w oparciu o ustanowione zasady można było wykazać specyficzny związek przyczynowy pomiędzy drobnoustrojem a chorobą.

We współczesnej formie postulatory Kocha można przedstawić w sposób następujący:

1. Mikroorganizm występuje u wszystkich chorych osobników i jest odpowiedzialny za obserwowane zmiany chorobowe i objawy kliniczne,

2. Mikroorganizm nie bierze udziału w wywoływaniu innej choroby i nie stwierdza się go jako czynnika przypadkowego lub niechorobotwórczego,
3. Mikroorganizm po wyizolowaniu od chorego i pasażowaniu w czystej kulturze jest zdolny do wywołania identycznej choroby u nowego osobnika.

Z czasem doszedł jeszcze jeden warunek, mówiący o tym, że ten sam drobnoustroj powinien być izolowany od doświadczalnie zakażonego osobnika, co wynika z logicznych następstw wcześniejszych założeń i sam Koch nie widział potrzeby w szczególności sposobu podkreślania tego warunku [11].

Jeżeli weźmiemy pod uwagę dominujące w XIX wieku poglądy na temat przyczyny chorób, przedstawiane i podtrzymywane przez anatomopatologów, jako zaburzenia wewnętrznej struktury i funkcji ciała, to z tego punktu widzenia idee Kocha były nowatorskie, zmieniające pogląd na rzeczywistość a nie przypadkową rolę drobnoustrojów w wywoływaniu chorób. W swoich założeniach nad bakteryjną etiologią chorób skorzystał z doświadczenia i pracy współczesnych Mu anatomopatologów, przede wszystkim Friedricha Jakoba Henlego, z którym Koch się przyjaźnił, wysuwającego przypuszczenie o zewnętrznych czynnikach chorobotwórczych i Edwina Klebsa skupiającego się na zewnętrznych przyczynach choroby, w tym również na zakażeniu. Swoje przemyślenia na temat przyczyny choroby Koch oparł na doświadczeniu i wynikach pracy nad gruźlicą i wąglikiem, w odniesieniu do których wszystkie sformułowane przez niego postulaty mogły zostać spełnione, ponieważ specyficzny związek pomiędzy drobnoustrojem a chorobą był ewidentny i można go było łatwo wykazać. Bakterie stwierdzano w zmienionych chorobowo tkankach zwierząt i ludzi, można je było uzyskać w czystej kulturze *in vitro* i odtworzyć chorobę w wyniku doświadczalnego zakażenia zwierząt. Co więcej u osobników zdrowych nie stwierdzano obecności tych drobnoustrojów. Przyczynowy związek pomiędzy drobnoustrojem a chorobą mógł być więc jednoznacznie ustalony. Jednakże jeszcze za życia Kocha, zaczęły pojawiać się wątpliwości, czy w oparciu o sformułowane postulaty można zawsze wyjaśnić przyczynę choroby. Sam Koch, mimo że wierzył w specyficzne bakteryjne podłoże takich chorób, jak trąd czy cholera, nie był w stanie w oparciu o sformułowane zasady dowieść, że tak w istocie jest. *Mycobacterium leprae* nawet współcześnie nie udaje się wyizolować w czystej kulturze *in vitro* a więc nie jest możliwe wypełnienie postulatu trzeciego, natomiast bakterie odpowiedzialne za cholere są obecne również u osób zdrowych a więc nie można wypełnić postulatu drugiego [13, 14, 23]. Koch złagodził zatem swoje założenia sugerując, że jeżeli stale stwierdza się występowanie tego samego pasożyta, to należy go uznać

za przyczynę choroby [11]. Spojrzenie na postulaty Kocha z dzisiejszej perspektywy to w gruncie rzeczy spojrzenie na przyczyny chorób przez pryzmat osiągnięć mikrobiologii, nauk bio-medycznych i weterynaryjnych ostatnich ponad stu lat i ewolucji tych dyscyplin w kierunku molekularnej mikrobiologii, genomiki i proteomiki. Odkrycie wirusów i innych subkomórkowych czynników zakaźnych, specyficzny związek niektórych pasożytów z jednym gatunkiem gospodarza, nosicielstwo, powstawanie zmian chorobowych w następstwie uwalnianych przez drobnoustroje toksyn, czy mechanizmów immunologicznych, indukcja ekspresji lub zanik funkcji określonego genu, koinfekcja bakterii i fagów, rekombinacja genetyczna, czynniki ze strony gospodarza, jak odporność, stan fizjologiczny, predyspozycja genetyczna i wreszcie czynniki środowiskowe, w tym rola wektorów, rezerwuaru czynników zjadliwości itp. powodują, że ramy nakreślone przez Kocha dla przyczynowego związku drobnoustroju z chorobą stają się zbyt ciasne i schematyczne. Nie można im jednak odmówić fundamentalnego znaczenia w budowaniu nowoczesnej wiedzy na temat przyczyny chorób zakaźnych, uwzględniającej nie tylko drobnoustroje, ale również ich relacje z gospodarzem w określonym środowisku [4, 8, 11, 16, 23, 37].

## 2. Wirusy a postulaty Kocha

Wirusy jako subkomórkowe struktury niezdolne do namnażania się poza komórkami z oczywistych powodów nie spełniały postulatów Kocha. Jednakże zgodnie z ogólną ideą ich założeń można było wykazać etiologiczny związek wirusów z chorobą. Wysunięto więc sugestie, że w odniesieniu do specyficznych chorób, nie zawsze możliwe jest ściśle trzymanie się postulatów w celu udowodnienia ich przyczyny. W ślad za tym pojawiły się próby uzupełnienia i modyfikacji postulatów, jak np. podano to w założeniach Riversa z 1936 r., które mówiły że specyficzny wirus w sposób dość regularny wykazuje związek z chorobą i że jego obecność u chorego osobnika nie jest przypadkowa. Stwierdza się go w zmienionych chorobowo tkankach oraz chorobę można odtworzyć u wrażliwego osobnika w wyniku podania materiału wolnego od innych czynników niż wspomniany wirus. Wytwarzanie, w odpowiedzi na zakażenie, specyficznych przeciwciał, wraz z postępującymi objawami zakażenia jest kolejnym dowodem potwierdzającym chorobotwórczą rolę wirusa [29]. R i v e r s zdawał sobie sprawę z tego, że również i przez niego sformułowane zasady nie zawsze będą mogły być spełnione, np. w sytuacjach, w których w próbce używanej do zakażenia wrażliwych zwierząt wirus nie będzie obecny, potencjalnej koinfekcji innymi czynnikami, obecności wirusa w sta-

nie przetrwałym, doprowadzającymi do błędnych interpretacji przyczyny choroby. Przełamał jednak schematyczny sposób myślenia na temat przyczyny choroby wynikający z postulatów Kocha. Kolejne odkrycia w wirusologii, w tym zakażeń przewlekłych i przetrwałych, jak też równoczesnych zakażeń wieloma wirusami nasunęło nowe pytanie, jak w takiej sytuacji określić związek przyczynowy pomiędzy czynnikiem zakaźnym a chorobą [18, 21]. W odpowiedzi, dotychczasowe kryteria zostały uzupełnione o dane epidemiologiczne i mechanizmy patogenezы wirusowych chorób. Przy potwierdzaniu przyczyny choroby było również brane pod uwagę powstanie przeciwciał i odporność w wyniku szczepienia. Kryteria serologiczne i immunologiczne znalazły szersze zastosowanie w postępowaniu dowodowym nad ustaleniem przyczyny choroby z chwilą oczyszczenia antygenу wirusowego i wykrywania specyficznych przeciwciał. Z kolei Alfred Evans na podstawie badań nad wirusem Epstein-Barr (EBV) zaproponował dowody immunologiczne, które miały na celu ustalenie przyczyny choroby [8].

Zgodnie z nimi:

- przed wystąpieniem choroby i ekspozycją na dany czynnik przeciwciała nie występują,
- podczas choroby pojawiają się swoiste przeciwciała klasy IgM i IgG,
- obecność przeciwciał przeciwko danemu czynnikowi zapobiega wywoływaniu przez niego choroby,
- brak przeciwciał powoduje wrażliwość na zakażenie i rozwój choroby,
- przeciwciała przeciwko innym czynnikom nie wpływają na czynnik wywołujący chorobę.

Kolejne wątpliwości co do słuszności i kompletności przyjętych zasad pozwalających ustalić związek pomiędzy czynnikiem zakaźnym a chorobą pojawiły się po odkryciu wirusów powolnych, które nie spełniały nie tylko postulatów Kocha, ale również reguł przyjętych dla wirusów, jako czynników etiologicznych chorób. Johnson i Gibbs zaproponowali więc kolejne kryteria, zgodnie z którymi wirusy można było wiązać z określonym procesem chorobowym, w trakcie którego stwierdzano *in situ* czynnik zakaźny oraz:

- konsekwentnie dochodziło do zakażenia wrażliwych zwierząt lub izolacji wirusa w hodowli komórkowej,
- chorobę z typowymi dla niej objawami klinicznymi i zmianami patologicznymi udawało się odtworzyć w serii doświadczeń w wyniku podania filtratu pochodzącego od osobników chorych, jak również możliwe było doświadczalne zakażenie kolejnymi rozcieńczeniami filtratu w celu wykazania namnażania się czynnika, lub wykazanie po zakażeniu czynnika w zmienionej tkance i komórkach przy pomocy mikroskopu elektronowego, metod immunofluorescencyjnych lub innych,

- równolegle prowadzone badania tkanek niezmiennych lub tkanek pobranych od osobników z innymi chorobami wykazywało, że wykrywany u chorych osobników czynnik nie występował powszechnie lub też nie stanowił zanieczyszczenia [18].

### 3. Kwasy nukleinowe jako źródło informacji genetycznej a postulaty Kocha

Odkrycie kwasów nukleinowych, a w ślad za tym ich sekwencjonowanie, otworzyło nowe możliwości badań nad różnorodnością mikroorganizmów obecnych w środowisku i związanych z określonymi gospodarzami. Tradycyjne metody izolacji i identyfikacji drobnoustrojów zostają systematycznie zastępowane technikami amplifikacji. Na tej drodze odkrywane są nowe, wcześniej nie znane czynniki zakaźne, które nie udawało się uzyskać *in vitro* lub było to bardzo trudne. W ten sposób wykrywane są również wśród drobnoustrojów sekwencje (geny lub ich fragmenty) odpowiedzialne za wytwarzanie czynników chorobotwórczości i rozwój choroby. Tak więc w postępowaniu mającym na celu ustalenie czynnika będącego przyczyną choroby dochodzimy do zrozumienia istoty chorobotwórczości zapisanej w sekwencji (genie), która jeżeli występuje wpływa na zakażenie i powstanie choroby. Klasyczne postulaty Kocha w tym kontekście wydają się tracić sens ich dalszego przywoływania, w szczególności w sytuacji amplifikacji określonych sekwencji drobnoustrojów bezpośrednio w zmienionych chorobowo tkankach. Jednakże w oparciu i nawiązaniu do nich Stanley Falkov formułuje molekularne postulaty, które określają, jakie cechy powinien mieć gen, aby jego produkt został zaklasyfikowany jako czynnik zjadliwości [9, 10]. Zgodnie z nimi:

- powinien być odnajdywany jedynie w szczepach chorobotwórczych, a jeżeli występuje w genomie szczepów niezdadliwych powinien być zmutowany i nie ulegać ekspresji,
- gen powinien ulegać ekspresji na pewnym etapie zakażenia, a kodowany przez niego produkt indukować odpowiedź immunologiczną humoralną lub komórkową,
- unieczynnienie genu kodującego czynnik zjadliwości powinno (choć nie musi) doprowadzić do obniżenia stopnia zjadliwości,
- wprowadzenie genu do szczepu niezdadliwego może przekształcić go w szczep chorobotwórczy,
- do celów badawczych istnieje możliwość klonowania genu(ów).

Metody genotypowe zyskują powszechną akceptację, jako bardziej specyficzne i łatwiejsze do standaryzacji w porównaniu do tradycyjnych metod fenotypowego rozpoznawania czynników zakaźnych [1, 11,

28, 30]. Zaczęto poszukiwać w genomie fragmentów konserwatywnych, które mogłyby być reprezentatywne dla poszczególnych drobnoustrojów, a także oddawały istotę filogenetycznych przemian. Okazało się, że ribosomowe RNA (rRNAs) mają wiele cech, które spełniają postawione wymagania. Są cząsteczkami relatywnie dużymi o ustalonych funkcjach, obecnymi u wszystkich organizmów. Zawierają wiele regionów, w których sekwencje nukleotydowe we wszystkich komórkach pozostają konserwatywnymi. Znane są trzy cząsteczki rybosomowego RNA, które u *Prokaryota* mają masę 5S, 16S i 23S (stałą sedymentacji mierzoną w Svedbergach. Do analizowania sekwencji najbardziej przydatny jest 16S rRNA, a u *Eukaryota* o podobnej funkcji nieco większy 18S rRNA. Ponieważ 16S i 18S rRNA wchodzi w skład mniejszej (30S lub 40S) podjednostki rybosomu (SSU, small subunit), określenie sekwencjonowanie SSU jest synonimem sekwencjonowania 16S lub 18S RNA [38]. Wykorzystanie SSU rRNA do analizy filogenetycznej zostało zapoczątkowane we wczesnych latach 70 XX wieku przez Carla R. Woese'go na Uniwersytecie Illinois. W 1981 r. Woese wpadł na pomysł aby na podstawie porównania sekwencji genów kodujących 16S rRNA różnych organizmów przeanalizować ich genetyczne pokrewieństwo. Wyszedł z założenia, że skoro wszystkie organizmy mają 16S rRNA i u wszystkich służy on do syntetyzowania białek, to musi to być sekwencja niezwykle konserwatywna. Przez następne lata stworzył olbrzymią bibliotekę sekwencji 16S rDNA różnych organizmów, które można ze sobą porównywać i utworzyć w ten sposób filogenetyczne zależności między nimi składające się na uniwersalne drzewo życia. [39]. Włączenie komputerów do analizy sekwencji rybosomowego RNA w celu odtwarzania filogenetycznych zależności pomiędzy badanymi organizmami (tworzenia drzewa filogenetycznego), spowodowało, że metody te stały się powszechnymi. Nowo rozpoznawane sekwencje są porównywane ze znanymi sekwencjami zgromadzonymi w bazach danych, jak np. RPD (Ribosomal Database Project), GenBank (USA), DDBS (Japonia), czy EMBL (Niemcy). Uniwersalne drzewo filogenetyczne jest więc mapą drogową życia. Przedstawia ewolucyjną historię komórek wszystkich organizmów i w jasny sposób odsłania ten moment w historii ewolucji, od którego wszystkie przejawy życia na Ziemi wzięły swój początek od wspólnego przodka określanego, jako uniwersalny przodek.

16S rRNA stał się więc powszechnie wykorzystywanym celem analizy metodami amplifikacji i określania sekwencji do wykrywania i identyfikacji do poziomu gatunku trudno lub nie hodujących się patogenów bezpośrednio w tkankach zwierząt i człowieka [28, 30]. Co więcej takim drobnoustrojem można było nadać taksonomiczną przynależność i na tej podstawie

przewidzieć właściwości w porównaniu do drobnoustrojów pokrewnych. Oczywiście na podstawie tylko sekwencji, rzeczywista obecność czynnika i jego biologiczna rola pozostawała niejasna, nie było zatem mowy o doświadczalnym odtworzeniu choroby, a więc wypełnieniu 3-go postulatu Kocha. W nawiązaniu jednakże do zasad Falkova, zgodnie z którymi wprowadzenie genu do szczepu niezdolnego skutkującego ekspresją kodowanej cechy niezbędnej do rozwoju choroby, mogłaby wypełniać ten postulat [9, 10].

Zagrożeniem dla metod genotypowych w ustalaniu przyczyny choroby nie było jednak niewypełnienie postulatów Kocha przez identyfikowany nimi czynnik ale ich ekstremalna czułość. PCR wykrywał bowiem po raz pierwszy DNA lub RNA drobnoustrojów na poziomie porównywalnym do zanieczyszczenia nim używanych odczynników, czy wielu anatomicznych miejsc organizmu człowieka czy zwierzęcia [30]. Tak więc technologiczny postęp i powszechne wykorzystywanie amplifikacji i sekwencjonowania napotyka na barierę w postaci trudności z wyeliminowaniem zanieczyszczeń DNA lub RNA nie mających związków z czynnikiem etiologicznym choroby. Co więcej, kiedy sekwencjonowaniu poddaje się produkt amplifikacji otrzymany w próbówce przestaje on mieć anatomiczną ciągłość z procesem chorobowym w tkance i trudniej ten potencjalny związek udowodnić. W nawiązaniu do tego, techniki *in situ* wydają się pewniejsze w dokumentowaniu takiego powiązania. Techniki hybrydyzacji z wykorzystaniem sond dają szansę wykrycia DNA lub RNA bezpośrednio w tkance oraz powiązanie obserwowanych zmian z oddziaływaniem wykrytego czynnika. Techniki te są powszechnie wykorzystywane w diagnostyce mikrobiologicznej połowy lat 80 XX wieku [1]. W gruncie rzeczy wykrywana przez nie sekwencja wskazywała na fizyczną obecność poszukiwanego czynnika w tkankach zwierzęcia czy człowieka. Wynikająca jednak ze stosowania wspomnianych metod trudność w udowodnieniu związku przyczynowego pomiędzy wykrywaną sekwencją a chorobą to brak pewności czy sekwencja ta pochodzi od organizmu żywego czy martwego. Podobnie rzecz się ma w odniesieniu do wykrywanych czynników stanowiących mikroflorę przejściową, komensaliczną, oportunistyczną itp. [4, 35, 37]. Do tego należy również dodać wysokie genetyczne zróżnicowanie niektórych czynników zakaźnych, jak np. wirusów HIV, SNV (Sin Nombre Virus), które tworzą klony pokrewnych jednakże odrębnych wirusów u poszczególnych gospodarzy [21].

Czy zatem w oparciu o metody pozwalające na wykrycie specyficznej sekwencji patogenu można mówić o jego związku przyczynowym z chorobą? Fredricks i Relman sugerują, że tak, jeżeli:

- sekwencja domniemanego patogenu będzie obecna u większości chorych, preferencyjnie w miejs-

- cach i tkankach uznanych za chorobowo zmienne,
- sekwencje kodujące czynniki chorobotwórczości będą nieobecne lub tylko pojedyncze ich kopie można znaleźć u osobników zdrowych,
  - wraz z zanikiem choroby liczba kopii specyficznych sekwencji dla patogenu ulegać będzie obniżeniu oraz wzrośtowi wraz z remisją choroby,
  - sekwencje patogenu wykrywane są przed powstaniem choroby lub ich liczba koreluje z ostrością przebiegu lub natężeniem zmian patologicznych,
  - właściwości drobnoustroju rozpoznanego na podstawie sekwencji są zgodne z właściwościami grupy drobnoustrojów, do których należy,
  - możliwe jest wykazanie korelacji pomiędzy wykrytą *in situ* sekwencją patogenu a zmianami spowodowanymi przez patogen w tkance lub innym miejscu jego przebywania i
  - możliwe jest odtworzenia choroby rozpoznawanej na podstawie wykrycia specyficznych sekwencji patogenu [11].

#### 4. Chorobotwórczość versus choroba

Badania Roberta Kocha i na ich podstawie sformułowane postulaty jednoznacznie udowodniły związek przyczynowy pomiędzy określonym czynnikiem i wywołaną przez niego chorobą. Z drugiej jednak strony przyczyniły się do utrwalenia schematycznego i prostego sposobu myślenia o chorobie, jako wyniku oddziaływania jednego szczególnego czynnika [3, 16, 17]. Powiązanie przyczyny choroby z jednym czynnikiem wynikało z pracy Kocha nad takimi chorobami zakaźnymi, do których ustanowione postulaty się odnosiły, jak np. gruźlica czy węglik. Zgodnie z tym założeniem węglik jest wywołany tylko przez laseczkę węglika, gruźlica przez prątki gruźlicy a dur brzuszny przez pałeczki duru. Schemat zaproponowany przez Kocha pokazywał, że dana choroba nie wystąpi, jeżeli nie będzie domniemanego czynnika przyczynowego i nie zaistnieją wynikające z postulatów szczególne warunki do jej powstania [15, 26]. Taki model myślenia dominował w medycynie XIX wiecznej i początku XX w. W odpowiedzi na pojawiające się z czasem pytania o przyczynę chorób, szczególnie niezakaźnych, jak np. cukrzyca czy chorób nowotworowych, dynamicznie rozwijająca się epidemiologia dość szybko weryfikuje jednoczynnikowy model przyczyny choroby na rzecz wielu czynników [3, 6, 12, 17, 22, 25].

Już w początkach XX wieku stawało się jasne, że określenie chorobotwórczy w odniesieniu do drobnoustroju nie jest synonimem wywołujący chorobę. Okazywało się bowiem, że w przypadkach epidemii niektórych chorób, czynniki je wywołujące były izo-

lowane zarówno od chorych z objawami choroby, jak i osobników asymptomatycznych. Klasycznym przykładem obrazującym wspomniane zjawisko jest zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych spowodowana przez *Neisseria meningitidis*. Podczas epidemii tej choroby chorobotwórcze oddziaływanie bakterii ujawnia się tylko u niewielkiego odsetka osobników zakażonych. Większość pozostaje zdrowa, chociaż wspomniane bakterie u nich występują. Podobnie rzecz się ma w odniesieniu do chorobotwórczych gronkowców i paciorkowców obecnych u wielu osób, które jednak nie wykazują objawów chorobowych [2, 4, 37]. Jeszcze w początkach XX wieku, Kolber proponował nazywać taki stan sub-zakażeniem, znanym również, jako nosicielstwo [20]. Przykłady te pokazują, jak niejasne są pojęcia chorobotwórczy, niechorobotwórczy, jak również ograniczona pozostaje koncepcja patogenyzy choroby w oparciu o postulaty Kocha, zgodnie z którymi czynnik chorobotwórczy nie powinien być obecny u osobników, którzy objawów choroby nie wykazują. Stan nosicielstwa tłumaczono pewną formą adaptacji drobnoustroju do gospodarza w wyniku, której u tego ostatniego nie dochodziło do powstawania zmian chorobowych, natomiast drobnoustrój wykazywał pewną formę odporności na czynniki immunologiczne. Z czasem okazało się, że taki drobnoustrój indukuje odpowiedź immunologiczną, co uznano za zjawisko korzystne, ponieważ doprowadzało ono do ochrony przed rozwojem ostrej formy choroby. Na przykładzie *Salmonella Typhi* okazało się jednak, że nosicielstwo może przechodzić w aktywne zakażenie, co pokazuje, że obecność określonych drobnoustrojów u gospodarza stanowi ciągle zagrożenie chorobą. Nawet współcześnie, mechanizmy nosicielstwa nie są do końca zrozumiałe. Przyjmuje się, że jest to wielopłaszczyznowe, podlegające regulacjom na wielu poziomach oddziaływanie pomiędzy gospodarzem i drobnoustrojem, doprowadzające do zachowania pewnej równowagi w wyniku, której nie dochodzi do rozwoju choroby ale również nie dochodzi do eliminacji drobnoustroju [4, 27, 34]. Pod koniec XX wieku wyniki badań na poziomie molekularnym dostarczyły dowodów na genomowe zróżnicowanie patogenów i niepatogenów. W większym stopniu, wynikającymi z tego właściwościami drobnoustrojów, próbowano tłumaczyć mechanizmy patogenyzy niż relacjami pomiędzy drobnoustrojami a gospodarzem. Podział na organizmy patogenne i niepatogenne był zasadny i zrozumiały w odniesieniu do klasycznych czynników etiologicznych chorób zakaźnych w minionych czasach. Powszechne wprowadzenie sanitacji, szczepień, surowic odpornościowych, czy chemioterapii, praktycznie spowodowało wyeliminowanie klasycznych patogenów i problemu chorób zakaźnych w przeważającej części świata. Wprowadzenie jednak terapii kortykosteroidowej, środków cytotoksycznych,

upowszechnienie transplantologii i chirurgii inwazyjnej a także katastroficzna epidemia HIV i podobnych wirusów u zwierząt i człowieka, spowodowały wzrost populacji osobników z osłabionym układem immunologicznym, wrażliwych na zakażenia drobnoustrojami uważanymi wcześniej za niechorobotwórcze [2, 4, 5, 22, 31, 32]. Do dominacji określonych patogenów przyczyniła się również selekcja antybiotykowa bakterii prowadzona od lat 40 XX wieku [5, 7]. Zjawisko to na przykładzie czynników etiologicznych zakażenia krwi u człowieka można przeanalizować następująco: początkowo w zakażeniach krwi dominowała mikroflora Gram-dodatnia, która następnie została wyparta przez bakterie Gram-ujemne, aby ponownie pod koniec XX wieku powróciły zakażenia drobnoustrojami Gram-dodatnimi i grzybami.

Wraz z udziałem w zakażeniach u określonych gospodarzy drobnoustrojów uważanych za niechorobotwórcze na znaczeniu straciło szereg definicji ukutych wcześniej dla określenia zależności pomiędzy gospodarzem i drobnoustrojem, jak np. mikroflora saprofityczna, komensalizm a pojawiło się szereg nowych, jak np. zakażenia szpitalne, jatrogenne, bezobjawowy nosiciel, nowe (emerging) i powracające zakażenia (reemerging) [4, 33, 34].

Komensalizm definiowany, jako forma oddziaływania pomiędzy drobnoustrojem a gospodarzem w wyniku, której nie dochodzi do dostrzegalnych, przynoszonych gospodarzowi szkód nie zawsze udaje się w takiej formie obronić. Drobnoustroje, które stanowią mikroflorę komensaliczną pojawiły się we wczesnym okresie życia gospodarza, kiedy jego niedojrzały układ immunologiczny nie był w stanie stworzyć przeciwko nim efektywnej bariery. Tym niemniej drobnoustroje te pobudzają do odpowiedzi układ immunologiczny gospodarza i być może dzieje się tak na skutek niedostrzeganego uszkodzenia przez nie tkanek, na których bytują. Niektóre z nich uważane za komensaliczne, jak np. *E. coli*, czy *C. albicans*, które wcześniej zasiedlają określone nisze u noworodków mogą również doprowadzać do zakażenia i chorób. Przykładem niech będzie zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych spowodowane przez *E. coli* w pierwszym miesiącu, czy zakażenia *C. albicans* w pierwszym roku życia noworodków człowieka [4, 35, 37].

Pojawiły się również trudności, szczególnie wobec decyzji o podjęciu antybiotykoterapii, w odróżnianiu patogenów od czynników naturalnie zasiedlających określone nisze ekologiczne. Można to prześledzić również na przykładzie *Candida albicans*, którego występowanie w wielu różnych miejscach organizmu gospodarza to zakażenie czy tylko refleks zasiedlania? [2, 4, 5]. Podobnie obecność *Pseudomonas aeruginosa* w środowisku intensywnej terapii to zanieczyszczenie, czy zasiedlenie przez bakterie określonego środowiska?

[7] W przypadku zakażenia z reguły podejmuje się terapię, unika się natomiast takiej interwencji w odniesieniu do mikroflory zasiedlającej, obawiając się ubocznych skutków podjętego postępowania, w tym głównie indukcji lekooporności. Różnicowanie na patogeny i mikroflorę zasiedlającą jest trudne w sytuacji izolacji drobnoustrojów np. z rany, czy miejsc, które naturalnie pozostają sterylne. Wynika to często z niedostatecznej wiedzy na temat mikroflory zasiedlającej w patogenezie określonej choroby i relacji pomiędzy drobnoustrojem i gospodarzem podczas rozwoju zakażenia [2].

Do tego dochodzi jeszcze kolejny termin dla określenia mikroflory kolonizującej, definiowany, jako zdolnej do zasiedlania określonych nisz w zróżnicowanym czasie, w trakcie, którego powodowane uszkodzenia tkanek są znaczące. Z kolei długotrwała kolonizacja w wyniku, której dochodzi do powstania zmian patologicznych nazywana jest zakażeniem przetrwałym i przykładem może być powstawanie ziarniników w wyniku zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* [4].

Tak więc komensalizm, kolonizacja i zakażenie przetrwałe w trakcie jego trwania, można uznać za pewne formy zakażenia, które łączy jedna cecha, tj. zdolność drobnoustrojów do wywoływania zróżnicowanych, od bardzo nieznacznych do istotnych uszkodzeń w organizmie gospodarza. W trakcie kolonizacji w wyniku namnażania się drobnoustrojów stopień uszkodzeń może być odpowiednio wyższy co z kolei w większym stopniu indukuje reakcję obronną gospodarza doprowadzając czasami do eliminacji drobnoustrojów, kończąc stan kolonizacji. Podobne efekty uzyskuje się w wyniku prowadzonej chemioterapii czy immunizacji. W sytuacji jednak braku eliminacji drobnoustrojów rozwija się stan zakażenia przetrwałego, czasami prowadzący nawet do śmierci na skutek postępującego uszkodzenia tkanek.

W koncepcji patogenu wysuniętej przez Casadevall i Pirofski podkreśla się, że jest to czynnik zdolny do wywoływania zmian patologicznych, których rozległość zależna jest od reakcji obronnej gospodarza [4]. Istotą zakażenia są zatem zmiany patologiczne będące wynikiem reakcji pomiędzy drobnoustrojem i gospodarzem, które często są niezbędne do indukcji specyficznej odpowiedzi immunologicznej. Istotą choroby jest natomiast kliniczne manifestowanie się uszkodzeń powstałych w wyniku interakcji pomiędzy drobnoustrojem i gospodarzem. Uszkodzenia i manifestowanie się zmian może mieć również miejsce po wyeliminowaniu drobnoustroju, np. w wyniku chemioterapii. Tak się dzieje na skutek reakcji organizmu np. na endotoksynę *E. coli* uwolnioną w wyniku śmierci komórek tych bakterii, czy w wyniku indukcji immunologicznych mechanizmów prowadzących do autoagresji, jak np. ma to miejsce w następstwie zakażeń mykoplazmami czy paciorkowcami (reumatyczne uszkodzenie

stawów i zastawek serca). To powoduje, że objawy choroby utrzymują się dłużej, nawet po formalnym usunięciu wywołujących ją czynników. W sensie klinicznym choroba ma więc ścisły związek z uszkodzeniami w organizmie gospodarza i indukcją odpowiedzi immunologicznej w wyniku bezpośredniej reakcji komórek układu odpornościowego z antygenami patogenu [4, 34].

W rozważaniach nad zakażeniem i chorobą należy również podkreślić w tym procesie rolę samego gospodarza i sprawność jego mechanizmów obronnych [22]. To powoduje bowiem, że te same drobnoustroje u jednego będą stanowiły florę komensalną, a u drugiego będą doprowadzały do rozwoju zakażenia i manifestowania się jego objawów. Oddziaływanie określonych czynników zjadliwości drobnoustrojów będzie ściśle uzależnione od wrażliwości na nie i potencjalnych możliwości ich neutralizowania przez określonego gospodarza. Jeżeli ponownie przywołamy w tym celu *C. albicans*, jako przykład drobnoustrojów komensalnych u jednych gospodarzy, to te same drobnoustroje u osobników z zaburzeniami odporności, leczonych długotrwale antybiotykami, czy noworodków z niedojrzałym układem immunologicznym będą powodowały zakażenie. Wydaje się, że jedyną cechą, którą stale możemy odczytać z relacji towarzyszących drobnoustrojowi i gospodarzowi jest potencjalne uszkodzenie komórek i tkanek gospodarza przez drobnoustroje. Jego stopień wyznacza definicje tej zależności, którą możemy określić komensalizmem, kolonizowaniem organizmu przez drobnoustroje czy zakażeniem. Konsekwencją tych zależności jest choroba, w której obraz czynnika patogenego i niepatogenego jest zaciemniony i niezgodny z koncepcją mikrobiologicznej patogenyzy chorób zbudowaną w oparciu o postulaty Kocha [4, 11, 27].

## 5. Podsumowanie

Pionierskie badania Roberta Kocha przyczyniły się do opracowania metody, dzięki której można było wykazać związek etiologiczny pomiędzy czynnikiem zakaźnym i odpowiadającą mu chorobą [24, 40]. Wkrótce okazało się, że tzw. postulaty Kocha mają ograniczenia metodyczne i epistemologiczne. Tym niemniej przez kolejne dekady, jak również i w czasach nam współczesnych w większym lub mniejszym stopniu w oparciu o nie zależności takie staramy się ustalać. O tym, że nie w każdym przypadku drobnoustroje spełniają ustanowione reguły wkrótce przekonał się sam ich Twórca podczas pracy nad przecinkowcami cholery, które wykrywano również u ludzi zdrowych, co było niezgodne z postulatem drugim. Z czasem zaczęto tworzyć wyjątki od zasad Kocha np. w odniesieniu do mikroorganizmów, które ich nie spełniały. W ten sposób wyróżniono drobnoustroje,

które nie hodują się na sztucznych pożywkach, wiele drobnoustrojów, których nie można od siebie odróżnić na podstawie charakterystycznych objawów chorobowych ponieważ wszystkie powodują taką samą chorobę, jak np. zapalenie nerek, czy wreszcie drobnoustroje, z których każdy może powodować wiele chorób, jak np. *Streptococcus pyogenes* odpowiedzialny za anginę, szkarlatynę, różę itp. [17, 34].

Dalsze prace nad *Vibrio cholerae* i odkrycie środowiskowego rezerwuaru tych bakterii w śluzowej otoczce niebiesko-zielonych alg a także wpływu na ich namnażanie się temperatury wód oceanicznych i zmian klimatycznych wpłynęły na opracowanie bio-kompleksowego modelu ryzyka wystąpienia cholery. Uwzględnił on molekularne podłoże chorobotwórczości bakterii, ale również wiązał wystąpienie choroby z socjalno-bytowymi uwarunkowaniami ludzi i zmianami klimatycznymi [23]. Tak więc cholera po ponad 100 latach od ustanowienia postulatów Kocha stała się przykładem bio-kompleksowego podejścia do ustanowienia związku przyczynowego pomiędzy chorobą a drobnoustrojem. W podejściu Kocha i jemu współczesnych do przyczyny choroby, dominuje przekonanie o ważności pojedynczego drobnoustroju lub jego toksycznego produktu. Okrycie biofilmów uświadomiło badaczom rolę w tym procesie konsorcjów drobnoustrojów czy polimikrobiologicznych kompleksów będących swego rodzaju protokankami i w takiej formie uorganizowania uczestniczącymi w procesach patofizjologicznych [3, 6, 17, 25]. Nie zawsze przy takiej formie organizacji drobnoustrojów daje się zauważyć związki przyczynowe pomiędzy jednym gatunkiem bakterii i zakażeniem obejmującym jedną specyficzną tkankę. Wydaje się, że kolejny przełom w myśleniu o przyczynie choroby zakaźnej spowodowany jest wykryciem czynników gąbczastych encefalopatii. Prionowa hipoteza tych chorób stanowi pewnego rodzaju test dla przyjętego współcześnie modelu analizy przyczyny choroby budowanej na podstawie wielu przesłanek, jak np.:

- odtwarzalnej korelacji pomiędzy czynnikiem etiologicznym a objawami klinicznymi, zmianami patologicznymi i epidemiologią zakażenia,
- pewnego stanu zgodności pomiędzy przewidywaną na działanie danego czynnika reakcją z faktyczną reakcją demonstrowaną ze strony gospodarza,
- postępującego kumulowania się zmian, jako konsekwencji procesów patofizjologicznych toczących się w organizmie, czy
- zahamowania procesów patofizjologicznych w wyniku podjętej interwencji biomedycznej [36].

W kontekście wieloprzyczynowej teorii powstania choroby czynnik biologiczny jest tylko czynnikiem inicjującym postępujące dalej i kumulujące się zmiany.

## Piśmiennictwo

1. Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H.: Phylogenic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143–169 (1995)
2. An G, Shapiro M., Crandall M., Issa M., West M.: Critical illness as ecological collapse: modeling the impact of stress, ischemia, and therapy on host-bacterial ecology of the gut. *Surg. Infect.* **9**, 277 (2008)
3. Broadbent A.: Causation and model of disease in epidemiology. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* **40**, 302–311 (2009)
4. Casadevall A., Pirofski L.A.: Host-pathogen interactions: Basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect. Immun.* **68**, 6511–6518 (2000)
5. Clatworthy A.E., Pierson E., Hung D.T.: Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 161–167 (2007)
6. Colwell R.W.: Biocomplexity. The 99<sup>th</sup> Annual General Scientific Meeting of the American Society for Microbiology, McCormick Place, Chicago, IL, 1999.
7. Eachempati S.R., Hydo L.J., Barie P.S.: Does de-escalation of antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia affect the likelihood of recurrent pneumonia or mortality in critically ill patients? *J. Trauma.* **66**, 1343–1348 (2009)
8. Ewans A.S.: Limitation of Koch's postulates. *Lancet*, **ii**, 1277–1278 (letter) (1977)
9. Falkov S.: Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev. Infect. Dis.* **10** (suppl. 2), 274–276 (1988)
10. Falkov S.: Molekular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity—a personal recollection 15 years later. *Nature Rev. Microbiol.* **2**, 67–72 (2004)
11. Fredricks D.N, Relman D.A.: Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 18–33 (1996)
12. Garcion E., Naveilhan P., Berger F., Wion D.: Cancer stem cells: beyond Koch's postulates. *Cancer Lett.* **278**, 3–8 (2009)
13. Gerber R.H., Rea T.H.: *Mycobacterium leprae* (Leprosy, Hansen's disease). In Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin T. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 5<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, New York, 2000, s. 2608–2616
14. Gradmann C.: Robert Koch and the pressure of scientific research: tuberculosis and tuberculin. *Medical History*, **45**, 1–32 (2001)
15. Gradmann C.: A matter of methods: the historicity of Koch's postulates 1840–2000. *Medizinhist. J.* **42**, 121–148 (2008)
16. Hanson R.P.: Koch is dead. *J. Wildlife Dis.* **24**, 193–200 (1988)
17. Inglis T.J.I.: Principia aetiologica: taking causability beyond Koch's postulates. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1419–1422 (2007)
18. Johnson R.T., Gibbs C.J.: Koch's postulates and slow infections of nervous system. *Arch. Neurol.* **30**, 36–38 (1974)
19. Kaufmann S.H.E., Schaible U.E.: 100<sup>th</sup> anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends in Microbiol.* **13**, 469–475 (2005)
20. Kolmer J.A.: Infection. In Infection, immunity and biologic therapy. W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pa., 1924, s. 58–83
21. Ksiazek T.G., Peters C.J., Rollin P.E., Zaki S., Nichol S., Spiropoulou C., Morzunov S., Feldmann H., Sanchez A., Khan A.S.: Identification of a new North American hantavirus that cause acute pulmonary insufficiency. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **52**, 117–123 (1995)
22. Levin B.R., Antia R.: Why we don't get sick: the within-host population dynamics of bacterial infections. *Science*, **292**, 112–115 (2001)
23. Lipp E.K., Huq A., Colwell R.R.: Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 757–770 (2002)
24. Loeffler F.: Untersuchungen über die Bedeutung der Mikroorganismen für die Entstehung der Diphtherie beim Menschen, bei der Taube und beim Kalbe. *Mitth. A. d. Kaiserl. Gesundheitsamtes*, **2**, 421–499 (1884)
25. Mortimer P.P.: Five postulates for resolving outbreaks of infectious disease. *J. Med. Microbiol.* **52**, 447–451 (2003)
26. Munch R., Biel S.S.: Expedition, experiment and expertise reflected in Robert Koch's assets. *Sudhoffs Arch.* **82**, 1–29 (1998)
27. O'Toole D.: Monitoring and investigating natural disease by veterinary pathologists in diagnostic laboratories. *Vet. Pathol.* **47**, 40–44 (2010)
28. Relman D.A.: Detection and identification of previously unrecognized microbial pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 382–389 (1998)
29. Rivers T.M.: Viruses and Koch's postulates. *J. Bacteriol.* **33**, 1–12 (1937)
30. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487–491 (1988)
31. Seal J.B., Morowitz M., Zabornia O., An G., J.C. Alverdy.: The molecular Koch's postulates and surgical infection: a view forward. *Surgery*, **147**, 757–765 (2010)
32. Shapiro J.A.: Bacteria are small but not stupid: cognition, natural genetic engineering and socio-bacteriology. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* **38**, 807–819 (2007)
33. Stephens D.S., Moxon E.R., Adams J., Altizer S., Antonovics J., Aral S., Berkelman R., Bond E., Bull J., Gauthen G., Farley M.M., Glasgow A., Glasser J.W., Katner H.P., Kelley S., Mittler J., Nahmias A.J., Nichol S., Perrot V., Pinner R.W., Schrag S., Small P., Thrall P.H.: Emerging and reemerging infectious diseases: a multidisciplinary perspective. *Am. J. Med. Sci.* **315**, 64–75 (1998)
34. Tanz R.R., Shulman S.: Streptococcal pharyngitis: the carrier state, definition, and management. *Pediatr. Ann.* **27**, 281–285 (1998).
35. Tannock G.W.: The normal microflora: an introduction. In G.W Tannock (ed.). Medical importance of the normal microflora. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 1999, s. 1–23
36. Walker L., Le Viene H., Jucker M.: Koch's postulates and infectious proteins. *Acta Neuropathol.* **112**, 1–4 (2006)
37. West S.A., Griffin A.S., Gardner A., Diggle S.P.: Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 597–607 (2006)
38. Wilson K.H., Blitchington R.B., Greene R.C.: Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1942–1946 (1990)
39. Woese C.R.: Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221–271 (1987)
40. Zwolska Z.: Robert Koch – twórca bakteriologii chorób zakaźnych. Wyd. Via Medica, Gdańsk, 2006