POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Kwartalnik
Tom 51
Zeszyt 1•2012
STYCZEŃ – MARZEC

CODEN:
PMKMAV 51 (1)
2012

Index Copernicus ICV = 9,00 (2010)
Impact Factor ISI = 0,108 (2010)

http://www.pm.microbiology.pl

RADA REDAKCYJNA

JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski),
JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki), DANUTA DZIERŻANOWSKA (Centrum Zdrowia Dziecka),
EUGENIA GOSPODAREK (Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy), JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski),
WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków), MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny),
ANDRZEJ PASZEWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski),
ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki), ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski),
BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański),
ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii),
STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Państwowy Zakład Higieny),
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

REDAKCJA

JERZY HREBENDA (redaktor naczelny), JACEK BIELECKI (zastępca),
BOHDAN STAROŚCIAK (sekretarz), MARTA BRZÓSTKOWSKA (korekta tekstów angielskich)

ADRESY REDAKCJI

Redaktorzy:

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (22) 554 13 05/304, fax (22) 554 14 04
e-mail: j.hrebenda@biol.uw.edu.pl; jbielecki@biol.uw.edu.pl

Sekretarz

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Oczki 3 (parter), 02-007 Warszawa, tel. (22) 628 08 22, (22) 621 13 51
e-mail: zmf@wum.edu.pl

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy

Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej, Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin,
tel./fax: (91) 46 616 51, 52, lub fax: (91) 46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@sci.pam.szczecin.pl

STALI RECENZENCI:

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

CZASOPISMO WYDAWANE Z FINANSOWĄ POMOCĄ
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

Informacja o zdjęciu na okładce:

Komórki *Bacillus subtilis* zawierające geny *hly* i *iap Listeria monocytogenes* w komórkach nabłonkowych
linii Int 407. SEM LEO, powiększenie 8500x
(fot. ś.p. Jarosław Wiśniewski – Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii UW)

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Nakład 1150, Objętość 12 arkuszy wyd., Papier offser 80 g

Skład i druk: *Zakład Wyd. Letter Quality*, tel. 22 631 45 18, 607 217 879
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: *Jerzy Grzegorkiewicz*

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 1, 3–15
http://www.pm.microbiology.pl

MECHANIZMY WIRULENCJI *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Katarzyna Szczypa[1], Joanna Wilemska[1], Waleria Hryniewicz[1], Izabela Sitkiewicz[1]*

[1] Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków, Warszawa

Wpłynęło w listopadzie 2011 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka zakażeń powodowanych przez *S. pyogenes*. 3. Czynniki wirulencji *S. pyogenes.* 3.1. Adhezyny. 3.2. Czynniki sprzyjające rozprzestrzenianiu się infekcji w organizmie gospodarza. 3.3. Toksyny. 4. Regulacja ekspresji czynników wirulencji. 5. Podsumowanie

Patogenicity mechanisms of *Streptococcus pyogenes*

1. Introduction. 2. Infections caused by *S. pyogenes*. 3. Virulence factors of *S. pyogenes.* 3.1. Adhesins. 3.2. Factors of infections in host organism. 3.3. Toxins. 4. Regulation of virulence factors expression. 5. Summary

Abstract: The group A *Streptococcus* (*Streptococcus pyogenes*, GAS) is responsible for over 600 million infections and over half million deaths a year. GAS is a major human pathogen which causes diseases ranging from mild superficial infections of the throat or skin, up to severe systemic and invasive diseases such as necrotizing fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome. Nowadays, post-infection sequelae such as glomerulonephritis and rheumatic fever are also alarming medical problems worldwide.

Molecular analyses of streptococcal virulence carried by multiple centers worldwide, suggest the presence of a complex mechanism that coordinates pathogenesis. It involves a broad range of unique protein virulence factors, as M protein, superantigens, proteases and DNases, affecting tissues and the host's immune system.

Detailed analyses of individual virulence factors as well as regulatory systems that coordinate expression of virulence factors are the first steps on the way to develop innovative strategies for diagnostics and treatment. This review aims to highlight the epidemiology of *S. pyogenes* and summarize the current state of knowledge about the mechanisms of its virulence.

Słowa kluczowe: *Streptococcus pyogenes*, czynniki wirulencji, regulacja ekspresji czynników wirulencji
Key words: *Streptococcus pyogenes*, virulence factors, regulation of virulence factor expression

1. Wstęp

Streptococcus pyogenes (paciorkowiec grupy A, GAS) jest wiodącym czynnikiem zakażeń u ludzi a zakażenia nim, także o charakterze epidemii, opisywano już w ubiegłych tysiącleciach. Przełomowe odkrycia z zakresu biologii i chorobotwórczości tego drobnoustroju, jakich dokonano w przeszłości, stanowią istotną podstawę wiedzy na temat tego patogenu.

Obecnie pomimo ogromnego postępu nauk medycznych w zakresie diagnostyki, leczenia i epidemiologii zakażeń, na całym świecie nadal notuje się wysoką (ponad 700 milionów rocznie) zapadalność na różnego rodzaju infekcje wywołane przez GAS. Sytuacja ta dotyczy w szczególności krajów rozwijających się. Według Światowej Organizacji Zdrowia szacunkowa liczba zgonów w wyniku poważnych infekcji GAS wynosi ponad pół miliona przypadków rocznie i umiejscawia *S. pyogenes*, pośród najczęstszych patogenów człowieka [9]. Co ważniejsze, od końca lat 80-tych XX w., z wielu krajów zaczęły napływać doniesienia o ciężkich uogólnionych zakażeniach *S. pyogenes* skutkujących wysoką śmiertelnością. Liczba tego typu zakażeń ciągle wzrasta i może stanowić poważny problem diagnostyczno-terapeutyczny [18].

2. Charakterystyka zakażeń powodowanych przez *S. pyogenes*

S. pyogenes może wywoływać zakażenia o różnym stopniu ciężkości. W literaturze istnieje wiele systemów klasyfikacji chorób wywoływanych przez ten drobnoustrój [18, 19, 84]. Zakażenia można podzielić na na: (i) łagodne i ciężkie, (ii) inwazyjne i nieinwazyjne, (iii) ropne i odległe nieropne powikłania, oraz (iv) powierzchniowe i głębokie. W tabeli I przedstawiono zakażenia wywoływane przez GAS, uwzględniając podział na trzy grupy: zakażenia nieinwazyjne, inwazyjne oraz nieropne następstwa o podłożu immunologicznym.

Do najczęstszych zakażeń wywoływanych przez *S. pyogenes* należą ostre zapalenie gardła i migdałków podniebiennych (angina paciorkowcowa) oraz płonica. Szacuje się, że rocznie na świecie występuje ponad 600 milionów przypadków paciorkowcowego zapalenia gardła, w tym ponad 550 milionów dotyczy krajów rozwijających się [9]. Infekcja gardła o etiologii GAS występuje przede wszystkim u dzieci w wieku 5–15 lat, natomiast dorośli chorują rzadziej [74, 83]. Należy jednak podkreślić, że zakażenia GAS nie ograniczają się do wieku dziecięcego ani do zapaleń gardła. Znacznie poważniejszymi w bezpośrednich skutkach są zakażenia skóry

* Autor korespondencyjny: Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Narodowy Instytut Leków; Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa; isitkiewicz@cls.edu.pl

Tabela I

Typy infekcji wywoływane przez *S. pyogenes*

Rodzaj choroby	Przykłady zakażeń
nieinwazyjna	zapalenie gardła lub migdałków podniebiennych (*pharyngitis, tonsilitis*) płonica (*scarlatina*) liszajec zakaźny (*impetigo contagiosa*) zapalenie zatok (*sinusitis*) zapalenie ucha środkowego (*otitis media*) zapalenie pochwy (*vaginitis*)
inwazyjna	przebieg lekki i średnio-ciężki: zakażenie tkanki podskórnej (*cellulitis*), bakteriemia, róża (*erysipelas*) zapalenie mięśni (*myositis*) zapalenie płuc (*pneumonia*), zakażenie połogowe (*infectio puerperalis*) zapalenie stawów (*arthritis*), przebieg ciężki: paciorkowcowy zespół wstrząsu toksycznego, martwicze zapalenie powięzi (*fascitis necrotisans*) zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (*meningitis cerebro-spinalis*)
nieropne następstwa o podłożu immunologicznym	gorączka reumatyczna (*morbus rheumaticus*), kłębuszkowe zapalenie nerek (*glomerulonephritis*)

i tkanki podskórnej. Wiadomo bowiem, iż w dużej liczbie przypadków inwazyjna postać zakażenia GAS wywodzi się z tych schorzeń, które ze względu na lokalizację bardzo łatwo mogą ulec rozprzestrzenieniu [65]. Dane szacunkowe na temat występowania paciorkowcowego zapalenia skóry dotyczą głównie krajów rozwijających się, gdzie rocznie może występować około 118 milionów takich przypadków [9].

Liszajec zakaźny jest miejscowym ropnym zapaleniem skóry, występującym najczęściej u dzieci w wieku od 2 do 5 lat. Sposób przenoszenia liszajca nie został dobrze poznany, wiadomo jednak, że choroba jest wysoce zakaźna, rozprzestrzenia się szczególnie łatwo w dużych zbiorowiskach dzieci, poprzez bezpośredni kontakt z osobą zainfekowaną oraz przedmioty wspólnego użytku. Choroba występuje częściej w klimacie gorącym i wilgotnym, gdzie może mieć związek z ukąszeniami owadów, jak również w zimniejszych klimatach w sezonie letnim. Rozprzestrzenianiu zakażenia sprzyja też niski poziom higieny [7].

Cellulitis to zakażenie o różnorodnej lokalizacji, obejmujące głębsze warstwy skóry oraz tkankę podskórną. Do zakażenia dochodzi wskutek uszkodzenia naskórka lub inną drogą poprzez naczynia krwionośne, bądź limfatyczne. Zmiany najczęściej lokalizują się w obrębie kończyn dolnych. Pierwszymi objawami są rumień i obrzęk, ale nie tak wyraźnie odgraniczony jak w róży [7].

Róża (*erysipelas*) jest typowym dla GAS ostrym, wyraźnie odgraniczonym od otaczających tkanek, stanem zapalnym skóry, obejmującym również skórne naczynia limfatyczne. Zaliczana jest często do zakażeń o charakterze inwazyjnym, o przebiegu zazwyczaj nieciężkim. Charakterystycznym objawem tej choroby jest połyskujący rumień, który może być zlokalizowany na twarzy, tułowiu lub kończynach dolnych. W tym ostatnim przypadku predysponowane są osoby chorujące na zaburzenia krążenia żylnego, u których wystąpiło np. owrzodzenie podudzi. Zachorowanie na różę może mieć również związek z przeprowadzonymi wcześniej zabiegami chirurgicznymi (róża przyranna) [71]. Chociaż róża występująca na twarzy może w ciągu 4–10 dni ulec samowyleczeniu, to nieleczona może doprowadzić do poważnych powikłań. W przypadku kończyn i tułowia, kiedy chorobą są objęte większe powierzchnie ciała, może dojść do zakażeń uogólnionych lub nawrotów choroby (róża nawrotowa) prowadzących do trwałych zmian w naczyniach chłonnych [50].

Istotnymi postaciami zakażeń wywoływanych przez *S. pyogenes* są piorunujące infekcje o charakterze inwazyjnym prowadzące do zgonu nawet w ciągu kilku lub kilkunastu godzin od wystąpienia pierwszych, często mało charakterystycznych objawów choroby [9].

Inwazyjna choroba wywoływana przez paciorkowce grupy A jest definiowana, jako ciężkie zakażenie z objawami, któremu towarzyszy izolacja *S. pyogenes* z fizjologicznie jałowych tkanek i narządów (krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn otrzewnowy, opłucnowy, osierdziowy, stawowy, bioptat tkankowy). Kliniczne prezentacje inwazyjnej choroby GAS można podzielić na trzy grupy [42]:

- Paciorkowcowy zespół wstrząsu toksycznego (*streptococcal toxic shock syndrome*, STSS) – bardzo szybko postępująca choroba powodująca spadki ciśnienia tętniczego/wstrząs, wysoka gorączkę, rozlaną wysypkę oraz niewydolność wielonarządową;

- Martwicze zapalenie powięzi (*necrotising fascitis*, NF) – gwałtownie postępujące zakażenie w obrębie tkanki podskórnej i powięzi przebiegające z wtórną martwicą skóry;
- Zakażenia, w których nie stwierdzono objawów STSS lub NF, ale charakteryzujące się izolacją *S. pyogenes* z fizjologicznie jałowych tkanek i narządów. W grupie tej znajduje się bakteriemia o nieznanym źródle pochodzenia oraz infekcje takie jak zapalenie płuc, opon-mózgowo rdzeniowych, otrzewnej, szpiku i kości, septyczne zapalenie stawów oraz zakażenia okołoporodowe (gorączka połogowa).

STSS i NF są niezwykle ciężkimi postaciami zakażenia GAS. Szacuje się, że około 20% pacjentów z NF i 60–80% z STSS umiera. Śmiertelność wśród pacjentów z innymi typami inwazyjnych zakażeń GAS wynosi 10–15% [30]. W badaniach przeprowadzonych w Polsce, które dotyczyły inwazyjnych zakażeń GAS zaobserwowano wysoki odsetek śmiertelności wynoszący 35% dla wszystkich analizowanych przypadków i sięgający 50% wśród chorych z STSS [87].

W przypadku około 3% niedoleczonych, przewlekłych lub nawracających infekcji gardła lub skóry dochodzi do występowania odległych w czasie nieropnych powikłań [18]. Powikłania w postaci gorączki reumatycznej (*acute rheumatic fever*, ARF) czy kłębuszkowego zapalenia nerek (*acute poststreptococcal glomerulonephritis*, APSGN) są wynikiem reakcji autoimmunologicznych na antygeny GAS. Gorączka reumatyczna stanowi wieloukładowy odczyn zapalny, występujący u młodych, podatnych osób w następstwie infekcji gardła. Autoimmunizacja stanowiąca podłoże ARF rozwija się w mechanizmie mimikry molekularnej. Podobieństwo epitopów antygenowych GAS i tkanek ludzkich powoduje, że wyzwolona przez paciorkowce humoralna i komórkowa odpowiedź immunologiczna zwraca się przeciw własnym tkankom gospodarza wyzwalając proces zapalny. Zmiany zapalne w strukturach serca występują u 40–60% chorych, u których wystąpiła gorączka reumatyczna [26]. Choroby serca wywołane powikłaniami po przebytym zakażeniu są jedną z głównych przyczyn zgonów związanych z infekcjami grupą A *Streptococcus*, a w niektórych krajach świata jak np. USA, powikłania po infekcjach GAS są najczęstszą przyczyną nabytych chorób serca u dzieci [9]. Leczenie penicyliną we wczesnym etapie rozwoju paciorkowcowej anginy może zapobiec temu powikłaniu.

Mechanizm powstawania kłębuszkowego zapalenia nerek jest nie do końca poznany. Wiadomo, że przyczyną uszkodzenia kłębuszków nerkowych jest odkładanie się w nich krążących we krwi kompleksów immunologicznych, w których skład wchodzą antygeny GAS i skierowane przeciw nim przeciwciała gospodarza oraz składowe dopełniacza [18]. Liczba zachorowań na APSGN jest niska w krajach o wysokim statusie ekonomicznym, ale nadal wysoki poziom obserwuje się w krajach rozwijających się [9].

3. Czynniki wirulencji *S. pyogenes*

S. pyogenes koduje wiele, stale badanych, lecz ciągle nie do końca poznanych, czynników zjadliwości i posiada złożony mechanizm wywoływania zmian chorobowych. Umożliwiają one tej bakterii kolonizację organizmu gospodarza, obronę przed układem immunologicznym, rozprzestrzenianie się w zakażonym organizmie oraz niszczenie komórek i tkanek. Spośród wielu czynników zjadliwości, jakimi szczepy GAS dysponują, do najważniejszych należą te, które są związane z komórką bakterii, takie jak białko M wraz z białkami towarzyszącymi, białka wiążące fibronektynę, enzym C5a-peptydaza czy kwas hialuronowy. W patogenezie zakażeń *S. pyogenes* istotną rolę pełnią również wytwarzane przez ten drobnoustrój substancje pozakomórkowe, takie jak streptolizyna O i S, enzymy (proteazy, DNazy, streptokinaza), toksyny cytolityczne (hemolizyny) oraz toksyny pirogenne (egzotoksyny, superantygeny) [18]. Tabela II przedstawia podział czynników wirulencji GAS ze względu na ich funkcję w procesie patogenezy.

3.1. Adhezyny

Pierwszym etapem infekcji jest kontakt pomiędzy bakteriami a komórkami gospodarza. Adhezja jest procesem o mechanizmie dwuetapowym, w którym w początkowej fazie zaangażowane są czynniki nieswoiste, związane z właściwościami fizykochemicznymi bakterii, takimi jak potencjał elektrostatyczny czy właściwości hydrofobowe [14]. Kluczową rolę w zjawisku, jakim jest adhezja, odgrywają jednak przede wszystkim interakcje specyficzne, w których pośredniczą obecne na powierzchni bakterii białka (adhezyny) warunkujące wysoką swoistość mechanizmów. Adhezyny wiążą się specyficznie z receptorami znajdującymi się na powierzchni komórek człowieka, którymi są często białka błonowe należące do super-rodziny integryn, a oddziaływanie między gospodarzem a patogenem może mieć charakter bezpośredni, albo przebiegać za pośrednictwem glikoprotein (fibronektyna, laminina, witronektyna) wchodzących w skład macierzy międzykomórkowej (*extracellular matrix*, ECM) [58].

Główną adhezyną, a jednocześnie głównym czynnikiem wirulencji GAS, jest opisane po raz pierwszy ponad 80 lat temu przez R. Lancefield powierzchniowe białko M [43]. Od momentu odkrycia jest przedmiotem intensywnych badań, a informacje o jego budowie i roli w patogenezie GAS są stale uzupełnianie, między innymi dzięki poznaniu sekwencji całego genomu bakteryjnego

Tabela II

Czynniki wirulencji GAS i ich rola w procesie patogenezy

Funkcja czynnika wirulencji	Czynnik wirulencji
Czynniki odpowiedzialne za adhezję	białko M kwasy lipotejchoiowe (LTA) białka wiążące fibronektynę i kolagen apolipoproteinaza (*serum opacity factor* SOF)
Czynniki ograniczające fagocytozę i zaburzające działanie dopełniacza	otoczka z kwasu hialuronowego HA białko M peptydazy C5a, SpeB SIC DNazy (streptodornazy)
Czynniki degradujące chemokiny	peptydaza C5a (*scpA*), SpyCEP
Czynniki degradujące łańcuchy immunoglobulin	IdeS/MAC SpeB GRAB
Inwazyny, czynniki degradujące składowe macierzy zewnątrzkomórkowej oraz tkanki	hialuronidaza streptokinaza leukocydyny enolaza SpeB
Czynniki ułatwiające ucieczkę z pułapek nukleofilowych	DNazy
Czynniki destabilizujące błony komórkowe	streptolizyny S i O fosfolipaza A2
Superantygeny	egzotoksyny pirogenne SPE różnych typów (A, B, C, G, H, I, J, K, L, M) SmeZ i SSA
Inne	antygen T, peptydoglikan ściany komórkowej (aktywuje alternatywną drogę dopełniacza) białka szoku cieplnego (Clp) białka kolagenopodobne (SclA i SclB)

wielu szczepów *S. pyogenes* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=Streptococcus%20pyogenes). Białko M jest prawdopodobnie dzisiaj jednym z najlepiej opisanych czynników bakteryjnych odpowiedzialnych za zjadliwość. Jego złożona struktura, funkcja, właściwości immunochemiczne i zmienność antygenowa wydają się unikatowe [21].

Białko M ma α-helikalną budowę, transportowane jest na zewnątrz komórki przez sortazę i kotwiczone w błonie i ścianie komórkowej bakterii przy pomocy C-końca. W jego budowie wyróżnia się cztery powtarzające się regiony od A do D, różniące się wielkością, sekwencją aminokwasów oraz poziomem zmienności. Najbardziej konserwatywne części to regiony C i D, odpowiednio z trzema i czterema powtórzeniami, za którymi znajdują się fragmenty położone w ścianie i błonie komórkowej: fragment C-końcowy, cześć hydrofobowa i region bogaty w prolinę i glicynę. Zmienny region B (*semi-variable region*, SVR) z pięcioma powtórzeniami jest położony tuż za wysoce zmienną częścią białka M (*hypervariable region*, HVR). Analiza struktury białka wykazała, że w jego budowie występują nieregularne strukturalne motywy typu „coiled coil" [54], które najprawdopodobniej wpływają na wiązanie się do białka M fibrynogenu. Podobna, nieregularna budowa występuje w α-helikalnych częściach białek takich jak miozyna, tropomiozyna, laminina, keratyna i vimentyna [21]. Składająca się z regionu A i części N-terminalnej, hiper-zmienny fragment jest najbardziej wysuniętą na zewnątrz komórki częścią białka. Opsonizujące przeciwciała rozpoznające białko M produkowane są głównie przeciwko temu epitopowi, a już drobne zmiany sekwencji aminokwasowej wpływają znacząco na specyficzność rozpoznawania tego rejonu przez przeciwciała anty-M. Z tego powodu sekwencja aminokwasowa fragmentu HVR jest wyznacznikiem serotypu. Ze względu na niewygodę serotypowania przy użyciu surowic, opracowano metodę wyznaczania typu białka M poprzez sekwencjonowanie fragmentu genu kodującego region HVR. Obecnie znanych jest ponad 90 serotypów i ponad 200 *emm* typów białka M, a określone typy serologiczne odpowiadają typom genetycznym białka M [2]. Przeciwciała skierowane przeciwko białku M zabezpieczają przed ponownym zakażeniem GAS, są jednak serotypowo specyficzne, więc zakażenie określonym serotypem będzie zabezpieczało wyłącznie przed infekcją szczepami o takim samym serotypie [84]. Fragment HVR wydaje się być również związany

z obroną przeciw peptydom antybakteryjnym jak LL-37 i mCRAMP [44].

Główną funkcją, jaką w patogenezie zakażenia pełni białko M, jest zapobieganie fagocytozie przez leukocyty wielojądrzaste i makrofagi gospodarza. Unikanie fagocytozy przez GAS z udziałem białka M jest złożonym, nie do końca wyjaśnionym procesem, w który zaangażowane są zarówno region HVR, jak i cześć konserwatywna C. Uważa się, że paciorkowcowe białko M wiąże się z dwoma białkami regulującymi aktywację dopełniacza, z czynnikiem H (complement factor H, CFH) w regionie C i z białkiem FHL-1 (factor-H-like protein-1) w regionie HVR [66]. W wyniku tej interakcji następuje zakłócenie procesu fagocytozy na skutek degradacji cząsteczek C3b, będących opsoninami przyłączanymi do powierzchni bakterii w procesie alternatywnej aktywacji dopełniacza [6]. Po raz pierwszy interakcję pomiędzy białkami układu dopełniacza i *S. pyogenes* opisali Horstmann i wsp. Wykazali oni, że region C białka M *S. pyogenes* wiąże się z czynnikiem H [32]. Późniejsze badania nad szczepami serotypu M4 wykazały, że inny składnik klasycznej aktywacji układu dopełniacza, białko C4b, może być przyłączany do N-końcowego fragmentu białka M i efektywnie prowadzić do zaburzenia procesu fagocytozy [37]. Dodatkowo tak zwane *M-like proteins* mają zdolność wiązania czynnika C4a, będącego regulatorem drogi klasycznej aktywacji dopełniacza [66, 88].

Wiadomo również, że białko M wpływa na rozwój paciorkowcowego wstrząsu toksycznego. Herwald i wsp. [28] zaobserwowali, że GAS po przedostaniu się do krwi osoby zakażonej, uwalnia z powierzchni białko M, które następnie poprzez swój region B tworzy duże konglomeraty z białkiem osocza, fibrynogenem. Powstałe w trakcie zakażenia kompleksy łączą się z β2 integrynami takimi jak CD11b/CD18) na powierzchni neutrofili, doprowadzając do ich aktywacji. Dodatkowo białko M łączy się poprzez IgG z receptorem FcγRII, co w końcowym efekcie prowadzi do zwiększonego uwalniania białka wiążącego heparynę (HBP), peptydu LL-37, albuminy i enzymów litycznych [21]. Uaktywnione leukocyty, wiążąc się z śródbłonkiem naczyń krwionośnych, doprowadzają do jego uszkodzenia. Efektem uszkodzenia śródbłonka jest nieszczelność naczyń, w czego konsekwencji następuje spadek ciśnienia tętniczego, wykrzepianie wewnątrznaczyniowe oraz uszkodzenia narządów. Są to objawy charakteryzujące wstrząs toksyczny. Po raz pierwszy kompleksy białko M-fibrynogen zidentyfikowano w materiale biopsyjnym pobranym od pacjenta z martwiczym zapaleniem powięzi i STSS [28].

Wyniki badań Påhlmana i wsp. [63], ponadto wykazały, że uwolnione do krwiobiegu białko M może bezpośrednio poprzez interakcję z receptorami błonowymi TLR2 (*Toll-like receptors 2*) aktywować monocyty do produkcji cytokin pro-zapalnych. Pośrednia aktywacja monocytów następuje z kolei w wyniku oddziaływania HBP z integrynami na ich powierzchni. Białko M może dodatkowo wiązać się do integryn GPIIb/IIIa i receptora FcγRII na powierzchni trombocytów prowadząc do ich aktywacji, co wpływa nie tylko na agregację płytek i tworzenie skrzepów, ale również na dodatkowe pobudzenie monocytów i neutrofili.

Adhezja GAS, w której pośredniczą dwie domeny białka M, konserwatywna i zmienna, zależy od jego typu serologicznego. Szczepy *S. pyogenes* o typie M1 i M3 mają zdolność wiązania fibronektyny, w której pośredniczy część zmienna białka M. Natomiast w przypadku szczepów o typie M6 w procesie adhezji bierze udział domena konserwowana białka M, a receptorem jest białko CD46 skórnych keratynocytów [14, 61]. Od dawno wiadomo, że niektóre serotypy białka M są nieprzypadkowo związane z pewnymi klinicznymi postaciami zakażeń GAS i pojawiają się w różnym czasie i w różnym geograficznym rozmieszczeniu. Na przykład szczepy GAS o serotypie M1 odpowiedzialne są za wiele różnych przypadków zakażeń inwazyjnych, które mogą mieć charakter epidemii w różnych regionach świata a szczepy M28 często powodują gorączkę połogową [24]. Wiele ciężkich postaci infekcji GAS, takich jak STSS i NF, jest powiązanych z występowaniem szczepów o serotypie M1 i M3 [4], natomiast za epidemie gorączki reumatycznej odpowiedzialne są szczepy GAS o serotypie M18 [80].

Pierwszą scharakteryzowaną adhezyną *S. pyogenes* był kwas lipoteichowy (*lipoteichoic acid*, LTA), który nadaje komórce właściwości hydrofobowe poprzez tworzenie kompleksów z białkiem M i białkami towarzyszącymi (*M-like proteins*) [16]. Przez wiele lat przypuszczano, że LTA wraz z białkiem M są jedynymi czynnikami odpowiedzialnym za przyleganie GAS do komórek eukariotycznych. Dzisiaj jednak wiadomo, że funkcję tę spełnia przynajmniej siedemnaście struktur powierzchniowych komórki bakteryjnej GAS. Pośród nich udokumentowaną rolę pełnią otoczka z kwasu hialuronowego oraz szereg innych białek takich jak F1, F2 i R28 [14].

Kodowane przez gen *prtF1*, odkryte w roku 1992 białko F1 posiada zdolność wiązania fibronektyny [14]. Ostatnie badania wykazały jego rolę w procesie wnikania GAS do wnętrza komórek nabłonkowych gospodarza. Wykazano, że większość *S. pyogenes* ulega internalizacji do wakuoli komórkowych w trakcie ich stacjonarnej fazy wzrostu. Znajdujące się we wnętrzu komórki bakterie mogą także stanowić rezerwuar i potencjalne źródło nawrotu zakażenia [60, 77]. Dodatkowo taka lokalizacja osłabia możliwości zwalczania ich przez układ odpornościowy gospodarza oraz daje bakteriom dostęp do łożyska krwi [19].

Ważną adhezyną GAS, produkowaną przez ponad połowę serotypów *S. pyogenes*, jak również przez inne

gatunki paciorkowców i gronkowców jest apolipoproteinaza SOF (*serum opacity factor*) [17]. Nazwa SOF pochodzi od zdolności do wywoływania zmętnienia surowicy ssaków poprzez tworzenie dużych agregatów lipidowych. Ponadto udowodniono zdolność apolipoproteinazy do wiązania fibronektyny, fibrynogenu i fibuliny-1 [15], a rola jaką pełni jest ściśle powiązana z hamowaniem procesu fagocytozy [13].

3.2. Czynniki sprzyjające rozprzestrzenianiu się bakterii w organizmie gospodarza

Po wstępnym kontakcie komórek bakterii z tkankami gospodarza, rozpoczyna się ich rozprzestrzenianie w organizmie. W proces ten zaangażowany jest cały szereg czynników wirulencji, będących w większości enzymami hydrolitycznymi różnych klas, takimi jak hialuronidazy, proteazy, lipazy, kolagenazy i nukleazy. Bakteryjne proteinazy, jako aktywne proteolitycznie enzymy pozakomórkowe są bardzo istotnym czynnikiami zjadliwości, uczestniczącym w procesie rozprzestrzeniania się bakterii chorobotwórczych oraz destrukcji tkanek gospodarza. Mogą one także brać udział w procesie unikania przez bakterie swoistych i nieswoistych mechanizmów obronnych gospodarza oraz modulacji jego układu immunologicznego podczas zakażenia i stanu zapalnego. Wiele proteinaz bakteryjnych należących do klas takich jak proteazy serynowe, cysteinowe i asparaginowe może mieć znaczenie dla wyżej wymienionych zjawisk [89].

Rozprzestrzenianie się infekcji GAS w organizmie gospodarza jest możliwe przede wszystkim dzięki zdolności tej bakterii do degradacji elementów macierzy międzykomórkowej. Podstawowym enzymem odpowiedzialnym za degradację tkanek gospodarza jest proteaza cysteinowa SpeB [38]. Wytwarzana w toku zakażenia proteaza SpeB degraduje fibronektynę i witronektynę, białka wchodzące w skład struktury macierzy pozakomórkowej gospodarza, istotne dla procesu homeostazy. Proteolityczna aktywacja ludzkich metaloproteaz macierzy międzykomórkowej prowadzona przez SpeB, pośrednio uczestniczy w masywnych uszkodzeniach tkanek gospodarza, które są charakterystyczne dla martwiczego zapalenia powięzi i innych infekcji inwazyjnych GAS. Dodatkowo SpeB degraduje kininogen do bradykininy, co powoduje zaburzenia w przepuszczalności naczyń krwionośnych będących jednym z objawów STSS. Proteaza SpeB posiada również aktywność wobec ludzkich immunoglobulin. Przeciwciała IgG są rozcinane na dwa fragmenty Fab i jeden Fc, co w znaczący sposób zaburza zarówno humoralną jak i komórkową odpowiedź immunologiczną gospodarza. Dodatkowa SpeB powoduje rozszczepienie COOH-końca ciężkiego łańcucha przeciwciał IgA, IgD i IgM na mniejsze fragmenty a w przypadku działania na ciężki łańcuch immunoglobuliny IgE powoduje jej degradację. SpeB aktywuje natomiast interleukiny 6 i 8 oraz czynnik martwicy nowotworów [11]. Toksyna SpeB posiada także inne właściwości immunmodulacyjne takie jak aktywacja czynników prozapalnych wpływających na obraz infekcji *S. pyogenes*. Aktywuje interleukinę IL-ß, która jest silnym mediatorem zapalnym [12]. Prowadzone obserwacje pacjentów z różnym stopniem nasilenia choroby inwazyjnej GAS, takich jak na przykład róża, zapalenie tkanki łącznej, płuc, bakteriemia, septyczne zapalenie stawów, zespół wstrząsu toksycznego czy martwicze zapalenie powięzi wykazały, że wytwarzają oni zwiększoną ilość przeciwciał przeciw SpeB [52]. Sugeruje się też, że toksyna SpeB bierze udział w patogenezie APSGN wyzwalając proces zapalny w kłębuszkach nerkowych jeszcze przed akumulacją w nich kompleksów immunologicznych. Wykazano też, w surowicy pacjentów z APSGN zwiększony jest poziom przeciwciał anty-SpeB [56].

W przeciwieństwie do niespecyficznego działania SpeB, szereg proteaz wytwarzanych przez GAS oddziałuje z układem immunologicznym gospodarza w sposób wielce specyficzny. Najważniejszą z nich jest ScpA [94] – proteaza, która inaktywuje składnik C5a ludzkiego dopełniacza, co skutkuje obniżoną chemotaksją neutrofili do miejsca zakażenia [35].

Białkiem aktywności zbliżonej do SpeB jest wydzielana do środowiska proteaza cysteinowa Mac/IdeS (*immunoglobulin G endopeptidase*). W sposób gatunkowo specyficzny odcina łańcuch ciężki ludzkiego IgG, co ogranicza fagocytozę [46]. Ma ona również zdolność blokowania receptorów dla neutrofili, znajdujących się w części Fc przeciwciał już przyłączonych do komórki GAS. Mac/IdeS jest przy tym nieaktywna względem pozostałych klas immunoglobulin [46]. W proteomie *S. pyogenes* wyróżniono dwa warianty białka: IdeS/Mac-1 oraz Mac-2. Ocenia się, że obie formy alleliczne mają charakter bifunkcyjny, a jedynie w przypadku typu M28 GAS funkcja białka rozdzielona jest między endopeptydazę IgG (IdeS/Mac-1) oraz bloker receptorów w części Fc przeciwciał (Mac-2) [81]. Badania nad Mac/IdeS dotyczą również potencjalnego wykorzystania tej proteazy jako leku ukierunkowanego na leczenie schorzeń o charakterze autoimmunologicznym, wywołanym dużym stężeniem IgG krążącego we krwi po przebytej infekcji, a skierowanym przeciwko antygenom upodobnionym do ludzkich receptorów komórkowych. W ciągu 15 minut, 15 mikrogramów proteazy jest zdolne do kompletnej degradacji IgG zawartych w 1 ml ludzkiej krwi [36]. Przeprowadzone testy *in vivo* wskazują na doskonałe efekty leczenia kłębuszkowego zapalenia nerek, zarówno w odniesieniu do krążących w surowicy kompleksów immunologicznych, jak i też wobec tych odkładanych w kłębuszkach nerkowych [95].

Ważnym czynnikiem modulującym odpowiedź immunologiczną na infekcję GAS jest niedawno odkryta

zewnątrzkomórkowa proteaza degradująca chemokiny, SpyCEP/ScpC (*S. pyogenes cell envelope protease*). Podobnie do SpeB, SpyCEP jest zakotwiczona w ścianie komórkowej a w przypadku wysokiej produkcji znajduje się ją również poza komórką. SpyCEP wykazuje aktywność proteolityczną względem ludzkiej interleukiny 8 (IL8/CXCL8), a także innych tkankowych czynników chemotaktycznych, takich jak białko chemotaktyczne dla granulocytów 2 (*granulocyte chemotactic protein* 2, GCP-2/CXCL6), GROβ/MIP-2α/CXCL2 (*macrophage inflammatory protein 2-alpha, growth-related protein beta*) oraz GRO (*growth-related oncogene alpha*, GROα/CXCL1) [41, 86]. Działanie SpyCEP obniża zdolność aktywacji neutrofili i makrofagów, zabezpieczając tym samym komórki patogenu przed fagocytozą. SpyCEP jest czynnikiem typowym dla szczepów silnie inwazyjnych oraz zdolnych do głębokiego penetrowania tkanek gospodarza. Wpływ na wirulencję i zasięg uszkodzeń tkanki potwierdzony został w eksperymentach z użyciem mutantów izogenicznych *S. pyogenes*, jak również rekombinantów *Lactococcus lactis*, które po nabyciu genu kodującego SpyCEP powodowały w modelach zwierzęcych silnie inwazyjny przebieg zakażenia, z możliwością utrzymywania się patogenu w górnych drogach oddechowych, jak również penetracji do płuc [86].

Kolejnym białkiem, którego funkcja sprzyja zdolności blokowania układu immunologicznego gospodarza, jest SIC (*streptococcal inhibitor of complement-mediated lysis*). SIC nie jest proteazą, wiąże się z kompleksem C5b-C9 dopełniacza i blokuje jego końcową cytotoksyczną aktywność [1]. Wykazano, że produkcja SIC ma znaczący wpływ na przebieg kolonizacji śluzówek w mysim modelu infekcji, a bakterie pozbawione genu *sic* są znacznie gorszymi kolonizatorami [48]. Produkcja SIC ma również wpływ na adhezję, a być może również internalizację do komórek eukariotycznych [29].

Innymi enzymami uczestniczącymi w degradacji tkanek gospodarza są enolaza, streptokinaza i hialuronidaza. Hialuronidaza hydrolizuje kwas hialuronowy, będący składnikiem bazowym tkanki łącznej, przez co umożliwia atakowanie i rozkład tkanek miękkich w przebiegu zakażenia inwazyjnego [18]. Enolaza i streptokinaza działają jako receptory dla ludzkiego plazminogenu. W naturalnych warunkach, aktywacja plazminogenu i jego przemiana w aktywną proteazę serynową, czyli plazminę, to element kaskady przeciwzakrzepowej związanej z procesem gojenia ran, odnowy tkanek i angiogenezy [5]. Streptokinaza jest białkiem, które pozwala bakteriom wykorzystać naturalne procesy przebiegające w organizmie gospodarza w celu destrukcji tkanek. Na powierzchni komórki bakteryjnej streptokinaza formuje kompleks 1:1 z ludzkim (specyficzność gatunkowa) plazminogenem, co prowadzi do przemiany w aktywną formę. Po aktywacji, plazmina na powierzchni komórki GAS degraduje białka matriks, błonę podstawną, kolagen i tkanki gospodarza, przez co wpływa na rozprzestrzenianie się bakterii w organizmie gospodarza. Inwazyny mają wpływ na wywiązanie się nieropnych powikłań. Produkcję streptokinazy łączy się z występowaniem kłębuszkowego zapalenia nerek, a wysoki poziom przeciwciał skierowanych przeciw enolazie wykrywany jest w przypadku choroby reumatycznej.

DNazy to kolejny element związany z ucieczką GAS przed układem immunologicznym gospodarza. Podczas początkowych etapów infekcji bakteryjnej, komórki układu immunologicznego ulegają lizie w miejscu infekcji, co w efekcie prowadzi do uwolnienia chromosomalnego DNA i utworzenia tzw. „pułapek nukleofilowych". DNAzy produkowane przez GAS pozwalają na hydrolizę chromosomalnego DNA i na uwolnienie się bakterii z tych pułapek, a następnie ich dalsze rozprzestrzenianie się poza początkowe miejsce infekcji [85].

3.3. Toksyny

Cechą charakterystyczną *S. pyogenes* jest produkcja szeregu toksyn, zaliczanych do dwóch klas: cytolizyn oraz toksyn pirogennych (superantygenów). Główne cytolizyny GAS to streptolizyna O i streptolizyna S, które odpowiedzialne są za tworzenie otworów w błonach komórkowych, a co za tym idzie, lizę komórek gospodarza. Bezpośrednim efektem działania streptolizyn jest hemoliza typu β, widoczna podczas wzrostu na podłożu wzbogaconym krwią [57].

Inną grupą toksyn destabilizujących błonę komórek eukariotycznych są fosfolipazy. W szczepach GAS zidentyfikowano fosfolipazę A2 (*streptococcal phospholipase A2*, Sla), opisaną po raz pierwszy dzięki analizie genomu serotypu M3 [4]. Wykazuje ona wysoki poziom podobieństwa strukturalnego do toksyny zawartej w jadzie australijskiego węża z gatunku *Pseudonaja textilis*. Zdolność do produkcji Sla związana jest bezpośrednio ze wzrostem zjadliwości szczepów GAS i miała najprawdopodobniej wpływ na klonalne rozprzestrzenianie się wysoce wirulentnych klonów serotypu M3 [79].

Niezwykle ważną rolę w patogenezie zakażeń GAS pełnią wytwarzane przez ten drobnoustrój paciorkowcowe egzotoksyny pirogenne (*streptococcal pyrogenic exotoxin*, Spes). Są one zewnątrzkomórkowymi białkami, w większości należącymi do dużej rodziny toksyn pirogennych o właściwościach superantygenów (*pyrogenic toxin superantigens*, PTSAgs). Toksyny Spes są spokrewnione z wytwarzanymi przez *Staphylococcus aureus* PTSAgs, do których należą toksyna wstrząsu toksycznego (*toxic shock syndrome toxin-1*, TSST-1) i gronkowcowe enterotoksyny [52]. Do superantygenów zalicza się toksyny, które powodują nadmierną mobilizację układu immunologicznego z pominięciem drogi klasycznej, wywołując niespecyficzną poliklonalną aktywację

limfocytów T [82]. Dzieje się tak dlatego, że toksyny te nie reagują z unikatowym miejscem wiążącym antygen, jakim jest kompleks TCR (T-cell receptor) i MHC (*major histocompatibility complex*) klasy II, ale przyłączają się bezpośrednio do zewnętrznej powierzchni receptora TCR (fragment zmienny łańcucha β, Vβ) i do zewnętrznej części cząsteczki MHC klasy II. W ten sposób pobudzone zostają liczne klony limfocytów T (ok. 20%) o różnej swoistości antygenowej, których wspólną cechą jest region Vβ receptora TCR [52]. Aktywowane przez superantygeny limfocyty T uwalniają cytokiny prozapalne, takie jak czynnik martwicy nowotworu alfa, TNF-α (*tumor necrosis factor alpha*), interleukiny IL-1 i IL-6 czy interferon gamma IFN-γ (*nterferone gamma*), które wydzielane w nadmiarze działają silnie uszkadzajaco na tkanki ustroju, prowadząc do objawów wstrząsu toksycznego [20]. Co ciekawe, białko M działa nie tylko pozapalnie, ale również jako superantygen [64].

W chwili obecnej znanych jest ponad 11 supearatygenów produkowanych przez *S. pyogenes.* Są to: paciorkowcowe egzotoksyny pirogenne SpeA, SpeC, SpeEF, SpeG, SpeH, SpeI, SpeJ, SpeK, SpeL, SpeM, paciorkowcowa egzotoksyna mitogenna Z (*streptococcal mitogenic exotoxin*, SmeZ) i paciorkowcowy superantygen (*streptococcal superantigen*, SSA). Geny kodujące je często zlokalizowane są w obrębie mobilnych elementów genetycznych [3]. Częstość występowania poszczególnych toksyn wykazuje ogromne zróżnicowanie w obrębie populacji *S. pyogenes* i może stanowić cechę diagnostyczną [8]. Niestety funkcja superantygenów w procesie patogenezy nie jest jeszcze dokładnie scharakteryzowana. Stosunkowo najlepiej poznane są toksyny SpeA i SmeZ, których wytwarzanie jest prawdopodobnie związane z zespołem wstrząsu toksycznego i płonicą (SpeA) [27, 96] oraz chorobą Kawasaki (SmeZ) [20].

Pierwszą opisaną toksyną *S. pyogenes* była toksyna SpeA [52]. Jej działanie wiązano początkowo z wystąpieniem gorączki oraz powstawaniem charakterystycznej wysypki w płonicy. W latach 80 XX wieku, zaczęto intensywnie monitorować pojawianie się inwazyjnych szczepów GAS, których wzmożoną zjadliwość kojarzono ze zdolnością do produkcji toksyn [68]. Schlievert i wsp. udowodnili, że wśród królików zainfekowanych izogenicznymi szczepami GAS, różniącymi się obecnością lub brakiem genu *speA* w fagu T12, STSS rozwinął się tylko u tych, którym podano szczepy GAS wytwarzające toksynę SpeA. Dodatkowo zaobserwowano, że podana królikom szczepionka zawierająca antygen SpeA chroniła je nie tylko przed wystąpieniem objawów STSS, ale również przed rozwojem martwicy mięśni i powięzi. Sugeruje to, że SpeA, choć nie jest jedyną toksyną odpowiedzialną za rozwój STSS, przeciwciała gospodarza skierowane przeciw SpeA mogą odgrywać znaczącą rolę w zapobieganiu ciężkim postaciom infekcji GAS [72]. Także zakrojone na szeroką skalę badania epidemiologiczne wykazały, że pośród wszystkich toksyn pirogennych, toksyna SpeA ma szczególny związek z wystąpieniem STSS. Zaobserwowano, że większość inwazyjnych szczepów GAS o serotypach M1 i M3, odpowiedzialnych za STSS, produkuje toksynę SpeA i posiada gen *speA* [27, 45, 72]. W analizie inwazyjnych szczepów GAS izolowanych na terenie Polski wykryto gen *speA* w 24% szczepów [87] Dzisiaj wiadomo, że sytuacja jest bardziej złożona, a za inwazyjność paciorkowców grupy A odpowiada kompleksowe działanie wzajemnie uzupełniających się czynników zjadliwości [52].

Inną toksyną, która wraz z egzotoksyną SpeA ma związek z pojawianiem się STSS u pacjentów z ciężkimi zakażeniami GAS jest kodowana przez faga CS112 toksyna SpeC [22]. Jest to toksyna zdecydowanie mniej poznana w porównaniu z toksyną SpeA, między innymi z powodu jej słabej immunogenności i dużej niestabilności [53]. Toksyna SpeC jest związana z wieloma inwazyjnymi zakażeniami GAS i została opisana w epidemicznych szczepach o typie M18 odpowiedzialnych za gorączkę reumatyczną [73]. Wśród inwazyjnych szczepów izolowanych w Polsce *speC* występuje w aż 41.5% szczepów [87].

Wśród produkowanych przez GAS superantygenów na uwagę zasługuje po raz pierwszy wykryta w roku 1992 w inwazyjnych szczepach GAS o serotypie M3 toksyna SSA (***s**treptococcal **s**uper**a**ntigen*), kodowana przez bakteriofagowy gen *ssa*. Interesującym jest fakt, że gen ten wykazuje aż 60% homologii w sekwencji aminokwasowej z genem enterotoksyny gronkowcowej SE (*staphylococcal enterotoxin*) B i C [55].

Inna wytwarzana przez GAS toksyna pirogenna, SpeF, jest wielofunkcyjnym białkiem opisywanym wcześniej jako czynnik mitogenny (*mitogenic factor*, MF). Dzisiaj wiadomo, że spełnia on również funkcję superantygenu oraz posiada aktywność ciepłostałej nukleazy [34]. Sklonowana po raz pierwszy w roku 1993, kodowana przez gen umieszczony na chromosomie bakteryjnym toksyna SpeF nie wykazuje podobieństwa do żadnej toksyny i występuje tylko u *S. pyogenes* [97, 98]. Zaobserwowano związek pomiędzy poziomem uwalnianej toksyny SpeF i ciężkością zakażenia GAS. Poprzez badania fragmentów tkanek pobranych od pacjentów z zakażeniami skóry o etiologii *S. pyogenes*, wykazano, że toksyna SpeF była obecna we wszystkich ocenianych materiałach biopsyjnych, a profil uwalnianych cytokin oraz proliferacyjna odpowiedź na działanie SpeF był zależny od stopnia rozwoju stanu zapalnego w zainfekowanej przez GAS tkance gospodarza [59]. Istnieją też dane sugerujące, że ilość produkowanej przez GAS toksyny SpeF jest różna i zależna od typu białka M. Szczepy o typie M1 i M3, które są związane z zakażeniami inwazyjnymi produkują jej znacznie więcej niż pozostałe GAS o innych typach białka M [51].

4. Regulacja ekspresji czynników wirulencji

Zdolność patogenu do syntezy określonych czynników wirulencji nie jest równoznaczna z opisem jego rzeczywistej zjadliwości. W świetle ostatnich badań, niezwykle istotny wpływ na procesy patogenezy wydają się mieć procesy regulujące ekspresję czynników wirulencji, zwłaszcza w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska.

U bakterii takich jak paciorkowce, gdzie nie występuje na dużą skalę kontrola regulacji poprzez alternatywne czynniki sigma, za regulację odpowiedzi na bodźce środowiskowe odpowiedzialne są głównie tak zwane systemy dwuskładnikowe (*Two Component Systems*, TCS). System taki składa się z kinazy, zakotwiczonej w błonie komórkowej, odbierającej sygnał ze środowiska i białka regulatorowego. Po odebraniu sygnału przez kinazę, którym może być na przykład zmiany stężenia jonów metali [25], następuje fosforylacja lub defosforylacja regulatorowego białka. Fosforylacja białka regulatorowego wpływa na zmianę jego konformacji i umożliwia przyłączanie (lub odłączanie) od regulowanych promotorów. Stopień komplikacji systemów przekazywania sygnału może wzrastać, a w kaskadzie regulacyjnej uczestniczą wtedy dodatkowe białka przekaźnikowe. Systemy z dodatkowymi składnikami noszą nazwę „*phosphorelay*" [69]. Strategia bezpośredniej reakcji na bodziec umożliwia wytwarzanie białek o charakterze adhezyn i inwazyn tylko w warunkach osiągnięcia docelowej niszy ekologicznej. Ich aktywacja związana może być z panującymi w danym momencie warunkami środowiskowymi, a także z sygnalizacją ze strony systemu *quorum sensing* i sygnałem przekazywanym przez inne systemy dwuskładnikowe.

W zsekwencjonowanych genomach GAS znaleziono do tej pory ponad 100 niezależnych regulatorów oraz 13 systemów dwuskładnikowych [78], których sieć regulatorowa nie jest jednak w pełni poznana. Głównym, i najlepiej poznanym systemem kontrolującym wirulencję *S. pyogenes*, obecnym też w innych gatunkach paciorkowców, jest system CovRS (CsrRS) [47]. W wyniku wieloletnich badań stwierdzono, iż jest on odpowiedzialny za regulację wielu czynników wirulencji takich jak otoczka z kwasu hialuronowego, białka wiążące kolagen, proteazy (Mac, SpeB, ScpA, SpyCEP), DNazy i streptolizyna S [23, 90]. System ten jest jednym z nielicznych, dla których zidentyfikowano sygnał środowiskowy, w postaci stężenia dwuwartościowych jonów magnezu [25].

Drugim po CovRS systemem dwuskładnikowym GAS, którego funkcję udało się ustalić jest system Ihk/Irr. System ten bierze udział w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za inwazję leukocytów wielojądrzastych i obronę przed fagocytozą przez komórki układu immunologicznego [92, 93]. System ten reguluje geny zaangażowane w wirulencję (adhezyny, streptolizyna S, DNazy), jak również geny związane z odpowiedzią na stres oksydacyjny i syntezą ściany komórkowej [93].

Trzecim historycznie rozpoznanym systemem GAS o znanej funkcji jest FasBCA. Jest on dość nietypowy, ponieważ w jego skład wchodzą dwie kinazy, FasB i FasC oraz regulator FasA, przy czym cały mechanizm regulacyjny wymaga dodatkowej obecności regulatorowego RNA; *fasX*. System ten kontroluje ekspresję streptokinazy, streptolizyny S oraz białek wiążących fibronektynę [39].

Dzięki systematycznej analizie systemów regulatorowych GAS, poznano sieci regulatorowe i potencjalną funkcję kolejnych systemów, pośród których system M5005_Spy_0680/0681 (spy0874/0875, sptRS) ma wpływ na ekspresję wielu czynników wirulencji i jest odpowiedzialny za regulację metabolizmu złożonych wielocukrów [76, 78]. Inne systemy, których funkcja została poznana dzięki systematycznym analizom transkrypcyjnym to M5005_Spy_0830/0831 (regulacja metabolizmu maleinianu), M5005_Spy_0784/0785 (regulacja transport mannozy/fruktozy) oraz system M5005_Spy_1280/1281 (regulacja genów w fazie stacjonarnej) [78].

W regulacji wirulencji i odpowiedzi na warunki zewnętrzne, biorą również udział, tzw. *stand alone response regulators*, czyli regulatory, które zachowują się jak klasyczne geny regulatorowe odpowiadające na sygnał, przy czym nie udało się jak do tej pory wykryć specyficznej kinazy, która je fosforyluje/defosforyluje [40]. Mogą one pełnić funkcje nadrzędne lub podrzędne w stosunku do systemów dwuskładnikowych tzn. regulować lub być regulowane przez TCS, co dodatkowo komplikuje sieci regulatorowe.

W chwili obecnej, najlepiej scharakteryzowanym regulatorem jest regulator Mga (*multiple gene regulator of GAS*), który wpływa na ekspresję wielu adhezyn, włączając w to białko M, białka *M-like* typu Mrp, Enn, FcR, wzrost w postaci biofilmu, peptydazy C5a oraz SIC. Funkcja Mga jest związana z regulacją genów podczas fazy szybkiego wzrostu, co odzwierciedla warunki podczas inwazji tkanek i rozprzestrzeniania się bakterii w organizmie gospodarza. Zmiany w ekspresji Mga obserwowane były również w reakcji na podniesiony poziom CO_2, wahania temperatury i obniżone stężenie jonów żelazowych. Nie stwierdzono natomiast, czy jest to wpływ bezpośredni, czy warunkowany kaskadową regulacją działającą przez inne czynniki jak np. TCS. Szacuje się, iż Mga może modulować ekspresję nawet 10% genomu GAS [31].

Kolejnymi regulatorami związanymi z wirulencją są białka RofA i Nra, należące do tzw. rodziny RALP (*RofA like proteins*), a także białko Rgg (RopB). Ostatnie badania nad Rgg również wskazują, iż jest to niezwykle ważny element interakcji pomiędzy patogenem a gospodarzem [10].

Białka rodziny RALP, podobnie jak Mga, związane są z regulacją ekspresji adhezyn, streptolizyny S, SpeA i SpeB, wpływają również na ekspresję innych regulatorów, w tym zwrotną regulację Mga, CovRS, Ihk/Irr i FasBCA [40].

W przypadku wirulencji GAS, często obserwuje się istotny wpływ regulatorów pozornie z nią niezwiązanych. Dobrym przykładem może być rola regulatora metabolizmu jonów MtsR, jako molekularnego przełącznika pomiędzy inwazyjną a łagodną formą zakażenia [62] lub metabolicznego regulatora CcpA [75].

Niedawno odkryto również u *S. pyogenes* regulatorowe cząsteczki RNA, które mają wpływ na regulację wirulencji, wspomniane wcześniej, *fasX* [39], oraz *rivX* [70] i *pel* [49]. Analizy przy użyciu mikromacierzy pozwoliły na identyfikację ponad 70 nowych regulatorowych RNA o nieznanej jak dotąd funkcji [67, 91], które potencjalnie mogą być zaangażowane w regulację wirulencji.

Poza typową regulacją transkrypcji, istotne znaczenie adaptacyjne mają także mutacje w obrębie genów regulatorowych. Charakterystyka szczepów wywołujących STSS wykazała, że w 57,3% posiadały one mutacje w genach systemu CovRS i Rgg, skutkujące m.in. nadprodukcją streptolizyny O lub brakiem produkcji SpeB. Dla kontrastu, podobny genotyp występował jedynie w przypadku 1,7% izolatów nieinwazyjnych [33].

Podsumowanie

S. pyogenes jest drobnoustrojem chorobotwórczym powodującym zakażenia o różnej intensywności. Wysoka zapadalność we wszystkich regionach świata, wysoki odsetek infekcji o ciężkim przebiegu oraz dotkliwość powikłań poinfekcyjnych, sprawiają, że zaliczyć go należy do groźnych ludzkich patogenów.

W procesy adhezji do komórek gospodarza, ekspansji i kolonizacji tkanek, zaangażowany jest szereg specyficznych czynników zjadliwości i inwazyjności. Najważniejszym z nich, a przy tym najlepiej opisanym, jest białko M, którego złożona struktura, funkcja, właściwości immunochemiczne i zmienność antygenowa wydają się unikatowe. Wiadomo również, że ważną rolę w patogenezie zakażeń o przebiegu ostrym odgrywają paciorkowcowe egzotoksyny pirogenne, inwazyny oraz czynniki o charakterze proteaz i DNaz. Kontrola poziomu ich ekspresji obywa się z udziałem złożonych sieci regulacyjnych, obejmujących pojedyncze białka regulatorowe oraz wieloskładnikowe systemy przekazywania sygnału.

Podziękowania

Artykuł powstał dzięki finansowemu wsparciu z grantów NCN N N401 536140 (dla W.H.) oraz N N401 535940 (dla I.S.), środków z działalności statutowej NIL DS.5.82 i DS 5.67 (dla I.S.), oraz Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków (NPOA-Moduł)

Literatura

1. Akesson P., Sjoholm A.G., Bjorck L.: Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. *J. Biol. Chem.* **271**, 1081–1088 (1996)
2. Beall B., Facklam R., Thompson T.: Sequencing emm-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 953–958 (1996)
3. Beres S.B., Musser J.M.: Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome. *PLoS One*, **2**, e800 (2007)
4. Beres S.B., Sylva G.L., Barbian K.D., Lei B., Hoff J.S., Mammarella N.D., Liu M.Y., Smoot J.C., Porcella S.F., Parkins L.D., Campbell D.S., Smith T.M., McCormick J.K., Leung D.Y., Schlievert P.M., Musser J.M.: Genome sequence of a serotype M3 strain of group A *Streptococcus*: phage-encoded toxins, the high-virulence phenotype, and clone emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10078–10083 (2002)
5. Bergmann S., Hammerschmidt S.: Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb. Haemost.* **98**, 512–520 (2007)
6. Bisno A.: *Streptococcus pyogenes*. W: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, ed. 6 (2005)
7. Bisno A.L., Stevens D.L.: Streptococcal infections of skin and soft tissues. *N. Engl. J. Med.* **334**, 240–245 (1996)
8. Borek A.L., Wilemska J., Izdebski R., Hryniewicz W., Sitkiewicz I.: A new rapid and cost-effective method for detection of phages, ICEs and virulence factors encoded by *Streptococcus pyogenes*. *Pol. J. Microbiol.* **60**, 187–201 (2011)
9. Carapetis J.R., Steer A.C., Mulholland E.K., Weber M.: The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet. Infect. Dis.* **5**, 685–94 (2005)
10. Carroll R.K., Shelburne S.A., 3rd, Olsen R.J., Suber B., Sahasrabhojane P., Kumaraswami M., Beres S.B., Shea P.R., Flores A.R., Musser J.M.: Naturally occurring single amino acid replacements in a regulatory protein alter streptococcal gene expression and virulence in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 1956–1968 (2011)
11. Chiang-Ni C. i Wu J. J.: Effects of streptococcal pyrogenic exotoxin B on pathogenesis of *Streptococcus pyogenes*. *J. Formos. Med. Assoc.* **107**, 677–685 (2008)
12. Collin M., Olsen A.: Extracellular enzymes with immunomodulating activities: variations on a theme in *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **71**, 2983–2992 (2003)
13. Courtney H.S., Hasty D.L., Dale J.B.: Anti-phagocytic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*: binding of fibrinogen to M-related protein. *Mol. Microbiol.* **59**, 936–947 (2006)
14. Courtney H.S., Hasty D.L. i Dale J.B.: Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann. Med.* **34**, 77–87 (2002)
15. Courtney H.S., Li Y., Twal W.O., Argraves W.S.: Serum opacity factor is a streptococcal receptor for the extracellular matrix protein fibulin-1. *J. Biol. Chem.* **284**, 12966–12971 (2009)
16. Courtney H.S., Ofek I., Penfound T., Nizet V., Pence M.A., Kreikemeyer B., Podbielski A., Hasty D.L., Dale J.B.: Relationship between expression of the family of M proteins and lipoteichoic acid to hydrophobicity and biofilm formation in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One*, **4**, e4166 (2009)
17. Courtney H.S., Pownall H.J.: The structure and function of serum opacity factor: a unique streptococcal virulence determinant that targets high-density lipoproteins. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 956071 (2010)
18. Cunningham M.W.: Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 470–511 (2000)
19. Efstratiou A., Sriskandan S., Lamagni T.: What more A. β-haemolytic streptococci. W: *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, ed. 2 (2006)

20. Fraser J., Arcus V., Kong P., Baker E., Proft T.: Superantigens – powerful modifiers of the immune system. *Mol. Med. Today*, **6**, 125–132 (2000)
21. Ghosh P.: The nonideal coiled coil of M protein and its multifarious functions in pathogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **715**, 197–211 (2011)
22. Goshorn S.C., Schlievert P.M.: Bacteriophage association of streptococcal pyrogenic exotoxin type C. *J. Bacteriol.* **171**, 3068–3073 (1989)
23. Graham M.R., Smoot L.M., Migliaccio C.A., Virtaneva K., Sturdevant D.E., Porcella S.F., Federle M.J., Adams G.J., Scott J.R. i Musser J.M.: Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and *in vivo* infection modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13855–13860 (2002)
24. Green N.M., Zhang S., Porcella S.F., Nagiec M.J., Barbian K.D., Beres S.B., LeFebvre R.B., Musser J.M.: Genome sequence of a serotype M28 strain of group A *Streptococcus*: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. *J. Infect. Dis.* **192**, 760–770 (2005)
25. Gryllos I., Grifantini R., Colaprico A., Jiang S., Deforce E., Hakansson A., Telford J.L., Grandi G., Wessels M.R.: Mg(2+) signalling defines the group A streptococcal CsrRS (CovRS) regulon. *Mol. Microbiol.* **65**, 671–683 (2007)
26. Guilherme L., Kalil J., Cunningham M.: Molecular mimicry in the autoimmune pathogenesis of rheumatic heart disease. *Autoimmunity*, **39**, 31–39 (2006)
27. Hauser A.R., Stevens D.L., Kaplan E.L., Schlievert P.M.: Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from *Streptococcus pyogenes* isolates associated with toxic shock-like syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1562–1567 (1991)
28. Herwald H., Cramer H., Morgelin M., Russell W., Sollenberg U., Norrby-Teglund A., Flodgaard H., Lindbom L., Bjorck L.: M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage. *Cell*, **116**, 367–379 (2004)
29. Hoe N.P., Ireland R.M., DeLeo F.R., Gowen B.B., Dorward D.W., Voyich J.M., Liu M., Burns E.H., Jr., Culnan D.M., Bretscher A., Musser J.M.: Insight into the molecular basis of pathogen abundance: group A *Streptococcus* inhibitor of complement inhibits bacterial adherence and internalization into human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7646–7651 (2002)
30. Hoge C.W., Schwartz B., Talkington D.F., Breiman R.F., MacNeill E.M., Englender S.J.: The changing epidemiology of invasive group A streptococcal infections and the emergence of streptococcal toxic shock-like syndrome. A retrospective population-based study. *JAMA*, **269**, 384–389 (1993)
31. Hondorp E.R., McIver K.S.: The Mga virulence regulon: infection where the grass is greener. *Mol. Microbiol.* **66**, 1056–1065 (2007)
32. Horstmann R.D., Sievertsen H.J., Knobloch J., Fischetti V.A.: Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1657–1661 (1988)
33. Ikebe T., Ato M., Matsumura T., Hasegawa H., Sata T., Kobayashi K., Watanabe H.: Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. *PLoS Pathog*, **6**, e1000832 (2010)
34. Iwasaki M., Igarashi H., Yutsudo T.: Mitogenic factor secreted by *Streptococcus pyogenes* is a heat-stable nuclease requiring His122 for activity. *Microbiology*, **143** (Pt 7), 2449–2455 (1997)
35. Ji Y., McLandsborough L., Kondagunta A., Cleary P.P.: C5a peptidase alters clearance and trafficking of group A streptococci by infected mice. *Infect. Immun.* **64**, 503–510 (1996)
36. Johansson B.P., Shannon O., Bjorck L.: IdeS: a bacterial proteolytic enzyme with therapeutic potential. *PLoS One*, **3**, e1692 (2008)
37. Johnsson E., Thern A., Dahlback B., Heden L.O., Wikstrom M. i Lindahl G.: A highly variable region in members of the streptococcal M protein family binds the human complement regulator C4BP. *J. Immunol.* **157**, 3021–3029 (1996)
38. Kapur V., Topouzis S., Majesky M.W., Li L.L., Hamrick M.R., Hamill R.J., Patti J.M. i Musser J.M.: A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microb. Pathog.* **15**, 327–346 (1993)
39. Kreikemeyer B., Boyle M.D., Buttaro B.A., Heinemann M., Podbielski A.: Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (Fas) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. *Mol. Microbiol.* **39**, 392–406 (2001)
40. Kreikemeyer B., McIver K.S., Podbielski A.: Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends. Microbiol.* **11**, 224–232 (2003)
41. Kurupati P., Turner C.E., Tziona I., Lawrenson R.A., Alam F.M., Nohadani M., Stamp G.W., Zinkernagel A.S., Nizet V., Edwards R.J., Sriskandan S.: Chemokine-cleaving *Streptococcus pyogenes* protease SpyCEP is necessary and sufficient for bacterial dissemination within soft tissues and the respiratory tract. *Mol. Microbiol.* **76**, 1387–1397 (2010)
42. Lamagni T.L., Neal S., Keshishian C., Powell D., Potz N., Pebody R., George R., Duckworth G., Vuopio-Varkila J., Efstratiou A.: Predictors of death after severe *Streptococcus pyogenes* infection. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1304–1307 (2009)
43. Lancefield R.C.: The Antigenic Complex of Streptococcus Haemolyticus : I. Demonstration of a Type-Specific Substance in Extracts of *Streptococcus haemolyticus*. *J. Exp. Med.* **47**, 91–103 (1928)
44. Lauth X., von Kockritz-Blickwede M., McNamara C.W., Myskowski S., Zinkernagel A.S., Beall B., Ghosh P., Gallo R.L., Nizet V.: M1 protein allows Group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. *J. Innate Immun.* **1**, 202–214 (2009)
45. Lee P.K., Schlievert P.M.: Quantification and toxicity of group A streptococcal pyrogenic exotoxins in an animal model of toxic shock syndrome-like illness. *J. Clin. Microbiol.* **27,** 1890–1892 (1989)
46. Lei B., DeLeo F.R., Hoe N.P., Graham M.R., Mackie S.M., Cole R.L., Liu M., Hill H.R., Low D.E., Federle M.J., Scott J.R., Musser J.M.: Evasion of human innate and acquired immunity by a bacterial homolog of CD11b that inhibits opsonophagocytosis. *Nat. Med.* **7**, 1298–1305 (2001)
47. Levin J.C., Wessels M.R.: Identification of csrR/csrS, a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in group A *Streptococcus*. *Mol. Microbiol.* **30**, 209–219 (1998)
48. Lukomski S., Hoe N.P., Abdi I., Rurangirwa J., Kordari P., Liu M., Dou S.J., Adams G.G., Musser J.M.: Nonpolar inactivation of the hypervariable streptococcal inhibitor of complement gene (sic) in serotype M1 *Streptococcus pyogenes* significantly decreases mouse mucosal colonization. *Infect. Immun.* **68**, 535–542 (2000)
49. Mangold M., Siller M., Roppenser B., Vlaminckx B.J., Penfound T.A., Klein R., Novak R., Novick R.P., Charpentier E.: Synthesis of group A streptococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Mol. Microbiol.* **53,** 1515–1527 (2004)
50. Martin J.M., Green M.: Group A streptococcus. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* **17**, 140–148 (2006)
51. Matsumoto M., Ishikawa N., Saito M., Shibayama K., Horii T., Sato K., Ohta M.: Streptococcal pyrogenic exotoxin F (SpeF) causes permeabilization of lung blood vessels. *Infect. Immun.* **67**, 4307–4311 (1999)

52. McCormick J.K., Peterson M.L.P., Schlievert M.: Toxins and superantigens of group A streptococci. W: *Gram-Positive Pathogens*, ed. 2 (2006)
53. McGregor K.F., Spratt B.G., Kalia A., Bennett A., Bilek N., Beall B., Bessen D.E.: Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* representing most known emm types and distinctions among subpopulation genetic structures. *J. Bacteriol.* **186**, 4285–4294 (2004)
54. McNamara C., Zinkernagel A. S., Macheboeuf P., Cunningham M.W., Nizet V., Ghosh P.: Coiled-coil irregularities and instabilities in group A *Streptococcus* M1 are required for virulence. *Science*, **319**, 1405–1408 (2008)
55. Mollick J.A., Miller G.G., Musser J.M., Cook R.G., Grossman D., Rich R.R.: A novel superantigen isolated from pathogenic strains of *Streptococcus pyogenes* with aminoterminal homology to staphylococcal enterotoxins B and C. *J. Clin. Invest.* **92**, 710–719 (1993)
56. Mosquera J., Romero M., Viera N., Rincon J., Pedreanez A.: Could streptococcal erythrogenic toxin B induce inflammation prior to the development of immune complex deposits in post-streptococcal glomerulonephritis? *Nephron. Exp. Nephrol.* **105**, e41–44 (2007)
57. Nizet V.: Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends. Microbiol.* **10**, 575–580 (2002)
58. Nobbs A.H., Lamont R.J., Jenkinson H.F.: *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 407–450 (2009)
59. Norrby-Teglund A., Thulin P., Gan B.S., Kotb M., McGeer A., Andersson J., Low D.E.: Evidence for superantigen involvement in severe group a streptococcal tissue infections. *J. Infect. Dis.* **184**, 853–860 (2001)
60. Ogawa T., Terao Y., Okuni H., Ninomiya K., Sakata H., Ikebe K., Maeda Y., Kawabata S.: Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microb. Pathog.* **51**, 58–68 (2011)
61. Okada N., Liszewski M.K., Atkinson J.P., Caparon M.: Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A *Streptococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 2489–2493 (1995)
62. Olsen R.J., Sitkiewicz I., Ayeras A.A., Gonulal V.E., Cantu C., Beres S.B., Green N.M., Lei B., Humbird T., Greaver J., Chang E., Ragasa W.P., Montgomery C.A., Cartwright J., Jr., McGeer A., Low D.E., Whitney A.R., Cagle P.T., Blasdel T.L., DeLeo F.R., Musser J.M.: Decreased necrotizing fasciitis capacity caused by a single nucleotide mutation that alters a multiple gene virulence axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 888–893 (2010)
63. Pahlman L.I., Morgelin M., Eckert J., Johansson L., Russell W., Riesbeck K., Soehnlein O., Lindbom L., Norrby-Teglund A., Schumann R.R., Bjorck L., Herwald H.: Streptococcal M protein: a multipotent and powerful inducer of inflammation. *J. Immunol.* **177,** 1221–1228 (2006)
64. Pahlman L. I., Olin A. I., Darenberg J., Morgelin M., Kotb M., Herwald H. i Norrby-Teglund A.: Soluble M1 protein of Streptococcus pyogenes triggers potent T cell activation. *Cell. Microbiol.* **10**, 404–414 (2008)
65. Pasternack M., Morton N.: Skin and soft tissue infection. W: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, ed. 7 (2009)
66. Perez-Caballero D., Garcia-Laorden I., Cortes G., Wessels M.R., de Cordoba S.R., Alberti S.: Interaction between complement regulators and *Streptococcus pyogenes*: binding of C4b-binding protein and factor H/factor H-like protein 1 to M18 strains involves two different cell surface molecules. *J. Immunol.* **173**, 6899–6904 (2004)
67. Perez N., Trevino J., Liu Z., Ho S.C., Babitzke P., Sumby P.: A genome-wide analysis of small regulatory RNAs in the human pathogen group A *Streptococcus*. *PLoS One*, **4**, e7668 (2009)
68. Proft T., Sriskandan S., Yang L. i Fraser J.D.: Superantigens and streptococcal toxic shock syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 1211–1218 (2003)
69. Raghavan V., Groisman E.A.: Orphan and hybrid two-component system proteins in health and disease. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 226–231 (2008)
70. Roberts S.A., Scott J.R.: RivR and the small RNA RivX: the missing links between the CovR regulatory cascade and the Mga regulon. *Mol. Microbiol.* **66**, 1506–1522 (2007)
71. Ruoff K.L.: Streptococcal Diseases. W: *Toply and Wilson's Microbiology and microbial infections*, 257–275 ed. 9 (1998)
72. Schlievert P.M., Kotb M.Y., Stevens D.L.: Streptococcal superantigens: streptococcal toxic shock syndrome. W: *Effect of microbes on the immune system*, 25–39 ed. (2000)
73. Schmitz F.J., Beyer A., Charpentier E., Normark B.H., Schade M., Fluit A.C., Hafner D., Novak R.: Toxin-gene profile heterogeneity among endemic invasive European group A streptococcal isolates. *J. Infect. Dis.* **188**, 1578–1586 (2003)
74. Shaikh N., Leonard E., Martin J.M.: Prevalence of streptococcal pharyngitis and streptococcal carriage in children: a meta-analysis. *Pediatrics*, **126**, e557–564 (2010)
75. Shelburne S.A., 3rd, Keith D., Horstmann N., Sumby P., Davenport M.T., Graviss E.A., Brennan R.G., Musser J.M.: A direct link between carbohydrate utilization and virulence in the major human pathogen group A *Streptococcus Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1698–1703 (2008)
76. Shelburne S.A., 3rd, Sumby P., Sitkiewicz I., Granville C., DeLeo F.R., Musser J.M.: Central role of a bacterial two-component gene regulatory system of previously unknown function in pathogen persistence in human saliva. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **102**, 16037–16042 (2005)
77. Siemens N., Patenge N., Otto J., Fiedler T., Kreikemeyer B.: Streptococcus pyogenes M49 Plasminogen/Plasmin Binding Facilitates Keratinocyte Invasion via Integrin-Integrin-linked Kinase (ILK) Pathways and Protects from Macrophage Killing. *J. Biol. Chem.* **286**, 21612–21622 (2011)
78. Sitkiewicz I., Musser J.M.: Expression microarray and mouse virulence analysis of four conserved two-component gene regulatory systems in group A *Streptococcus*. *Infect. Immun.* **74**, 1339–1351 (2006)
79. Sitkiewicz I., Nagiec M.J., Sumby P., Butler S.D., Cywes-Bentley C., Musser J.M.: Emergence of a bacterial clone with enhanced virulence by acquisition of a phage encoding a secreted phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103,** 16009–16014 (2006)
80. Smoot J.C., Barbian K.D., Van Gompel J.J., Smoot L.M., Chaussee M.S., Sylva G.L., Sturdevant D.E., Ricklefs S.M., Porcella S.F., Parkins L.D., Beres S.B., Campbell D.S., Smith T.M., Zhang Q., Kapur V., Daly J.A., Veasy L.G., Musser J.M.: Genome sequence and comparative microarray analysis of serotype M18 group A *Streptococcus* strains associated with acute rheumatic fever outbreaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4668–4673 (2002)
81. Soderberg J.J., Engstrom P., von Pawel-Rammingen U.: The intrinsic immunoglobulin g endopeptidase activity of streptococcal Mac-2 proteins implies a unique role for the enzymatically impaired Mac-2 protein of M28 serotype strains. *Infect. Immun.* **76**, 2183–2188 (2008)
82. Sriskandan S., Faulkner L., Hopkins P.: *Streptococcus pyogenes*: Insight into the function of the streptococcal superantigens. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **39**, 12–19 (2007)

83. Steer A.C., Danchin M. H., Carapetis J. R.: Group A streptococcal infections in children. *J. Paediatr. Child. Health.* **43**, 203–213 (2007)
84. Steer A.C., Law I., Matatolu L., Beall B.W., Carapetis J.R.: Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 611–616 (2009)
85. Sumby P., Barbian K.D., Gardner D.J., Whitney A.R., Welty D.M., Long R.D., Bailey J.R., Parnell M.J., Hoe N.P., Adams G.G., Deleo F.R., Musser J.M.: Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 1679–1684 (2005)
86. Sumby P., Zhang S., Whitney A.R., Falugi F., Grandi G., Graviss E.A., Deleo F.R., Musser J.M.: A chemokine-degrading extracellular protease made by group A *Streptococcus* alters pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Infect. Immun.* **76**, 978–985 (2008)
87. Szczypa K., Sadowy E., Izdebski R., Strakova L., Hryniewicz W.: Group A streptococci from invasive-disease episodes in Poland are remarkably divergent at the molecular level. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3975–3979 (2006)
88. Thern A., Stenberg L., Dahlback B., Lindahl G.: Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. *J. Immunol.* **154**, 375–386 (1995)
89. Travis J., Potempa J., Maeda H.: Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol.* **3**, 405–407 (1995)
90. Trevino J., Perez N., Ramirez-Pena E., Liu Z., Shelburne S.A., 3rd, Musser J.M., Sumby P.: CovS simultaneously activates and inhibits the CovR-mediated repression of distinct subsets of group A *Streptococcus* virulence factor-encoding genes. *Infect. Immun.* **77**, 3141–3149 (2009)
91. Trevino J., Perez N., Sumby P.: The 4.5S RNA component of the signal recognition particle is required for group A *Streptococcus* virulence. *Microbiology*, **156**, 1342–1350 (2010)
92. Voyich J.M., Braughton K.R., Sturdevant D.E., Vuong C., Kobayashi S.D., Porcella S.F., Otto M., Musser J.M., DeLeo F.R.: Engagement of the pathogen survival response used by group A *Streptococcus* to avert destruction by innate host defense. *J. Immunol.* **173**, 1194–1201 (2004)
93. Voyich J.M., Sturdevant D.E., Braughton K.R., Kobayashi S.D., Lei B., Virtaneva K., Dorward D.W., Musser J.M., DeLeo F.R.: Genome-wide protective response used by group A *Streptococcus* to evade destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1996–2001 (2003)
94. Wexler D.E., Chenoweth D.E., Cleary P.P.: Mechanism of action of the group A streptococcal C5a inactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 8144–8148 (1985)
95. Yang R., Otten M.A., Hellmark T., Collin M., Bjorck L., Zhao M.H., Daha M.R., Segelmark M.: Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS, IgG-degrading streptococcal enzymes. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 2479–2486 (2010)
96. Yu C.E., Ferretti J.J.: Molecular epidemiologic analysis of the type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) gene (speA) in clinical *Streptococcus pyogenes* strains. *Infect. Immun.* **57**, 3715–3719 (1989)
97. Yutsudo T., Murai H., Gonzalez J., Takao T., Shimonishi Y., Takeda Y., Igarashi H., Hinuma Y.: A new type of mitogenic factor produced by *Streptococcus pyogenes*. *FEBS Lett.* **308**, 30–34 (1992)
98. Yutsudo T., Okumura K., Iwasaki M., Hara A., Kamitani S., Minamide W., Igarashi H., Hinuma Y.: The gene encoding a new mitogenic factor in a *Streptococcus pyogenes* strain is distributed only in group A streptococci. *Infect. Immun.* **62**, 4000–4004 (1994)

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 1, 17–25
http://www.pm.microbiology.pl

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS JAKO CZYNNIK ETIOLOGICZNY BIEGUNKI POANTYBIOTYKOWEJ

Joanna Kądzielska[1]*, Piotr Obuch-Woszczatyński[1], Hanna Pituch[1], Grażyna Młynarczyk[1]

[1]Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

Wpłynęło w czerwcu 2011 r.

1. Wstęp. 2. Enterotoksyna *Clostridium perfringens* (CPE). 2.1. Budowa enterotoksyny. 2.2. Molekularne podstawy toksynotwórczości szczepów *C. perfringens* typu A. 2.3. Mechanizm działania enterotoksyny *C. perfringens* (CPE). 3. Sporulacja *C. perfringens*. 4. Biegunka poantybiotykowa o etiologii *C. perfringens*. 5. Diagnostyka biegunki o etiologii *C. perfringens* typu A. 6. Nowe czynniki zjadliwości *C. perfringens* typu A. 7. Podsumowanie

***Clostridium perfringens* as the etiological agent of antibiotic associated diarrhoea**

Abstract: *Clostridium perfringens* strains are classified into one of five types (A-E) based on their ability to produce four major toxins: α, β, ε, ι. *C. perfringens* strains belonging to biotype A may cause gas gangrene and different gastrointestinal infections such as antibiotic-associated diarrhoea (AAD), sporadic diarrhoea (SD), necrotizing enterocolitis and food poisoning. The major role in the pathogenesis of *C. perfringens* diarrhoea plays the enterotoxin (CPE). Presented review describes structure, mechanism of action and molecular background of *C. perfringens* enterotoxin (CPE). Mechanism of *C. perfringens* type A sporulation and its importance in causing case of diarrhoea is described. In addition literature reports of cases of AAD and sporadic diarrhoea, risk groups and available diagnostic methods are discussed. Special attention is paid to new virulence factors produced by *C. perfringens* such as beta2 toxin (β2), isolated from AAD cases, and its possible influence on clinical picture of the disease.

1. Introduction. 2. *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). 2.1. Structure of enterotoxin. 2.2. Molecular background of toxicity of *C. perfringens* type A strains. 2.3. Mechanism of action of *C. perfringens* enterotoxin (CPE). 3. Sporulation of *C. perfringens*. 4. Antibiotic-associated diarrhoea caused by *C. perfringens*. 5. Diagnosis of diarrhoea caused by *C. perfringens* type A. 6. New virulence factors of *C. perfringens* type A. 7. Summary

Słowa kluczowe: beta2 toksyna, biegunka poantybiotykowa, biegunka sporadyczna, enterotoksyna (CPE), sporulacja, zatrucie pokarmowe *C. perfringens*

Key words: beta2 toxin, antibiotic-associated diarrhoea, sporadic diarrhoea, enterotoxin (CPE), sporulation, *C. perfringens* food poisoning

1. Wstęp

Clostridium perfringens (dawniej *Bacillus aerogenes capsulatus*) jest Gram-dodatnią, ściśle beztlenową, przetrwalnikującą laseczką opisaną po raz pierwszy w 1892 roku. Od tego czasu drobnoustrój ten zaczęto postrzegać jako ważny patogen wywołujący wiele schorzeń u ludzi i zwierząt [71, 91]. *C. perfringens* występuje powszechnie w glebie i ściekach oraz w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt [41, 56, 57, 60, 63, 71, 72]. Wśród zdrowych osób odsetek nosicieli szczepów *C. perfringens* wynosi od 6 do 31% [72]. Szczególnie nosicielstwo obserwuje się u osób w podeszłym wieku [5, 7, 12, 17, 30, 36], a także u pracowników zatrudnionych przy produkcji i dystrybucji żywności [12, 26], którzy też mogą stanowić ważny jego rezerwuar [41]. Zdolność *C. perfringens* do przeżywania w różnych środowiskach związana jest z wytwarzaniem bakteriocyn oraz licznych enzymów takich jak: dysmutaza nadtlenkowa, reduktaza siarczkowa, peroksydaza, a także deiminaza argininowa, która odgrywa istotną rolę w adaptacji do kwaśnego środowiska przewodu pokarmowego, przekształcając argininę do amoniaku [56].

Szczepy należące do gatunku *C. perfringens* podzielono na 5 toksynotypów/biotypów (A-E) na podstawie zróżnicowanych zdolności do wytwarzania czterech toksyn takich jak: toksyna alfa (α), beta (β), epsilon (ε) i jota (ι) [16, 24, 41, 51, 52, 56, 60]. Każdy z toksynotypów jest związany z inną jednostką chorobową u ludzi lub u zwierząt [63, 69, 71, 74, 75, 91].

Szczepy należące do gatunku *C. perfringens* typu A wytwarzają duże ilości toksyny alfa (α), a także toksynę theta (θ) czyli perfringolizynę O (PFO). Niektóre z nich mogą wytwarzać również enterotoksynę (CPE) oraz toksynę beta2 (β2, CBP2) [16, 26, 71]. Szczepy *C. perfringens* należące do toksynotypu A, które wytwarzają toksynę α, a także perfringolizynę O oraz szereg enzymów proteolitycznych, wywołują u ludzi zgorzel gazową [60, 63, 71, 75]. Szczepy, które dodatkowo posiadają zdolność wytwarzania enterotoksyny (CPE) powodują zatrucia pokarmowe, biegunkę poantybiotykową (antibiotic associated diarrhoea – AAD) oraz tzw. biegunki

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; e-mail: joanna.kadzielska@wum.edu.pl

sporadyczne (sporadic diarrhoea – SD) [6, 7, 12, 16, 18, 19, 24, 26, 51, 52, 63, 71]. Do innych patogenów związanych z przypadkami AAD lub SD należą *Clostridium difficile* (10–25% przypadków), *Klebsiella oxytoca*, enterotoksynotwórcze szczepy *Staphylococcus aureus* i grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* [1, 2, 4, 20, 21, 23, 28, 66, 73].

W piśmiennictwie opisano pojedyncze przypadki martwiczego zapalenia jelit o etiologii *C. perfringens* typ A – często śmiertelnego schorzenia, zazwyczaj powodowanego przez szczepy należące do toksynotypu C *C. perfringens*, które wytwarzają beta-toksynę [18, 72, 74].

Ocenia się, że tylko 5 do 6% izolatów *C. perfringens*, głównie typu A, wytwarza enterotoksynę (CPE+). Zatrucie pokarmowe wywoływane przez szczepy CPE+ jest jednym z najczęściej występujących schorzeń związanych z konsumpcją żywności. Objawy ostrej biegunki i bóle brzucha występują zwykle po 8 do 24 godzin od spożycia skażonych produktów [6, 60]. Do grupy podwyższonego ryzyka należą osoby starsze oraz chorzy z obniżoną odpornością. Ocenia się, że z powodu tego schorzenia umiera rocznie około 7 osób w USA i około 50–100 w Wielkiej Brytanii, gdzie notuje się 85 000 przypadków zatruć pokarmowych każdego roku [42, 43, 74, 83]. W USA drobnoustrój ten znajduje się na 3 miejscu jako czynnik powodujący zatrucia pokarmowe i szacuje się, że rocznie około 250 000 przypadków zatruć pokarmowych powodują szczepy *C. perfringens* typu A [9, 14, 41–43, 46, 47, 52, 74–76, 83]. Źródłem zakażeń w 90% przypadków jest wołowina, drób oraz przetwory mięsne [46, 63, 68, 74, 75, 83, 89]. W związku z zaprzestaniem stosowania antybiotyków w hodowli drobiu w Europie, notuje się u tych zwierząt większą liczbę przypadków martwiczego zapalenia jelit o etiologii *C. perfringens* typu A. Wystąpieniu choroby sprzyja nieodpowiednia dieta. Drobnoustrój izoluje się ze środowiska fermy i z około 80% próbek pobranych z przewodu pokarmowego kurcząt. Szczepy *C. perfringens* typu A można izolować z woreczka żółciowego i wątroby ptaków [89], co stanowi podwyższone ryzyko transmisji tych patogenów na człowieka po spożyciu skażonej żywności [75, 83, 88]. Szczególnie dotyczy to produktów ogrzewanych, schładzanych powoli i następnie mrożonych i potem nieodpowiednio podgrzanych [63, 83, 88]. W USA wyizolowano szczepy CPE+ z około 1,4% próbek produktów spożywczych (kurczaki, wieprzowina) oraz z 6% próbek kału pobranych od pracowników zajmujących się technologią żywności [12, 26, 41, 74, 84]. Enterotoksynotwórcze szczepy *C. perfringens* typu A izolowano z innych źródeł takich jak próbki pochodzące od: bydła (22%), koni (14%), psów (2%), małży (12%) czy próbki wody (10%) [75]. Przypadki zatruć pokarmowych o etiologii *C. perfringens* opisano już 70 lat temu, natomiast przypadki biegunek poantybiotykowych o etiologii *C. perfringens* CPE+ opisano dopiero w 1984 roku [4, 6, 63]. Obecnie uważa się, że szczepy CPE+ odpowiadają za około 5–20% przypadków biegunki poantybiotykowej [9, 14, 42, 52, 69, 76].

2. Enterotoksyna *C. perfringens* (CPE)

2.1. Budowa enterotoksyny

Enterotoksynę *C. perfringens* opisano po raz pierwszy w 1970 roku [69]. Jest białkiem złożonym z 319 aminokwasów (35,3 kDa) o unikalnej sekwencji i nie wykazuje dużej homologii z innymi toksynami bakteryjnymi [46, 47, 65, 69, 74]. Wykazano jedynie niewielką homologię z białkiem Antp70/C1 wytwarzanym przez niektóre szczepy *C. botulinum* [46]. N-końcowy fragment białka enterotoksyny zlokalizowany pomiędzy 45 a 53 aminokwasem, odpowiada za aktywność biologiczną tego białka. Proteazy jelitowe takie jak chymotrypsyna i trypsyna mogą trawić zewnętrzny fragment N-końcowego odcinka do 38 aminokwasu, co zwiększa 2–3-krotnie aktywność biologiczną tego białka *in vitro*. Przypuszcza się, że podobny mechanizm zachodzi *in vivo* w przewodzie pokarmowym. C-końcowy fragment zawiera region wiążący się z receptorem komórki enterocyta [46, 47, 65, 69, 75].

2.2. Molekularne podstawy toksynotwórczości szczepów *C. perfringens* typu A

Laseczka *C. perfringens* była pierwszą bakterią Gram-dodatnią, dla której skonstruowano mapę genetyczną. Dotychczas określono położenie dla 24 regionów genów na pojedynczym, kolistym chromosomie o wielkości 3,6 Mpz. Geny kodujące toksyny *C. perfringens* ulokowane są rejonie o wielkości 250 kpz, mieszczącym się w pobliżu *oriC*.

Gen *cpe* kodujący enterotoksynę położony jest na transpozonie (Tn5565 o wielkości 6,3 kpz) obok sekwencji insercyjnej IS*1469*. Na obu końcach transpozonu Tn5565 znajdują się sekwencje insercyjne IS*1470* [7, 9, 16, 46, 47, 51, 65]. Odkryto również, że gen *cpe* może być zlokalizowany na plazmidach (~75 kpz), które nazwano *cpe*+/IS*1151*+ oraz *cpe*+/IS*1470*-like+, ponieważ obok genu *cpe* znajdują się sekwencje inercyjne odpowiednio IS*1151* i IS*1470*-like. Każdy plazmid zawiera też drugą sekwencję insercyjną IS*1469* [19, 46, 51, 52, 60, 65, 71, 76].

Większość zatruć pokarmowych (ok. 75%) wywołują szczepy *C. perfringens* typu A niosące gen *cpe* na chromosomie (chromosomal IS*1470-cpe*). W około 21% przypadkach mogą to być szczepy niosące plazmid *cpe*+/IS*1470*-like+ a w 4% przypadkach są to szczepy zawierające plazmid *cpe*+/IS*1151*+ [8, 38, 42, 46, 52, 57, 78, 79]. Szczepy, które mają gen *cpe* na chromosomie często izoluje się z żywności a także od zdrowych ludzi, co prawdopodobnie jest przyczyną znacznego udziału

tych szczepów w zatruciach pokarmowych [12, 16, 38, 41, 42, 51]. Szczepy, w których gen *cpe* znajduje się na plazmidzie izoluje się z próbek gleby [41]. Szczepy takie częściej izoluje się z próbek kału pobranych od chorych z biegunką poantybiotykową lub z tzw. biegunką sporadyczną (prawdopodobnie nie związaną ze spożyciem żywności) niż szczepy posiadające gen *cpe* położony na chromosomie [16, 41, 46, 51].

Plazmidy *C. perfringens* mogą być przekazywane w procesie koniugacji do szczepów *cpe-* [9, 26, 69, 76]. Ponieważ dawka zakaźna bakterii w przypadku biegunki poantybiotykowej lub sporadycznej może być niewielka (w porównaniu do wysokiej dawki 10^6–10^7/ml komórek *C. perfringens* w przypadku zatrucia pokarmowego) przypuszcza się, że plazmid może być przekazywany w przewodzie pokarmowym do innych szczepów *C. perfringens*, obecnych jako składnik normalnej mikroflory jelita grubego, co przyczynia się do zwielokrotnienia zjadliwości. Biegunki poantybiotykowe i sporadyczne wywołane przez szczepy *C. perfringens* typu A zwykle trwają dłużej i mają cięższy przebieg niż biegunki towarzyszące zatruciu pokarmowemu o tej samej etiologii [9, 26, 46, 69].

2.3. Mechanizm działania enterotoksyny *C. perfringens* (CPE)

Badania na modelach zwierzęcych oraz ludzkich komórkach nabłonka CaCo-2, I407 i Hep3b prowadzone *in vitro* dowiodły, że enterotoksyna *C. perfringens* ma działanie cytotoksyczne [14, 46, 50, 69]. Największą aktywność wykazuje w obrębie jelita krętego [46, 50, 69]. Duża dawka toksyny w ciągu 30 minut inicjuje zmiany histopatologiczne, które początkowo obejmują mikrokosmki, a następnie stopniowo zostaje zaburzone wchłanianie płynów i elektrolitów. W pierwszej fazie dochodzi do zahamowania absorbcji, a następnie na skutek zatarcia mikrokosmków i złuszczenia komórek nabłonka dochodzi do kumulacji płynów i elektrolitów w jelicie cienkim, co manifestuje się biegunką [46, 69]. Enterotoksyna CPE działa w sposób unikatowy i wieloetapowy [46, 69, 74, 75].

Etap 1. Enterotoksyna (CPE) przyłącza się do receptorów. Są nimi małe białka (około 22 kDa) obecne w połączeniach międzykomórkowych: klaudyna-3 i klaudyna-4 [35, 46, 69, 74, 84]. W połączeniu z drugą zewnętrzną pętlą klaudyny-3, a receptorowym rejonem enterotoksyny uczestniczą oddziaływania elektrostatyczne [35, 86]. Wraz z tymi receptorami CPE tworzy mały kompleks o masie cząsteczkowej 90 kDa, wrażliwy na SDS (dodecylosiarczan sodu) [46, 47, 69].

Etap 2. Podczas wzrostu temperatury do 37°C mały kompleks (w temperaturze 4°C jest on całkowicie nieaktywny) przyłącza inne białka i tworzy duży kompleks CPE o masie cząsteczkowej 155 kDa [46, 47, 69].

Etap 3. Prawdopodobnie duży kompleks lub jego oligomery tworzą pory w błonie komórkowej przepuszczalne dla Ca^{2+}, innych jonów, aminokwasów i nukleotydów [14, 46, 47, 69]. Małe dawki (1 μg/ml) enterotoksyny prowadzą do umiarkowanego napływu jonów wapnia i apoptozy komórek na drodze klasycznej, z udziałem mitochondriów i kaspazy-3. Duże dawki (10 μg/ml) enterotoksyny powodują duży napływ jonów wapnia do komórki, co powoduje jej śmierć na drodze onkozy [14, 46, 47, 64]. W przewodzie pokarmowym człowieka na skutek zatrucia pokarmowego czy biegunki poantybiotykowej oba procesy mogą zachodzić jednocześnie [47].

Etap 4. Obie drogi degradacji komórek za pośrednictwem kalpainy i kalmomoduliny prowadzą do zmian morfologicznych [46, 47, 68]. Enterotoksyna przyłącza się następnie do nowych receptorów klaudynowych obecnych w części boczno-podstawnej i tworzy więcej dużych (155 kDa) kompleksów [46, 47, 69].

Etap 5. Duże kompleksy łączą się z okludyną i tworzą kompleksy o wielkości ~200 kDa [46, 69].

Etap 6. Kompleksy o wielkości ~200 kDa wnikają do wnętrza komórki i uszkadzane są w niej liczne połączenia międzykomórkowe, co prowadzi do zwiększonej przepuszczalności. Duże dawki CPE niszczą enterocyty na drodze onkozy i rozwija się stan zapalny, co prowadzi do biegunki i innych objawów towarzyszących [46, 47].

3. Sporulacja *C. perfringens*

Synteza enterotoksyny rozpoczyna się kiedy komórka wegetatywna zaczyna przechodzić w fazę sporulacji. Enterotoksyna uwalniana jest w przewodzie pokarmowym w trakcie lizy komórki wegetatywnej i uwalniania przetrwalników. Proces sporulacji kontroluje sygnał ze środowiska, którym jest stężenie nieorganicznego fosforu [56–60, 70, 71]. Synteza CPE zachodzi w komórce macierzystej tworzącej przetrwalnik i zależy od białka regulatorowego Spo0A, które jest bezpośrednio fosforylowane przez kinazę histydynową [29, 56, 59]. Ekspresja genu *cpe* jest regulowana na poziomie transkrypcji. Gen *cpe* jest transkrybowany z udziałem 3 promotorów (P1, P2, P3). Czynnik sigma K reguluje P1, natomiast sigma E reguluje P2 i P3 [25, 46, 59, 60, 65]. W fazie logarytmicznej i początkowej fazie stacjonarnej, niski poziom sigma K jest potrzebny do nieznanego, początkowego etapu tworzenia przetrwalnika, następnie czynnik sigma E jest wydzielany pod wpływem czynnika sigma K a wzajemne oddziaływanie obu czynników

sigma wpływa na ich wysoki poziom w późniejszej fazie sporulacji [24]. Syntezę czynników sigma (Sig E, Sig K) reguluje białko represorowe CcpA (carbon catabolite protein). Białko to działa jak represor na transkrypcję genu *cpe* w fazie intensywnego wzrostu komórek, ale jest niezbędne w procesie sporulacji i transkrypcji *cpe* w momencie wejścia w fazę stacjonarną [8, 59, 90]. Niezależnie od białka CcpA również glukoza jest katabolicznym represorem procesu sporulacji [90]. Tak unikalny sposób kontroli procesu pozwala komórkom *C. perfringens* szybko wytworzyć spory w odpowiednich warunkach środowiska [25]. Szczepy posiadające gen *cpe* na chromosomie, tworzą spory mniej wrażliwe na działanie wysokiej i niskiej temperatury niż szczepy z plazmidowym genem *cpe* [40, 42, 43, 46, 49, 57, 58, 63, 64, 70, 74], co tłumaczy znaczny ich udział w zatruciach pokarmowych. Ponadto są one bardziej odporne na działanie środków konserwujących, dodawanych do żywności [39]. Odporne na temperaturę przetrwalniki tworzone przez *C. perfringens* z chromosomalnym genem enterotoksyny posiadają więcej jonów metali, szczególnie Fe^{2+} oraz wyższe stężenie kwasu dipikolinowego (DPA) oraz grubszą ścianę [58], a także mniejszą zawartość wody [59]. We wnętrzu przetrwalnika DNA bakterii chroni grupa małych, rozpuszczalnych w kwasie, białek SASP typu α/β (α/β-type small, acid-soluble spore proteins), które są syntetyzowane w czasie dojrzewania spory i degradowane w czasie uwalniania jej z komórki. U *C. perfringens* kodowane są one przez geny *ssp* (*ssp* 1, 2 i 3). Białka SASP zwiększają odporność przetrwalników na parę wodną i promieniowanie UV [43, 59, 70]. Odkryto niedawno czwarte białko Ssp4, które różni się jednym aminokwasem, w zależności od źródła pochodzenia izolatu *C. perfringens*. Szczepy tworzące wysoce oporne spory, izolowane z zatruć pokarmowych, posiadają białko Ssp4 z kwasem asparaginowym w pozycji 36, natomiast u szczepów pochodzących z przypadków biegunki poantybiotykowej, których przetwalniki są bardziej wrażliwe, białko Ssp4 w pozycji 36 posiada glicynę [42, 43, 59, 70]. Proces sporulacji, zależna od niego synteza enterotoksyny oraz wysoka oporność przetrwalników na temperaturę to podstawowe elementy patogenezy schorzeń wywołanych przez szczepy *C. perfringens* typu A, odpowiadające za zakażenia przewodu pokarmowego i zatrucia pokarmowe [59].

4. Biegunka poantybiotykowa o etiologii *C. perfringens*

Biegunka, to zgodnie z definicją, oddanie 2–3 luźnych, półpłynnych lub wodnistych stolców w ciągu doby [4, 11, 37, 45, 77]. Jest ona częstym, niepożądanym objawem po zastosowaniu antybiotyków, a w szczególności klindamycyny, cefalosporyn, penicylin o szerokim spektrum działania jak też makrolidów [11, 45, 77]. Biegunka poantybiotykowa (AAD) określana jest jako biegunka, która rozwija się w ciągu kilku godzin od wdrożenia terapii antybiotykowej aż do 6–8 tygodni po jej zaprzestaniu [4]. Dotyczy ona zwykle 5–39% pacjentów, w zależności od stosowanego leczenia [11, 23, 37, 53, 77]. Do czynników ryzyka należą podeszły wiek pacjenta [3, 23, 30, 36, 53, 54, 77, 85], przedłużony pobyt w szpitalu [3, 36, 77, 85], zabiegi endoskopowe, operacje jamy brzusznej, lewatywa [2], a także przewlekłe choroby nerek, cukrzyca, nowotwory, szczególnie gdy wymienione czynniki wzajemnie współistnieją [77, 85]. Stosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania prowadzi do zmian jakościowych i ilościowych składu naturalnej mikroflory przewodu pokarmowego [4, 15, 23, 77], co z kolei wpływa negatywnie na metabolizm krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych i soli kwasów żółciowych [4, 77] oraz kolonizację przewodu pokarmowego przez szczepy oporne na antybiotyki [4, 23, 77].

Clostridium difficile odpowiada za 10–20% przypadków AAD [4, 45], a według niektórych źródeł może stanowić 25% [20] lub nawet 33% [2] przypadków. Szacuje się że enterotoksynotwórcze szczepy *C. perfringens* (CPE+) wywołują biegunkę AAD w 5–20% zachorowań [2, 3, 15, 21, 28, 32, 44, 45, 82, 86] lub niekiedy mogą stanowić zaledwie 1% przypadków [1, 61]. Natomiast w 70–80% przypadków czynnik etiologiczny biegunki AAD pozostaje nierozpoznany [45, 53]. Przypadki biegunki poantybiotykowej o etiologii *C. perfringens* CPE+ opisano dopiero w 1984 roku. W próbkach kału 11 pacjentów z ujemnym wynikiem w kierunku toksyn *C. difficile*, wykazano obecność enterotoksyny *C. perfringens* [3, 4, 6, 28, 53, 63, 73]. Pacjenci podlegali hospitalizacji i byli w podeszłym wieku, co stanowi szczególne ryzyko kolonizacji przewodu pokarmowego laseczkami z rodzaju *Clostridium* spp. [17, 30, 54]. U tej grupy pacjentów opisuje się też przypadki biegunki sporadycznej o etiologii CPE+ [17, 23, 36, 53, 55]. Udowodniono, że krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, produkowane przez naturalną mikroflorę, hamują proces sporulacji *C. perfringens*. Antybiotykoterapia prowadząca do zmniejszenia się kwasu bursztynowego, octowego, izomasłowego, izowalerianowego w jelicie pacjenta może stać się czynnikiem predysponującym do rozwoju biegunki o etiologii *C. perfringens* (CPE+) [86].

W tabeli I zestawiono wyniki badań w kierunku enterotoksynotwórczych szczepów *C. perfringens* (CPE+) próbek kału pobranych od pacjentów z biegunką poantybiotykową (AAD) i biegunką sporadyczną. Możemy zaobserwować różnice w częstości wykrywania enterotoksyny *C. perfringens*. Wykazano, że u pacjentów w podeszłym wieku, leczonych na oddziałach gastroenterologicznych, należących do grup ryzyka, szczepy CPE+ mogą stanowić bardzo istotny czynnik etiolo-

Tabela I

Częstość występowania enterotoksyny (CPE) i szczepów *C. perfringens* w próbkach kału pacjentów z biegunką poantybiotykową lub biegunką sporadyczną oznaczona w różnych krajach

Kraj/Rok	N	CPE (%)	n	Piśmiennictwo
Wielka Brytania/1991	721	25	3,5	[67]
Wielka Brytania/1995	370	99	18,0	[55]
Wielka Brytania/2002	200	12	8,0	[3]
Wielka Brytania/2002	249	x	1,6	[13]
Wielka Brytania/2003	843	x	2,3	[21]
Niemcy/2005	89	5	1,0	[1]
Wielka Brytania/2005	63	x	9,5	[45]
Niemcy/2005	693	147	0,14	[28]
Indie/2005	285	x	8,77	[87]
Indie/2006	100	20	1,0	[33]
Indie/2006	150	13	2,6	[32]
Wielka Brytania/2006	4659	130	3,3	[2]
Polska/2007	52	15	40,0	[61]
Japonia/2008	294	70	2,0	[82]
Kostaryka/2008	104	29	3,0	[11]

N – liczba pacjentów = liczba próbek, n – liczba próbek kału, z których wyhodowano *C. perfringens*, x – nie oznaczano, CPE – odsetek próbek kału dodatnich w kierunku enterotoksyny *C. perfringens* (CPE+)

giczny biegunki AAD (40%) [61]. Dodatkowo u 31% pacjentów wykryto jednocześnie toksyny *C. difficile* i *C. perfringens* w kale. Mpamugo i wsp. [55] również wykryli duży odsetek szczepów CPE+ (18%) u osób starszych i potwierdzili, że mogą być one przyczyną biegunek poantybiotykowych jak i sporadycznych, utrzymujących się nawet przez wiele tygodni. Vaishnavi i wsp. [87] badając pacjentów z oddziału gastroenterologii uzyskał 8,77% przypadków biegunki CPE+ i aż 36% przypadków o mieszanej etiologii *C. difficile* i *C. perfringens*. W badaniach Asha i wsp. [2] toksyny *C. difficile* i *C. perfringens* współwystępowały na poziomie 2–3%, a sama enterotoksyna CPE występowała na poziomie 8%. Badacze podkreślają różną czułość stosowanych metod diagnostycznych oraz jednoczesną obecność szczepów CPE-, co pociąga za sobą konieczność izolacji kilku kolonii, nawet do 10, w celu poszukiwania izolatów niosących gen *cpe* [2, 12, 32, 61]. Loy [45] opisuje znaczący udział szczepów CPE+ w biegunce AAD (9,5%) i zwraca uwagę na konieczność badania pacjentów, u których nie wykrywa się toksyn *C. difficile* w kale, w kierunku enterotoksynotwórczych *C. perfringens* typu A. W wielu ośrodkach udział tych szczepów w biegunkach AAD wciąż wynosi zaledwie 2–3% [11, 21, 32, 53, 67, 82]. Podkreśla się jednak możliwość obecności izolatów CPE+ w środowisku szpitalnym i możliwej transmisji patogenów, co może prowadzić do gwałtownego wzrostu zachorowań pacjentów z grup ryzyka [2, 13, 36, 53]. Kobayashi i wsp. [36] otrzymał aż 60–70% szczepów CPE+ w grupie pacjentów z biegunką na oddziałach geriatrycznych. Część ośrodków uważa, że biegunka AAD o etiologii *C. perfringens* CPE+ ma marginalne znaczenie w diagnostyce tych zakażeń, gdyż udział szczepów CPE+ wynosi 1–1,6% [1, 13, 33]. Heimesaat i wsp. [28] przebadali prawie 700 próbek kału i otrzymali wynik dodatni dla enterotoksyny CPE+ tylko u 0,14% (1 pacjent), ale uzyskali jednocześnie więcej izolatów niosących gen *cpe*. Rodzi się pytanie, czy być może u części pacjentów poziom enterotoksyny w kale występuje poniżej progu detekcji? Autorzy dyskutują czułość stosowanych metod diagnostycznych oraz wpływ sposobu opracowania materiału do badań (przechowywanie, mrożenie, rozmrażanie próbek kału, wielkość próbki użytej do testu), a także czas pobrania próbki – największe szanse wykrycia enterotoksyny są w ostrej fazie choroby [27, 28, 53]. Inni badacze nie poszukują enterotoksyny *C. perfringens* w kałach pacjentów z biegunką AAD, a w przypadku wyników ujemnych w kierunku toksyn *C. difficile* rozważają inne czynniki etiologiczne jak np. *Klebsiella oxytoca*, enterotoksynotwórczy *S. aureus* czy *Candida* spp. [20, 23, 66, 73]. Hodowla laseczek z rodzaju *Clostridium* spp. wymaga wyposażenia laboratorium w specjalną aparaturę. Ze względu na doniesienia o pojawiających się szczepach *C. perfringens* o obniżonej wrażliwości na metronidazol, czy wręcz opornych na ten lek [11, 61], leczenie empiryczne może być niewystarczającym sposobem ratowania życia pacjenta.

5. Diagnostyka biegunki o etiologii *C. perfringens* typu A

W przypadku biegunki poantybiotykowej materiałem diagnostycznym jest próbka kału pobrana od pacjenta w ostrej fazie choroby [11]. Zaleca się poszukiwanie enterotoksyny (CPE) oraz zakładanie hodowli ze świeżych próbek lub ewentualnie przechowywanych w temperaturze 4°C do 24h [13, 28, 83]. Część badaczy rekomenduje przechowywanie kału w temperaturze –20°C [21, 32] lub nawet –80°C, do czasu jego opracowania [11]. W celu wykrycia enterotoksyny w badanej próbce kału stosowane są 4 metody: test ELISA [1, 2, 3, 13, 21, 28, 32, 33, 45, 53, 61], test odwrotnej biernej aglutynacji lateksowej (RPLA) [11, 21, 32, 33, 36, 53, 55, 82], metoda PCR [3, 32, 33, 44, 53, 61] oraz metoda hodowli komórkowej z użyciem linii Vero [2, 21]. Tylko niewielki odsetek próbek dodatnich w kierunku enterotoksyny w teście ELISA wypada dodatnio na linii Vero [2]. Wydaje się, że jest to metoda najmniej czuła [2, 21, 32, 53]. Test RPLA jest czuły i daje powtarzalne wyniki, ale prawidłowy odczyt może utrudniać niespecyficzne wiązanie się masy kałowej [21, 32, 53].

Najbardziej rekomendowany do rutynowej diagnostyki jest test ELISA [21, 32, 48, 53, 63], w którym można wykryć 1μg/ml enterotoksyny [21]. Jeśli stężenie enterotoksyny w próbce kału jest niższe, gdyż np. dostarczony materiał pochodzi z późniejszej fazy choroby, najbardziej dokładny i wiarygodny wydaje się być test PCR wykonywany z próbek kału [53, 61]. *C. perfringens* może być obecny (do 10^3 cfu/g kału) w kale zdrowych osób jako składnik naturalnej mikroflory jelita grubego. U pacjentów oddziałów geriatrycznych może osiągać do $> 10^7$ cfu/g kału [53]. W celu wyhodowania szczepu *C. perfringens* z kału biegunkowego należy zastosować podłoża wybiórcze, np. agar TSN. Posiewy inkubuje się przez 48 godzin w temperaturze 37°C, w warunkach ściśle beztlenowych [61, 62]. Do poszukiwania izolatów niosących gen *cpe* zaleca się badanie kilku kolonii [3, 11, 32, 33, 61, 63], ponieważ szczepy CPE+ stanowią 1–5% i wśród nich mogą być obecne izolaty CPE- [2, 32, 33, 53]. Do poszukiwania genu *cpe* stosuje się metodę PCR [2, 3, 11, 28, 32, 36, 82], natomiast do porównywania szczepów używana jest metoda PFGE [2, 6, 36], zwłaszcza jeśli biegunka poantybiotykowa o etiologii *C. perfringens* ma charakter zakażenia szpitalnego [2, 82].

6. Nowe czynniki zjadliwości *C. perfringens* typu A

W roku 1997 Gibert i wsp. [22] wykryli nową toksynę tzw. toksynę beta2 (CPB2), kodowaną przez gen *cpb*2. Gen *cpb*2 *C. perfringens* wykryto po raz pierwszy w szczepach należących do typu C u prosiąt z wrzodziejącym zapaleniem jelit [10, 60, 82, 88]. Później okazało się, że gen *cpb2* może występować u szczepów należących do różnych toksynotypów *C. perfringens* [80, 81], które mogą wywoływać schorzenia przewodu pokarmowego koni, psów, słoni oraz innych zwierząt [10, 24, 31]. Toksynę beta2 wykryto również w próbkach kału biegunkowego ludzi zakażonych *C. perfringens* typu A [12, 60, 81, 82]. W badaniach środowiskowych (gleba, żywność, pasza) wykazano, że ponad 3% szczepów *C. perfringens* typu A posiada gen *cpb*2 [10, 34]. Izolowano również takie szczepy od zdrowych osób [12, 88] oraz od chorych u których doszło do zatrucia pokarmowego (około 15–20%) [19, 81, 83]. W roku 2005 Fisher i wsp. wykonali analizę sekwencji nukleotydowych (stosując metody PCR, PFGE, sekwencjonowanie) genu *cpb*2 *C. perfringens* pochodzących z przypadków biegunki poantybiotykowej i biegunki sporadycznej i wyróżnili dwa warianty CPB2. Pierwszy wariant oznaczony jako CPB2h1 znajduje się na plazmidzie *cpe*+/IS*1151*+, a drugi określany jako CPB2h2 mieści się na plazmidzie *cpe*+/IS*1470*-like+ [8, 19, 24, 81]. Toksyna beta2 jest białkiem o masie cząsteczkowej 31 kDa i działa cytotoksycznie na liniach komórkowych I407 i CaCo-2. Gen *cpb*2 jest pierwszym plazmidowym genem *C. perfringens*, który podlega regulacji przez dwuskładnikowy układ genów zlokalizowanych na chromosomie [24, 81]. Ta regulacja na poziomie transkrypcji nie zawsze prowadzi do ekspresji genu *cpb*2 [24, 34]. Stymulująco mogą działać np. antybiotyki aminoglikozydowe (gentamycyna, streptomycyna) wiążące podjednostkę 30S rybosomu, co powoduje inne odczytanie mRNA prowadzące do ekspresji toksyny beta2 [81, 88]. CPB2 należy do toksyn tworzących pory o większych rozmiarach niż CPE, prawdopodobnie na skutek polimeryzacji jej cząstek [19, 81]. Istnieje przypuszczenie, że w przypadku trwającej często kilka tygodni biegunki poantybiotykowej lub biegunki sporadycznej, toksyna beta2 może nasilać objawy choroby poprzez oddziaływanie na ściany komórek nabłonka jelit i zwiększanie absorbcji innych toksyn (np. enterotoksyny) [19, 24, 81]. Istnieje konieczność dalszych badań potwierdzających rolę toksyny beta2 w patogenezie biegunek o etiologii *C. perfringens* typu A.

7. Podsumowanie

Współcześnie za najważniejszy czynnik biegunek poantybiotykowych uważa się laseczkę *C. difficile*. Niewiele jest natomiast prac, które wskazywałyby jaki jest rzeczywisty udział enterotoksynotwórczych szczepów *C. perfringens* (CPE+) typu A w powodowaniu biegunek po stosowaniu antybiotykoterapii. Enterotoksynę wytwarza niewielki odsetek (5–6%) izolatów *C. perfringens* typu A. Jednak szczepy, które powodują biegunki poantybiotykowe, niosąc gen *cpe* na plazmidzie, mogą być prawdopodobnie źródłem tego genu dla nieenterotoksynotwórczych szczepów *C. perfringens* wchodzących w skład flory fizjologicznej przewodu pokarmowego człowieka, co może skutkować cięższym przebiegiem schorzenia. Również niewiele jest wiadomo na temat roli szczepów *C. perfringens* izolowanych z próbek kału osób z biegunką, w których wykryto toksynę beta2, a której ekspresję mogą nasilać antybiotyki aminoglikozydowe. Badania dotyczące udziału szczepów *C. perfringens* w powodowaniu biegunek poantybiotykowych są niezwykle istotne ze względu na to, że w szczególności narażeni na rozwój tego schorzenia są pacjenci oddziałów geriatrycznych oraz chorzy z obniżoną odpornością, których liczba wzrasta każdego roku. Pacjentów z biegunką poantybiotykową, u których nie wykryto toksyn *C. difficile* w kale powinno się diagnozować w kierunku enterotoksynotwórczych szczepów *C. perfringens* typu A. Opisano również przypadki współwystępowania obu patogenów [61, 87]. Szczepy CPE+ mogą być obecne w środowisku szpitalnym, co może prowadzić do wzrostu zachorowań na danym oddziale [2].

Piśmiennictwo

1. Ackermann G., Thomalla S., Ackermann F., Schaumann R., Rodloff A., Ruf B.R.: Prevalence and characteristics of bacteria and host factors in an outbreak situation of antibiotic-associated diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **54**,149–153 (2005)
2. Asha N.J., Tompkins D., Wilcox M.H.: Comparative analysis of prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of antibiotic-associated diarrhoea due to *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2785–2791 (2006)
3. Asha N.J., Wilcox M.H.: Laboratory diagnosis of *Clostridium perfringens* antibiotic-associated diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **51**, 891–894 (2002)
4. Beaugerie L., Petit J.C.: Antibiotic-associated diarrhoea. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 337–352 (2004)
5. Benno Y., Endo K., Mizutani T., Namba Y., Komori T., Mitsuoka T.: Comparison of fecal microflora of eldery persons in rural and urban areas of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1100–1105 (1989)
6. Borriello S.P.: Clostridial disease of the gut. *Clin. Infect. Dis.* **20** (Suppl. 2), S242–S250 (1995)
7. Brett M.M., Rodhouse J.C., Donovan T.J., Tebbutt G.M., Hutchinson D.N.: Detection of *Clostridium perfringens* and its enterotoxin in cases of sporadic diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* **45**, 609–611 (1992)
8. Brüggemann H.: Genomics of clostridial pathogens: implication of extrachromosomal elements in pathogenicity. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 601–605 (2005)
9. Brynestad S., Sarker M.R., McClane B.A., Granum P.E., Rood J.I.: Enterotoxin plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infect. Immun.* **69**, 3483–3487 (2001)
10. Bueschel D.M., Jost B.H., Billington S.J., Trinh H.T., Songer J.G.: Prevalence of *cpb*2, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet. Microbiol.* **94**, 121–129 (2003)
11. Camacho N., Espinoza C., Rodriguez C., Rodriguez E.: Isolates of *Clostridium perfringens* recovered from Costa Rican patients with antibiotic-associated diarrhoea are mostly enterotoxin--negative and susceptible to first choice antimicrobials. *J. Med. Microbiol.* **57**, 343–347 (2008)
12. Carman R.J., Sayeed S., Li J., Genheimer Ch.W., Hiltonsmith M.F., Wilkins T.D., McClane B.A.: *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the feces of healthy North Americans. *Anaerobe*, **14**, 102–108 (2008)
13. Carney T., Perry J.D., Ford M., Majumd ar S., Gould F.K.: Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* **55**, 240 (2002)
14. Chakrabarti G., McClane B.A.: The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell. Microbiol.* **7**, 129–146 (2005)
15. Citron D.M., Kwok Y.Y., Appleman M.D.: In vitro activity of oritavancin (LY 333328), vancomycin, clindamycin, and metronidazole against *Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, and anaerobic Gram-positive cocci. *Anaerobe*, **11**, 93–95 (2005)
16. Deguchi A., Miyamoto K., Kuwahara T., Miki Y., Kaneko I., et al.: Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PloS One*, **4**, e5598. doi:10.1371/journal.pone.0005598 (2009)
17. Efuntoye M.O., Adetosoye A.I.: Sporadic diarrhoea due to *Clostridium perfringens* in children aged five years and below. *Afr. J. Biotechnol.* **3**, 366–369 (2004)
18. Finegold S.M., Song Y., Liu Ch.: Taxonomy- general comments and update on taxonomy of clostridia and anaerobic cocci. *Anaerobe,* **8**, 283–285 (2002)
19. Fisher D.J., Miyamoto K., Harrison B., Akimoto S., Sarker M.R., McClane B.A.: Asoociation of beta2 toxin production with *Clostridium perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene. *Mol. Microbiol.* **56**, 747–762 (2005)
20. Fleming K., Ackermann G.: Prevalence of enterotoxin producing *Staphylococcus aureus* in stools of patients with nosocomial diarrhea. *Infection*, **5**, 356–358 (2007)
21. Forward L.J., Tompkins D.S., Brett M.M.: Detection of *Clostridium difficile* cytotoxin and *Clostridium perfringens* enterotoxin in cases of diarrhoea in the community. *J. Med. Microbiol.* **52**, 753–757 (2003)
22. Gibert M., Jolivet-Reynaud C., Popoff M.R.: Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene,* **203**, 65–73 (1997)
23. Gorkiewicz G.: Nosocomial and antibiotic-associated diarrhoea caused by organisms other than *Clostridium difficile*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **33**, S37–S41 (2009)
24. Harrison B., Raju D., Garmory H.S., Brett M.M., Titball R.W., Sarker M.R.: Molecular characterization of *Clostridium perfringens* isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-toxin-encoding gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8362–8370 (2005)
25. Harry K.H., Zhou R., Kroos L., Melville S.B.: Sporulation and enterotoxin (CPE) synthesis are controlled by the sporulation--specific sigma factors SigE and SigK in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **191**, 2728–2742 (2009)
26. Heikinheimo A., Lindström M., Granum P.E., Korkeala H.: Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* type A. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1727–1758 (2006)
27. Heikinheimo A., Lindström M., Korkeala H.: Enumeration and isolation of *cpe*-positive *Clostridium perfringens* spores from feces. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3992–3997 (2004)
28. Heimesaat M.M., Granzow K., Leidinger H., Liesenfeld O.: Prevalence of *Clostridium difficile* toxins A and B and *Clostridium perfringens* enterotoxin A in stool samples of patients with antibiotic-associated diarrhoea. *Infection*, **33**, 340–344 (2005)
29. Huang I.H., Waters M., Grau R.R., Sarker M.R.: Disruption of the gene (*spo0A*) encoding sporulation transcription factor blocs endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**, 233–240 (2004)
30. Jackson S.G., Yip-Chuck D.A., Clark J.B., Brodsky M.H.: Diagnostic importance of *Clostridium perfringens* enterotoxin analysis in recurring enteritis among eldery, chronic care psychiatric patients. *J. Clin. Microbiol.* **23**, 748–751 (1986)
31. Johansson A., Aspan A., Bagge E., Båverud V., Engström B.E., Johansson K.E.: Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol.* **6**, doi: 10.1186/1471-2180-6-47 (2006)
32. Joshy L., Chaudhry R., Dhawan B., Kumar L., Das B.K.: Incidence and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from antibiotic-associated diarrhoeal patients: a prospective study in an Indian hospital. *J. Hosp. Infect.* **63**, 323–329 (2006)
33. Joshy L., Chaudhry R., Dhawan B., Das B.K., Kumar L., Broor S.: Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* and sporadic diarrhoea: a study from an Indian tertiary care hospital. *J. Med. Microbiol.* **55**, 1757–1758 (2006)
34. Jost B.H., Billington S.J., Trinh H.T., Bueschel D.M., Songer J.G.: Atypical *cpb*2 genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium*

perfringens isolates of nonporcine origin. *Infect. Immun.* **73**, 652–656 (2005)

35. Kimura J., Abe H., Kamitani S., Toshima H., Fukui A., Miyake M., Kamata Y., Sugita-Konishi Y., Yamamoto S., Horiguchi Y.: *Clostridium perfringens* enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *J. Biol. Chem.* **285**, 401–408 (2010)
36. Kobayashi S., Inamatsu T. i wsp.: Spread of a large plasmid carrying the *cpe* gene and the *tcp* locus amongst *Clostridium perfringens* isolates from nosocomial outbreaks and sporadic cases of gastroenteritis in a geriatric hospital. *Epidemiol. Infect.* **137**, 108–113 (2008)
37. Kotowska M., Albrecht P., Józefczuk J., Armańska M., Ostapińska-Karaś G., Kochańska M., Szajewska H.: Częstość występowania biegunki poantybiotykowej u dzieci. *Pediatria Współczesna, Gastroenterologia, Hepatologia i Żywienie Dziecka*, **7**, 269–273 (2005)
38. Lahti P., Heikinheimo A., Johansson T., Korkeala H.: *Clostridium perfringens* type A strains carrying a plasmid-borne enterotoxin gene (genotype IS*1151*-*cpe* or IS*1470*-like-*cpe*) as a common cause of food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 371–373 (2008)
39. Li J., McClane B.A.: Comparative effects of osmotic, sodium nitrite-induced, and pH-induced stress on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal or plasmid-borne enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7620–7625 (2006)
40. Li J., McClane B.A.: Further comparison of temperature effects on growth and survival of *Clostridium perfringens* type A isolates carrying a chromosomal or plasmid-borne enterotoxin gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4561–4568 (2006)
41. Li J., Sayeed S., McClane B.A.: Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7218–7224 (2007)
42. Li J., Paredes-Sabja D., Sarker M.R., McClane B.A.: Further characterization of *Clostridium perfringens* small acid soluble protein-4 (Ssp4) properties and expression. *PLoS One.* **4** (7), e6249. doi: 10.1371/journal.pone.0006249 (2009)
43. Li J., McClane B.A.: A novel small acid soluble protein variant is important for spore resistance of most *Clostridium perfringens* food poisoning isolates. *PLos Pathogens*, **4**, e1000056 (2008)
44. Loh J.P., Liu Y.C., Chew S.W., Ong E.S., Fam J.M., Ng Y.Y., Taylor M.B., Ooi E.E.: The rapid identification of *Clostridium perfringens* as the possible aetiology of a diarrhoeal outbreak using PCR. *Epidemiol. Infect.* **136**, 1142–1146 (2008)
45. Loy C.E.: Antibiotic-associated diarrhoea: an overlooked aetiology? *Br. J. Biomed. Sci.* **62**, 166–169 (2005)
46. McClane B.A.: *Clostridium perfringens* enterotoxin (w) The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins, red. J.E. Alouf, M.R. Popoff, Institut Pasteur, Paris, 2006, s. 763–776.
47. McClane B.A., Chakrabarti G.: New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Anaerobe*, **10**, 107–114 (2004)
48. McClane B.A., Strouse R.J.: Rapid detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 112–115 (1984)
49. Miwa N., Masuda T., Kwamura A., Terai K., Akiyama M.: Survival and growth of enterotoxin-positive and enterotoxin-negative *Clostridium perfringens* isolates in laboratory media. *Food Microbiol.* **72**, 233–238 (2002)
50. Miyakawa M.E., Creydt P., Uzal F.A., McClane B.A., Ibarra C.: *Clostridium perfringens* enterotoxin damages the human intestine in vitro. *Infect. Immun.* **73**, 8407–8410 (2005)
51. Miyamoto K., Fisher D.J., Li J., Sayeed S., Akimoto S., McClane B.A.: Complete sequencing and diversity analysis of the enterotoxin-encoding plasmids in *Clostridium perfringens* type A non-food-borne human gastrointestinal disease isolates. *J. Bacteriol.* **188**, 1585–1598 (2006)
52. Miyamoto K., Wen Q., McClane B.A.: Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (*cpe*) locus, a plasmid *cpe* locus with an IS*1470*-like sequence, or a plasmid *cpe* locus with an IS*1151* sequence. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1552–1558 (2004)
53. Modi N., Wilcox M.H.: Evidence for antibiotic induced *Clostridium perfringens* diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* **54**, 748–751 (2001)
54. Moosavian M., Hayati K.: A survey of *clostridia* in the patients with acute diarrhea compared with the control group. *Pak. J. Med. Sci.* **24**, 209–212 (2008)
55. Mpamugo O., Donovan T., Brett M.M.: Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* as a cause of sporadic cases of diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* **43**, 442–445 (1995)
56. Myers G..S.A., Rasko D.A., Cheung J.K. i wsp.: Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. *Genome Res.* **16**, 1031–1040 (2006)
57. Nakamura M., Kato A., Tanaka D., Gyobu Y., Higaki S., Karasawa T., Yamagishi T.: PCR identification of the plasmid-borne enterotoxin gene (*cpe*) in *Clostridium perfringens* strains isolated from food poisoning outbreaks. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 261–265 (2004)
58. Orsburn B., Melville S.B., Popham D.L.: Factors contributing to heat resistance of *Clostridium perfringens* endospores. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3328–3335 (2008)
59. Paredes-Sabja D., Sarker M.R.: *Clostridium perfringens* sporulation and its relevance to pathogenesis. *Future Microbiol.* **4**, 519–525 (2009)
60. Petit L., Gibert M., Popoff M.R.: *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* **7**, 104–110 (1999)
61. Pituch H., Obuch-Woszczatyński P., Wultańska D., van Belkum A., Meisel-Mikołajczyk F., Łuczak M.: Laboratory diagnosis of antibiotic-associated diarrhea: a polish pilot study into the clinical relevance of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* toxins. *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.* **58**, 71–75 (2007)
62. Pituch H., van den Braak N., van Belkum A., Van Leeuwen W., Obuch-Woszczatyński P., Łuczak M., Verbrugh H., Meisel-Mikołajczyk F., Martirosian G.: Characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated from Polish patients with suspected antibiotic-associated diarrhea. *Med. Sci. Monit.* **8**, BR 85–88 (2002)
63. Poxton I.R.: Other *Clostridium* spp. (w) Principles and practice of clinical bacteriology, red. S.H. Gillespie, P.M. Hawkey, John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, 2006, s. 567–574
64. Raju D., Sarker M.R.: Comparison of the levels of heat resistance of wild-type, *cpe* knockout, and *cpe* plasmid-cured *Clostridium perfringens* type A strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7618–7620 (2005)
65. Rood J. I.: Virulence genes of *Clostridium perfringens*. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**, 333–60 (1998)
66. Rożkiewicz D., Zaremba M.L., Fiedoruk K., Daniluk T., Ściepuk M., Kurzątkowska B., Sulik A., Ołdak E.: Toksyna A *Clostridium difficile* i inne enteropatogeny w kale dzieci hospitalizowanych z powodu ostrej biegunki. *Przegl. Epidemiol.* **59**, 711–721 (2005)
67. Samuel S.C., Hancock P., Leigh D.A.: An investigation into *Clostridium perfringens* enterotoxin-associated diarrhoea. *J. Hosp. Infect.* **18**, 219–230 (1991)
68. Schalch B., Sperner B., Eisgruber H., Stolle A.: Molecular methods for the analysis of *Clostridium perfringens* relevant to food hygiene. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **24**, 281–286 (1999)

69. Smedley III J.G., Fisher D.J., Chakrabarti G., McClane B.A.: The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **52**, 183–204 (2004)
70. Setlow P.: I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol.* **15**, 172–180 (2007)
71. Sirous M., Namaki S., Mirshafiey A.: *Clostridia*. *J. Chinese Clin. Med.* **4**, 35–47 (2009)
72. Sobel J., Mixter Ch.G., Kolhe P., Gupta A., Guarner J., Zaki S., Hoffman N., Songer J.G., Fremont-Smith M., Fischer M., Killgore G., Britz P.H., MacDonald C.: Necrotizing enterocolitis associated with *Clostridium perfringens* type A in previously healthy North American adults. *J. Am. Coll. Surg.* **201**, 48–56 (2005)
73. Song H.J., Shim K.N., Jung S., Choi H.J., Lee M.A., Ryu K.H., Kim S.E., Yoo K.: Antibiotic-associated diarrhea: candidate organisms other than *Clostridium difficile*. *Korean J. Intern. Med.* **23**, 9–15 (2008)
74. Songer G.: Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet. Microbiol.* **140**, 399–404 (2010)
75. Songer G.: Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 216–234 (1996)
76. Sparks S.G., Carman R.J., Sarker M.R., McClane B.A.: Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 883–888 (2001)
77. Szajewska H., Mrukowicz J.: Metaanalysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **22**, 365–372 (2005)
78. Tanaka D., Nagai Y. i wsp.: Genotyping of *Clostridium perfringens* isolates collected from food poisoning outbreaks and healthy individuals in Japan based on the *cpe* locus. *Jpn. J. Infect. Dis.* **60**, 68–69 (2007)
79. Tanaka D., Nakamura S. i wsp.: An outbreak of food-borne gastroenteritis caused by *Clostridium perfringens* carrying the *cpe* gene on a plasmid. *Jpn. J. Infect. Dis.* **56**, 137–139 (2003)
80. Wasiński B., Pejsak Z.: Cechy fenotypowe i genotypowe szczepów *Clostridium perfringens* izolowanych od prosiąt ssących. *Medycyna Vet.* **64**, 791–795 (2008)
81. Wasiński B.: Właściwości i chorobotwórczość toksyny β2 *Clostridium perfringens*. *Medycyna Wet.* **64**, 1275–1279 (2008)
82. Watanabe M., Hitomi S., Sawahata T.: Nosocomial diarrhea caused by *Clostridium perfringens* in the Tsukuba-Tsuchiura district, *Japan*. *J. Infect. Chemother.* **14**, 228–231 (2008)
83. Wen Q., McClane B.A.: Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2685–2691 (2004)
84. Winkler L., Gehring C., Wenzel A., Müller S.L., Piehl Ch., Krause G., Blasig I.E., Piontek J.: Molecular deteminats of the interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin fragments and claudin-3. *J. Biol. Chem.* **284**, 18863–18872 (2009)
85. Wiström J., Norrby S.R., Myhre E.B., Eriksson S., Granström G., Lagergren L., Englund G., Nord C.E., Svenungsson B.: Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 43–50 (2001)
86. Wrigley D.M.: Inhibition of *Clostridium perfringens* sporulation by *Bacteroides fragilis* and short-chain fatty acids, *Anaerobe*, **10**, 295–300 (2004)
87. Vaishnavi Ch., Kaur S., Singh K.: *Clostridium perfringens* type A & antibiotic associated diarrhoea. *Indian J. Med. Res.* **122**, 52–56 (2005)
88. Van Asten A.J.A.M., Nikolaou G.N., Gröne A.: The occurence of *cpb*2-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the β2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet. J.* **183**, 135–140 (2010)
89. Van Immerseel F., De Buck J., Pasmans F., Huyghebaert G., Haesebrouck F., Ducatelle R.: *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* **33**, 537–549 (2004)
90. Varga J., Stirewalt V.L., Melville S.B.: The CcpA protein is necessary for efficient sporulation and enterotoxin gene (*cpe*) regulation in *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* **186**, 5221–5229 (2004)
91. Yoo H.S., Lee S.U., Park K.Y., Park Y.H.: Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 228–232 (1997)

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 1, 27–36
http://www.pm.microbiology.pl

MIKROBIOM CZŁOWIEKA – ZDROWIE I CHOROBA

Marian Binek[1*]

[1] Zakład Bakteriologii i Biologii Molekularnej, Katedry Nauk Przedklinicznych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Wpłynęło w maju 2011 r.

1. Wstęp. 2. Techniki wykorzystywane do badań mikrobiomu. 3. Poznanie mikrobiomu człowieka w projekcie NIH. 4. Inne korzyści wynikające z realizacji projektu. 5. Jelitowy mikrobiom człowieka. 6. Skład i funkcja mikrobiomu na podstawie badań metagenomowych. 7. Mikrobiota a zachowanie homeostazy. 8. Mikrobiom a indukcja odpowiedzi poszczepiennej. 9. Podsumowanie

Human microbiome – health and disease

Abstract: Commensal microorganisms are known to colonize and form complex communities (microbiome) at various sites within the mammalian body. Because the human microbiome has the potential to affect so many aspects of human health, it has recently become the focus of a series of international human microbiome projects. Such studies are expected to lead to understanding of the impact of microbiota on human health and disease. Recent advances in sequencing technology have opened an entirely new arena in the research of diverse human microbiomes (the ecological community of commensal, symbiotic, and pathogenic microorganisms). In 2007 the National Institutes of Health launched the Human Microbiome Project to study the human microbiom broadly by examining at least four body sites i.e. gastrointestinal tract, the mouth, the vagina, and the skin. The primary goal of this project is to characterize the human microbiome and determine changes in the microbiome correlated to specific disease states. High-throughput sequencing is used to produce microbiome sequence data of samples from normal and diseased donors. Progress to date includes more than 1000 commensal bacteria genomes that have been completed and deposited in GenBank. In recent years, special attention has been paid to the ability of microbiota to modulate the expression of host genes. This phenomenon forms part of the „cross-talk process" that takes place between the host and its indigenous microbiota. Studies on human intestinal microbiota suggest that host epithelials cell can express specific glycoconjugates in response to the presence of bacteria. Therefore, the gut microflora is responsible for modifying potential sites for attachment. This could be a selective advantage when competing with other bacteria for a niche with limited resources. The mucosal immune system has developed specialized regulatory, anti-inflammatory mechanisms for eliminating pathogens and tolerating commensal microorganisms. Toll-like receptors mediate recognition of microbial patterns to eliminate pathogens. In contrast, commensal bacteria exploit the TLR pathway to actively suppress immunity in order to establish host-microbial symbiosis. Activating anti-inflammatory response in the host via pattern recognition receptor signaling maintains homeostasis. Moreover, it has been shown that the intestinal microbiota composition exerts an effect on the development of immune response to certain vaccine antigens. Thus microbiota along with host human cells form a complex ecosystem which, as a whole interactively performs various biological processes. Their genomes are tightly linked forming an integral part of common metagenome.

1. Introduction. 2. Techniques for the study of human microbiome. 3. The NIH human microbiome project. 4. Additional advantages of launching the human microbiome Project. 5. Human intestinal microbiota. 6. Quality and function of microbiota based on metagenomics sequence data. 7. Microbiota and maintenance of homeostasis. 8. Does the microbiome affect the efficacy of vaccines? 9. Conclusions

Słowa kluczowe: mikrobiom, mikrobiota, metagenom, homeostaza
Key words: microbiom, microbiota, metagenom, homeostasis

1. Wstęp

Organizmy człowieka i zwierząt zamieszkuje co najmniej 10 razy tyle bakterii ile komórek liczą ich organizmy. Stanowią one tzw. endogenną mikroflorę (mikrobiota) stosunkowo mało poznaną i w większości bytująca w układzie pokarmowym [43]. Z chwilą poznania sekwencji ludzkiego genomu okazało się, że wynikające z tego nadzwyczajnego osiągnięcia wnioski, co do znaczenia poszczególnych genów nie są pełne, ponieważ nie są poznane sekwencje oddziałujących na gospodarza (potencjalnie modulujących ekspresję określonych jego genów) miliardów autochtonicznych drobnoustrojów. Takie spojrzenie na mikrobiota wynika z odkrycia, że mikroorganizmy dysponują możliwościami porozumiewania się nie tylko pomiędzy sobą, ale również mogą prowadzić molekularny dialog z komórkami gospodarza. Wielokierunkowa sieć powiązań (cross-talk process), poprzez którą możliwe jest przesyłanie sygnału i porozumiewanie się bakterii z bakteriami, bakterii z gospodarzem i gospodarza z bakteriami sprawia, że mikroorganizmy wraz z komórkami gospodarza tworzą kompleksowy interaktywny ekosystem decydujący o wielu różnych procesach biologicznych, w tym o zdrowiu lub o chorobie [7, 8, 19, 39, 44]. Na rolę mikroorganizmów jelitowych w zachowaniu zdrowia zwrócił już uwagę przed ponad stu laty Ludwik P a s t e u r. Dziś wiemy, że wieloskładnikowe błonowe

* Autor korespondencyjny: 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

„bioczujniki" mikroorganizmów zamieszkujących różne obszary ciała człowieka i zwierząt zdolne są do odbierania zarówno sygnałów fizjochemicznych, jak np. pH, obecności składników pokarmowych, ciśnienia osmotycznego, jak również rozpuszczalnych i strukturalnych składników gospodarza, jak np. składowych powierzchni jego komórki, stanu mikrośrodowiska, obecności składników odpornościowych, produktów uszkodzenia tkanek itp. Sygnały środowiskowe zbierane są na powierzchni komórki bakteryjnej i transportowane następnie do cytoplazmy, gdzie przetwarzane są przez drugi system czuciowy, znany jako *quorum sensing signaling system*. Bakterie wykorzystują ten sposób komunikacji nie tylko do kontrolowania swojej populacji, ale również do odpowiedzi na czynniki gospodarza uwolnione np. w następstwie uszkodzenia jego tkanek, elementy układu odpornościowego, końcowe produkty niedotlenienia tkanek, itp. Czynniki uczestniczące np. w systemie obronnym gospodarza mogą aktywować lub wyciszać bakteryjny *quorum sensing system* podobnie, jak cząsteczki uczestniczące w *quorum sensing system* mogą aktywować sygnały wysyłane przez gospodarza, lub je wyciszać. Możliwy jest zatem międzydomenowy molekularny dialog pomiędzy bakteriami a różnymi komórkami i tkankami gospodarza. Sygnały wysyłane do komórek gospodarza wpływają na ekspresję określonych jego genów i wytwarzania struktur i czynników korzystnych dla stabilizacji bakteryjnej wspólnoty. Wynika więc z tego, że odpowiedź ze strony gospodarza nie zależy tylko od potencjalnych cech kodowanych w bakteryjnym genomie, ale również od procesów na poziomie molekularnym towarzyszącym relacjom bakterie-gospodarz, ich dynamiki i przestrzeni, w której mają miejsce, jak również czasu ich trwania [44–46]. Niezwykła współzależność (mutualizm) pomiędzy organizmami wyższymi i ich mikrobiontami nasunęła pomysł aby podjąć koleiny projekt, porównywalny do poznania sekwencji genomu człowieka, tym razem koncentrujący się nad poznaniem genomów oraz genów drobnoustrojów głównych nisz ekologicznych człowieka (mikrobiom), jak jamy ustnej, jelit, pochwy i skóry. Przyjęto założenie, że człowiek i mikrobiota tworzą razem superorganizm a ich wspólny genom można określić metagenomem. Termin mikrobiom został zaproponowany w 2001 r. przez Joshua L e d e r b e r g'a dla określenia całości ekologicznego środowiska złożonego z drobnoustrojów komensalicznych, symbiotycznych i chorobotwórczych [38].

2. Techniki wykorzystywane do badań mikrobiomu

Dotychczasowe dane na temat ludzkiego mikrobiomu pochodziły głównie z badań opartych o izolację i fenotypową identyfikację drobnoustrojów. Wprowadzenie metod genotypowych, w tym analizy sekwencji wysoce konserwatywnego regionu 16S rRNA ujawniło, że od 20 do 60% drobnoustrojów składających się na mikroboom człowieka nie hoduje się *in vitro*. Co więcej skład jakościowy mikrobiomu okazał się bardziej złożony niż początkowo sądzono i zróżnicowany osobniczo. Podlega rozwojowi i zmianom w zależności od wieku, środowiska życia, sposobu odżywiania się i rodzaju pokarmu, czynników genetycznych, socjalno-bytowych, kulturowych, itp. [16]. W dotychczasowych badaniach nad mikrobiomem różnych nisz ekologicznych nowo rozpoznawane sekwencje 16S rRNA były porównywane ze znanymi sekwencjami zgromadzonymi w bazach danych i na tej podstawie wykrywano i identyfikowano do poziomu gatunku trudno lub nie hodujące się mikroorganizmy [49]. Nie zawsze jednak rozpoznanie bakterii było równoznaczne z poznaniem ich właściwości i wypełnianej w określonym ekosystemie funkcji. W związku z tym konieczne było poznanie ich genów, aby na tej podstawie móc przewidzieć potencjalne ich funkcje. W rozwiązaniu tego dylematu posłużono się metagenomiką (genomika populacyjna drobnoustrojów środowiskowych), która bada cały zbiorczy genom mikrobiota na podstawie DNA pozyskanego bezpośrednio ze środowiska. Dzięki nowoczesnym zautomatyzowanym technologiom możliwe jest obecnie sekwencjonowanie ogromnych bibliotek genowych i komputerowe analizowanie uzyskanych danych, dających możliwości poznania genów obecnych u drobnoustrojów tworzących wspólnoty mikrobiologiczne. Ponieważ 80% bakteryjnych genomów to regiony kodujące białka, stąd większość uzyskanych metagenomowych sekwencji zawiera przynajmniej fragment genu odpowiedzialnego za określone funkcje drobnoustrojów. Na tej podstawie możemy zatem przewidzieć wypełniane przez mikrobionty funkcje. Tak więc współczesne badania ilościowe i jakościowe nad mikrobiontami opierają się nie tylko na rozpoznawaniu sekwencji genu 16S rRNA, ale również na identyfikacji genów kodujących swoiste dla danego czynnika cechy oraz kompleksowym poznaniu mikrobiomu tego środowiska. Najczęstszymi technikami badań są: elektroforeza w żelach z gradientem czynnika denaturującego (denaturing gradient gel electrophoresis), *Real time* PCR, techniki mikromacierzowe, klonowanie i sekwencjonowanie, w tym pirosekwencjonowanie i inne [16, 28, 29, 33, 41].

3. Poznanie mikrobiomu człowieka w projekcie NIH

Metody badania ludzkiego mikrobiomu oparte o analizę sekwencji 16S rRNA oraz sekwencjonowanie metagenomu znalazły zastosowanie w zainicjowanym w 2007 r. przez National Instytutes of Health (USA) 5-letnim projekcie pt. „Human Microbiome", z założenia mającym być swego rodzaju mapą drogowa w naukach

biomedycznych [38]. Koszty projektu skalkulowano na ponad 150 milionów USD, a jego celem jest :

1. Kompleksowe poznanie ludzkiego mikrobiomu w wyniku zastosowania nowych wysokowydajnych technologii sek wencjonowania próbek DNA pobranych z różnych nisz ekologicznych od tzw. „normalnych ochotników",
2. Ustalenie, czy mikrobiom badanych osobników w liczbie co najmniej 250 różni się w zależności od stanu ich zdrowia,
3. Wypracowanie nowych standardów i technologii, a także ustanowienie etycznych i prawnych norm, tak aby w kolejno podejmowanych przez środowiska naukowe badaniach można je było zastosować bez powtarzania tych etapów badań.

Założeniem podjętych zatem prac jest poznanie i ocena różnic w ludzkim mikrobiomie w zależności od badanej populacji ludzi, ich genotypu, stanu zdrowia, wieku, odżywiania się, stosowanego leczenia, środowiska życia i czynników socjalnych. Przyjmuje się również, że w wyniku realizacji projektu możliwe będzie rozpoznanie 900 nowych sekwecji genomowych bakterii i ich dodanie do sekwencji zdeponowanych już w międzynarodowych bazach danych. Poznanie czynników wpływających na skład jakościowy i ilościowy mikrobiontów oraz ich interakcji z gospodarzem może być wykorzystane w dalszej kolejności do wpływania na zachowanie stanu zdrowia gospodarza poprzez monitorowanie i sterowanie jego mikrobiomem [15, 47, 50]. W pierwszym etapie badań, w próbkach pobieranych z różnych miejsc ciała od tzw. „normalnych", czyli klinicznie zdrowych ochotników identyfikuje się sekwencje 16S rRNA poprzez porównanie z sekwencjami już zdeponowanymi bazach danych. Pozwoli to na rozpoznanie gatunków drobnoustrojów i ustalenie ich liczby w danym mikrośrodowisku. Stworzenie zatem referencyjnego zestawu kompletnych sekwencji genomów jest zasadniczym etapem projektu, ponieważ dopiero na tej podstawie można w dalszej kolejności dokonywać interpretacji poznawanych sekwencji metagenomu. Tak więc te same próbki posłużą również do badań nad metagenomem, identyfikacji genów i poznania potencjalnych ich funkcji [17, 32]. Uzyskane od poszczególnych osobników dane będą analizowane pod kątem ustalenia ewentualnego tzw. rdzennego dla badanych nisz mikrobiomu.

Wstępna faza podjętego projektu określona jako „Jumpstart" została zainicjowana przez 4 wspierane przez NIH centra naukowe, jak The Taylor College of Medicine, The Broad Institute, The J.Craig Center Institute i Washington University School of Medicine dysponujące na dużą skalę technicznymi możliwościami sekwencjonowania. Dotychczasowym wynikiem podjętych w 2009 r. prac jest:

a) poznanie ponad 500 sekwencji nowych bakteryjnych genomów wykrytych w różnych okolicach ciała człowieka, dokonanych na podstawie analizy sekwencji 16S rRNA,
b) opracowanie protokołu pozyskiwania i selekcji ochotników do badań, pobierania próbek z pięciu podstawowych miejsc ciała człowieka, tj.: układu pokarmowego, jamy ustnej, pochwy, skóry i nosa w pilotażowym doświadczeniu na 250 tzw. normalnych ochotnikach (bez widocznych klinicznie zaburzeń w obszarach pobierania próbek), w równej liczbie kobiet i mężczyzn wywodzących się z różnych populacji.
c) opracowanie standardów i zasad zachowania jakości w uczestniczących w badaniach laboratoriach oraz sposobów eliminowania błędów i pomyłek wynikających z zanieczyszczeń, artefaktów, itp. [38].

W kolejnym etapie projektu zakłada się kontynuowanie podjętych we wstępnej fazie badań, w tym zsekwencjonowanie co najmniej kolejnych 400 bakteryjnych genomów oraz dodatkowo wirusów i mikroorganizmów eukaryotycznych, stworzenie referencyjnych baz danych uwzględniających sekwencje nowych bakteryjnych genomów oraz opracowanie nowych technologii badań. Istotną częścią projektu jest również poznanie funkcji genów drobnoustrojów wchodzących w skład mikrobiomu. Zasadnicze wątki podjętych badań dotyczą oceny różnorodności mikrobiomu, poznanie jego stałych elementów oraz zmian w określonych miejscach i sytuacjach mogących wskazywać na związek z chorobą. Ze względu na ograniczony czas projektu, na obecnym etapie planuje się raczej ustalenie zależności pomiędzy zmianami w mikrobiomie w nawiązaniu do stanu zdrowiem lub choroby niż ustalenia przyczyn powodujących chorobę. Jeżeli wspomniane związki uda się wykazać, wówczas w kolejnym etapie badań będzie można skoncentrować się nad czynnikami prowadzącymi do choroby w powiązaniu ze zmianami w mikrobiomie [31, 47, 50].

W jednorocznych równolegle prowadzonych pilotażowych projektach podjęto badania nad zmianami w mikroflorze bakteryjnej, składzie wirusów i grzybów w nawiązaniu do określonych stanów chorobowych. Pobierane są więc próbki od osób z zaburzeniami chorobowymi ze strony skóry, nosogardzieli, jamy ustnej, jelit, układu moczo-płciowego czy krwi oraz kontrolnie od osób zdrowych. Sekwencjonowaniu podlegają całe genomy bakterii, grzybów i wirusów a w przypadku bakterii i grzybów również identyfikowane są geny rRNA. W wielu z tych badań równocześnie wykrywa się ekspresję genów mikroorganizmów i gospodarza. Uzyskane dane podlegają analizie przez nowe technologie komputerowe przyczyniające się do poznania zjawisk wpływających na stan zdrowia w zależności od składu i stanu mikrobiomu i ekspresji jego genów.

Zasadniczy projekt badań nad ludzkim mikrobiomem wspomagany jest dodatkowo przez 15 innych, realizowanych w formie grantów, dotyczących oceny

tego zjawiska w różnych procesach chorobowych. Dla przykładu, dotyczą one mikrobiomu skóry chorych na łuszczycę (ponad 7,5 mln. chorych w USA), mających wyjaśnić, czy zmiany w normalnej mikroflorze przyczyniają się do powstania choroby [15]. Oprócz tego, w projekcie oceniany jest wpływ używanych w leczeniu środków immunosupresyjnych na mikrobiom skóry. W innym projekcie oceniany jest wirom u dzieci i jego związek z występującymi u nich chorobami gorączkowymi (20 mln. wizyt u lekarza rocznie, w większości przyczyna gorączki nie zdiagnozowana) [38]. Podjęte badania mają również na celu wyjaśnienie zależność pomiędzy wiromem a odpowiedzią immunologiczną. Kolejny projekt dotyczy wyjaśnienia roli mikrobiomu jelitowego w otyłości [25]. Przyjmuje się, że mikrobiom odgrywa zasadniczą rolę w zachowaniu homeostazy energetycznej u człowieka. Wcześniejsze badania ujawniły różnice w mikrobiomie osób otyłych i szczupłych. Obecne badania przeprowadzane są na populacji Amiszów, ze względu na ich dużą genetyczną homogenność oraz dotychczasowe określone już czynniki charakteryzujące te populację. W badaniach nad mikrobiomem pochwy pokłada się nadzieje na wyjaśnienie przyczyn bakteryjnego zapalenia pochwy (identyfikacja wzoru mikrobiomu predysponującego do BV). Również zakłada się, że rozwój *adenocarcinoma* przełyku stymulowany jest przez określony mikrobiom. Rak ten związany ze zgagą spowodowaną refluksem żołądkowo-przełykowym jest coraz częstszą chorobą występująca u ludzi w USA. Nasilanie się tego zjawiska nie da się wyjaśnić czynnikami środowiskowymi, czy zależnymi od gospodarza. Wstępne badania wykazały, że osoby o szczególnym typie mikrobiomu częściej są predysponowane do wystąpienia wczesnego stadium *adenocarcinoma* przełyku. W trakcie rozwoju raka pojawiają się również znaczące zmiany w mikrobiomie. Wykrycie tych zależności ma nie tylko istotne znaczenie diagnostyczne, ale umożliwi podjęcie wcześniejszej terapii i stwarza nadzieję na zapobieganie rozwojowi choroby w wyniku oddziaływania na mikrobiom i doprowadzania do jego zmiany z niekorzystnego na utrzymujący dobry stan zdrowia [38].

Informacje na temat realizacji projektu, uzyskiwanych wynikach i wypływających z nich wnioskach do wiadomości publicznej przekazuje Centrum Analiz i Koordynacji (*Data Analysis and Coordination Center* – DACC). Powołane biuro koordynuje również rozwój badań standaryzacyjnych oraz ułatwia analizę i deponowanie danych przeznaczonych do użytku publicznego (http:hmpdacc.org/). Strona internetowa DACC zawiera katalog szczepów referencyjnych oraz dane na temat każdego z nich, jak np. okolica ciała, z którego izolat pochodzi, jego znanych sekwencji, jak również informacji, który z ośrodków szczep sekwencjonował lub sekwencjonuje [38].

4. Inne korzyści wynikające z realizacji projektu

Realizowany projekt dodatkowo przyczynia się do rozwoju nowych technologii, w tym również takich, które umożliwiają hodowanie *in vitro* bakterii, dotychczas nieznanych, izolacji pojedynczych komórek i ich DNA, amplifikacji i klonowania, selektywnego wzmagania wzrostu określonych gatunków bakterii itp. Założeniem niektórych pojedynczych projektów jest również pobieranie próbek z takich miejsce w jelitach, z których zwykle nie są one popierane. Dotyczy to np. bakterii ścisłe przylegających do śluzówki, izolacji pojedynczych gatunków techniką *flow-sorting* oraz namnożenia *in vitro* technikami dotychczas nie stosowanymi w hodowli bakterii jelitowych człowieka, w warunkach imitujących panujące w naturze. Pozwoli to na pozyskanie dużych fragmentów DNA również tych gatunków, których sekwencje nie były znane lub znane są tylko fragmentarycznie [16, 28, 32, 41, 47, 51].

Liczne dane otrzymane z przeprowadzonych badań wymagają odpowiedniego ich dokumentowania, analizowania, w tym również metodami statystycznymi, przeprowadzania określonych symulacji i obliczeń statystycznych. To wszystko pływa na rozwój technik komputerowych i opracowanie niezbędnych do tych celów programów.

Zasady upowszechniania uzyskanych w badaniach danych zostały zawarte w porozumieniu z Fort Lauderdale. Ich upublicznienie nastąpi po 12 miesiącach od opracowania [38].

Równolegle z podjętym w 2007 r. z inicjatywy NIH projektem, zorganizowane zostało spotkanie z przedstawicielami ośrodków naukowych świata w celu przedyskutowania utworzenia Międzynarodowego Konsorcjum Badań nad Ludzkim Mikrobiomem (*International Human Microbiome Consortium* – IHMC). Zadaniem tej instytucji jest koordynowanie podobnych badań podejmowanych i realizowanych na świecie, tak aby nie powielać przeprowadzonych już doświadczeń, wspólnie szybko gromadzić nowe dane, utrzymywać ustanowione standardy badań oraz dzielić się rezultatami wynikającymi z badań. IHMC oficjalnie został powołany we wrześniu 2008 i skupia 10 krajów. Jest otwarty dla członkostwa innych akceptujących przyjęte przez IHMC zasady.

Tak więc projekt poświęcony poznaniu ludzkiego mikrobiomu przesuwa kolejno granicę poznania i wnosi do nauk medycznych nowe dane na temat zmian w mikrobiomie, odzwierciedlające potencjalny stan zdrowia lub choroby. Przyczynia się do ustanowienia standardów i zasad kontroli jakości. Poznane nowe sekwencje będą traktowane, jako dane referencyjne do wykorzystania w badaniach przeprowadzanych w przyszłości [38] .

5. Jelitowe mikrobionty człowieka

Wydaje się, że mikroorganizmy jelitowe stanowią odrębną, w porównaniu do innych środowisk filogenetyczną grupę, która koewoluowała razem ze swoim gospodarzem, nabierając unikatowych cech i wypełniając funkcje, które przyczyniają się do ukształtowania wzajemnych relacji, jako mutualizmu [9, 29, 43]. Próby jakościowej i ilościowej oceny jelitowego mikrobiomu człowieka były podejmowane już wcześniej, głównie w oparciu o ocenę różnic w sekwencjach genu kodującego 16S rRNA. Ich wyniki ujawniły, że nawet 80% fylotypów (odpowiednik gatunku określony na podstawie analizy 16S rRNA) miało sekwencje gatunków bakterii dotychczas nie hodujących się *in vitro*. Badanie to wykazało również duże indywidualne zróżnicowanie mikroflory. Wchodzące w jej skład bakterie w 98% należały do typów: *Firmicutes* (64%), *Bacteroides* (23%), *Proteobacteria* (8%) i *Actinobacteria* (3%) [17]. W długoterminowych, trwających ponad rok badaniach nad mikroflorą jelitową ludzi otyłych wykazano różnice w ich mikroflorze w porównaniu do osób szczupłych [25]. Podobnie rzecz się miała u osób chorych na nieswoiste zapalenie jelit, którego etiologię w jakiejś części wiąże się z kompozycją mikroflory. Istotnie okazało się, mikroflora jelitowa tych osób była mniej zróżnicowana w porównaniu do mikroflory osób zdrowych [9, 27, 37]. Skład mikroflory jelitowej noworodków podlega gwałtownym zmianom w pierwszym roku życia, wykazuje indywidualne różnice, jednakże jest ona mniej złożona w porównaniu do mikroflory dorosłych [34]. Mikroflora bliźniaków wykazuje istotne podobieństwa na poszczególnych etapach ich rozwoju, natomiast nie stwierdza się wpływu na jej skład w zależności od tego, czy dziecko urodziło się w sposób naturalny czy na drodze cesarskiego cięcia, karmienia piersią, czy pokarmem sztucznym. Źródło bakterii zasiedlających wcześnie jelita noworodka, złożonych głównie ze *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae* i *Bifidobacterium*, nie jest do końca ustalone, część z nich przenosi się od matki [7, 23, 34].

Wyniki badań ostatnich lat ujawniły, że to same bakterie decydują o zasiedleniu określonej niszy. Następuje to w wyniku procesu *cross-tolk* i wpływania przez drobnoustroje na ekspresje określonych genów gospodarza. W przypadku bakterii jelitowych, można wykazać ich wpływ na powstawanie na komórkach nabłonka jelitowego i komórkach układu immunologicznego glikokoniugatów (*pattern recognition receptors* – PRPs) o wzorze pasującym do molekularnych wzorców mikrobiontów (*microbiota-associated molecular patterns* – MAMPs) [7, 8, 13, 26, 39]. W doświadczeniach na myszach wykazano, że *Bacteroides thetaiotaomicron* poprzez drobne rozpuszczalne związki przesyła biochemiczny sygnał do komórek nabłonka jelitowego, w wyniku którego aktywowana jest α1,2-fukozyloftransfera i wytwarzane są fukozylowane glikokoniugaty. Takie receptory z kolei, wpływają na kolonizowanie się tylko określonych bakterii. Opisane zjawisko pokazuje, że bakterie wpływają w sposób selektywny na kolonizowanie przez nie określonych nisz gospodarza. Najczęściej zjawisko to uwarunkowane jest ograniczonymi zasobami substratowymi, czy też wynika z ogólnego bilansu energetycznego danego środowiska. Wydaje się, również, że to bakterie decydują o momencie, w których takie modyfikacje są przez nie indukowane. Dodatkowo modyfikowanie powstałych glikokoniugatów może mieć miejsce w wyniku wytwarzania przez drobnoustroje endo- i egzo- glikozydaz [26, 27].

6. Skład i funkcji mikrobiontów na podstawie badań metagenomu

Poznanie biologicznych cech i funkcji wypełnianej przez poszczególnych członków złożonego środowiska ekologicznego jelit, podlegającego dynamicznym zmianom jest zasadniczym celem badań nad ludzkim mikrobiomem. O funkcjii wypełnianej przez jelitowy mikrobiom można wnioskować na podstawie poznania właściwości wyizolowanych *in vitro* drobnoustrojów. Jak wspomniano wcześniej, z przebadanych metodą sekwencjonowania16S rRNA bakterii jelitowych, tylko około 20% hoduje się *in vitro*. To sprawia, że badanie funkcji w przeważającej liczbie nie hodujących się bakterii należy prowadzić innymi metodami a więc poszukiwać takiego rozwiązania, które bez konieczności izolacji bakterii *in vitro* daje szanse na poznanie ich właściwości. Takie możliwości daje metagenomika, która bada sekwencje DNA pobranego bezpośrednio ze środowiska jelita, traktowanego jako jeden wspólny zespół genów. Ponieważ prawie 80% bakteryjnego genomu to regiony kodujące białka, dlatego większość sekwencji metagenomu stanowią geny związane z określoną funkcją. W ten więc sposób można przewidzieć wypełnianą przez nieznane i nie hodujące się bakterie jelitowe funkcję [16, 29, 32, 37, 41, 51]. W dotychczas przeprowadzonych badaniach, w których zsekwncjonowano 78 megazasadowy (Mpz) metagenom mikrobiomu jelitowego człowieka, stwierdzono znaczącą liczbę genów nie występujących w genomie człowieka. Ich produkty biorą udział w metabolizmie nie rozkładanych przez człowieka związków, jak np. wielocukrów, niektórych aminokwasów i ksenobiotyków, biosyntezie witamin i isoprenoidów. Wyniki tych badań wskazują na symbiotyczne oddziaływanie mikroflory, z którą organizm gospodarzem tworzy razem superorganizm, którego zespół genów można określić jako metagenom [17]. Geny mikrobiomu jelitowego można zgrupować w dwóch zbiorach ortologicznych, jeden liczniejszy charakterystyczny dla dorosłych i dzieci oraz drugi

mniejszy, typowy dla niemowląt. W większości są to geny związane z metabolizmem cukrów, z tym, że u dorosłych ich produkty (w tym wytwarzane przez *Bacteroides*) uczestniczą w degradacji wielocukrów, a u niemowląt w transporcie cukrów. Sugeruje to, że funkcja mikrobiota jest zależna od ilości określonych substratów diety i wraz ze wzrostem określonych komponentów stwierdza się większą liczbę genów, których produkty zaangażowane są w metabolizm tych związków (w przypadku wielocukrów ich rozkład do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, w tym masłowego, przyczynia się do wytworzenia produktów stanowiących dla gospodarza główne źródło energetyczne bakteryjnego pochodzenia). Zjawisko to ilustruje również funkcjonalną adaptację mikrobiontów do określonego środowiska gospodarza [11, 51].

Porównanie genów bakterii jelitowych do genów bakterii występujących w innych środowiskach, jak np. w wodzie morskiej, wodzie słodkiej, glebie, roślinach a także w stosunku do genów występujących u mikroorganizmów komensalych i patogennych ujawniło najwyższy odsetek takich samych genów u bakterii komensalnych. Te, u których odsetek ten jest niższy, nakładają się na geny występujące u patogenów, co sugeruje, że komensalne bakterie o niskim odsetku genów typowych dla mikroflory jelitowej mogą być pierwotnym rezerwuarem patogenów [17, 47]. Porównanie najważniejszych gatunków bakterii stanowiących składniki mikroflory jelitowej i mających najwyższą proporcję genów typowych dla bakterii jelitowych bytujących u osób dorosłych i niemowląt wykazało istotne różnice pomiędzy gatunkami niosącymi wspomniane geny, jak i ich proporcjami. U osób dorosłych geny takie były zlokalizowane w genomie różnych gatunków zaliczanych głównie do rodzajów *Bacteroides*, *Eubacterium* i *Ruminococcus*. Z kolei u niemowląt geny te były zlokalizowane głównie w genomie bakterii z rodzajów *Clostridium*, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Gatunki bakterii, u których wspomniane geny występowały w wyższej proporcji dominowały w jelicie [17].

W konkluzji można więc powiedzieć, że wysoki odsetek genów bakterii komensalnych kodujących określone funkcje bakterii jelitowych świadczy o takiej ich ewolucyjnej przemianie, w wyniku której zyskały cechy dające im przewagę nad mikroorganizmami konkurencyjnymi, wraz ze zdolnością do kolonizowania jelit określonego gospodarza i przetrwania w tym środowisku. Również pozwala na wypełnianie określonych funkcji w ekosytemie, którego są składową. Taka funkcjonalna adaptacja powoduje, że drobnoustroje jelitowe nie są na ogół zdolne do życia w innych środowiskach różniących się zasobnością niezbędnego pokarmu, czy innymi warunkami [9, 22, 24].

Około75% genów metagenomu wykazuje identyczność sekwencji sięgające od 40 do 100% do genów występujących u znanych bakterii. Na tej podstawie w składzie mikroflory możemy wyróżnić dwie grupy drobnoustrojów, takich, których podobieństwo sekwencji genów do sekwencji genów metagenomu przekracza 80% i takich, których ID wynosi od 50 do 80%. Do typowych bakterii z pierwszej grupy należy zaliczyć rodzaj *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bifodobacterium* i *Bacteroides*. Natomiast niskie podobieństwo sekwencji genów metagenomu stwierdzono w porównaniu do sekwencji genów występujących u takich rodzajów, jak *Bacillus*, *Clostridium* i *Streptococcus*. Prawdopodobnie gatunki wymienionych bakterii nie były dotychczas wyizolowane *in vitro* i ich sekwencje nie zostały jeszcze poznane [17].

7. Mikrobionty a zachowanie homeostazy

Badania nad funkcją genów bakterii komensalnych, decydujących o kolonizowaniu się w jelitach ujawniły, że ich zmienna regulacja transkrypcji powoduje, iż bakterie adaptują się do środowiska w zależności od dostępności składników pokarmowych. Takie zdolności stwierdzono między innymi u *Bacteroides thetaiotaomicron*. Z kolei o kolonizowaniu się *Bacteroides fragilis* decyduje ekspresja powierzchniowych glikanów. Geny odpowiedzialne za kolonizowanie się bakterii odkryto także u wielu szczepów pałeczek *Lactobacillus*. Obecność innych bakterii również wpływa na to zjawisko. Zasiedlenie przewodu pokarmowego myszy bezbakteryjnych *Bifidobacterium longum* i *Bacteroides thetaiotaomicron* oddzielnie i razem ujawniło, że *B. longum* wpływa na dostępność substratów cukrowcowych niezbędnych dla *B. thetaiotaomicron*, a więc reguluje jego rozprzestrzenianie się. Co więcej, *B. longum* w towarzystwie *B. thetaiotaomicron* przyczynia się do obecności innych bakterii ponieważ obniżenia ekspresję genów gospodarza odpowiedzialnych za antybakteryjną aktywność skierowaną przeciwko bakteriom Gram-dodatnim [4, 11, 13, 20, 26, 27, 39].

W reakcji z układem immunologicznym gospodarza bakterie komensalne wykazują szereg cech wspólnych z bakteriami chorobotwórczymi. Ich elementy składowe ściany komórkowej, jak np. lipopolisacharyd (LPS), kwasy lipotejchowe, czy peptydoglikan są rozpoznawane przez białka błonowe stanowiące receptory komórek gospodarza, jak receptory Toll-podobne (Toll-like receptor – TLR). Znajdują się one na powierzchni komórek nabłonka jelitowego, dróg oddechowych, adipocytów, komórek tucznych, dendrytycznych i makrofagów. W sytuacji normalnej odpowiedzi gospodarza ich połączenie się z odpowiadającym im molekularnym wzorcom drobnoustrojów powoduje uruchomienie cyklu przemian, w wyniku, których aktywacji ulega czynnik transkrypcyjny NF-κB i cytokinowe geny promotorowe. Doprowadza to do masowej produkcji cytokin i che-

mokin, syntezy antybakteryjnych peptydów i aktywacji komórek dendrytycznych skutkujących eliminacją drobnoustroju. Podobnie aktywowane endotoksyną makrofagi (przez TLR4) rozpoczynają w przeciągu kilkunastu minut produkcję cytokin prozapalnych takich, jak TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 i innych [6, 12, 42].

Aktywacja TLR i w konsekwencji transaktywacja NF-κB przyczynia się również do produkcji przez enterocyty defensyn. W doświadczeniach na myszach udowodniono, że bakterie komensalne są zdolne do indukcji poprzez TLR chroniącej gospodarza odpowiedzi przeciwzapalnej ale również te same bakterie w sytuacji, w której nie jest on zdolny do produkcji przeciwzapalnej IL-10, indukują przynoszącej gospodarzowi szkodę odpowiedź zapalną [1, 27, 35]. Przykład ten pokazuje, że relacje pomiędzy gospodarzem i mikroorganizmami są pewną formą wysublimowanej równowagi, wynikającej z kontrolowanego pobudzania układu immunologicznego, w wyniku czego może dochodzić do rozwoju prozapalnej reakcji, kiedy mikroorganizmy lub ich produkty będą wnikały np. poza granice jelit lub przeciwzapalnej reakcji gospodarza w sytuacji ich bytowania w granicach jelit.

Komórki nabłonka jelitowego, komórki Paneth'a i dendrytyczne są źródłem wielu endogennych substancji przeciwbakteryjnych, jak lizozym, fosfolipaza, różnych przeciwdrobnoustrojowych peptydów, jak α-defensyn, angiogeniny 4, czy RegIIIγ [5]. Ten ostatni czynnik jest lektyną typu C ulegającą ekspresji w wyniku sygnału przesyłanego w następstwie aktywacji TLR. Sygnał ten może być jednak hamowany miedzy innymi przez pałeczki *Bifidobacterium*. Inne receptory występujące na komórkach gospodarza, jak białka NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) wykazują zdolność łączenia się z peptydoglikanem i polisacharydem oraz przekazywania sygnału aktywującego NF-κB niezależnie od receptorów TLR. W wyniku aktywacji przez petydoglikan NOD2 obecnych na komórkach Panetha'a dochodzi do ekspresji α-defensyn. Mutacja genu kodującego NOD2 koreluje z wystąpieniem niektórych objawów choroby Leśniowskiego-Crohna. Ekspresja α-defensyn w jelitach cienkich u osób chorych na chorobę Leśniowskiego-Crohna obejmująca jelita cienkie ulega znaczącemu zahamowaniu, nie dotyczy to jednakże pacjentów z chorobą obejmującą okrężnicę [40, 48]. Innym przykładem stabilizującego oddziaływania mikrobiontów na środowisko jelit jest aktywność niektórych szczepów ziarniaków *Enterococcus*, które regulują fosforylację receptorów aktywowanych proliferatami peroksyzomów gamma (*peroxisome proliferators-activated receptor* γ – PPAR-γ). Przyczyniają się na tej drodze do indukcji ekspresji genów docelowych w tym odpowiedzialnych za wytwarzanie przeciwzapalnie oddziałującej IL-10. Myszy pozbawione PPAR-γ nie są w stanie utrzymać homeostazy jelitowej [3]. Z kolei *Bacteroides thetaiotaomicron* za pośrednictwem PPAR-γ powoduje redystrybucję ReIA, stanowiącego podjednostkę NF-κB w cytoplazmie w wyniku czego dochodzi do selektywnego osłabienia odpowiedzi zapalnej. *Saccharomyces boulardii* produkuje natomiast mały, ciepłostabilny czynnik zapobiegający degradacji IκBα co ogranicza wiązanie się NF-κB z DNA i ekspresję IL-8. Na podobnej drodze przeciwzapalnie oddziałuje również *Bacteroides thetaiotaomicron*. Ten ostatni gatunek bakterii dodatkowo „wymusza" na gospodarzu produkcję fukozylowanych glikanów w miejsce sialowanych glikanów, ponieważ sam wykorzystuje fukozę, jako źródło energii. Dzieje się tak prawdopodobnie za sprawą wytwarzanego czynnika sygnalnego (*control of signal production* – CSP) aktywującego transkrypcję genów fukozylotranferazy [1,8,26]. Przytoczone dane pokazują, że bakterie autochtoniczne i ich produkty w wyniku oddziaływania na jądrowy czynnik, jakim jest PPAR-γ uczestniczą w regulacji odpowiedzi przeciwzapalnej gospodarza.

Inne mechanizmy bakteryjnego kształtowania homeostazy jelitowej zachodzą poprzez ich produkty metabolizmu, jak np. kwas masłowy będący produktem bakteryjnej fermentacji cukrów, indukuje on ekspresję przeciwbakteryjnego peptydu katelicydyny. Powoduje też przyhamowanie nadmiernego wzrostu bakterii. Zabijając bakterie ogranicza ich kontakt z nabłonkiem jelitowym i minimalizuje stymulowanie odpowiedzi zapalnej [17]. Niektóre antybakteryjne peptydy ulegają wysokiej ekspresji w okresie postnatalnym [30]. W doświadczeniach na myszach zauważono, że u zwierząt urodzonych naturalnie LPS aktywuje receptor TLR, w wyniku czego dochodzi do przekazywania sygnału uruchamiającego kaskadę wewnątrzkomórkowych przemian. Zjawisko to nie występuje natomiast u myszy urodzonych na drodze cesarskiego cięcia. Może to sugerować, że w trakcie naturalnego porodu dochodzi do ekspozycji noworodków na komensalną florę matki i ich zasiedlania się w jelitach. Rozpoczyna się w ten sposób pewien proces kształtowania się wzajemnych relacji pomiędzy mikro- i makroorganizmem prowadzący do zachowania tolerancji i stabilnej równowagi [21,24,35,39]. Produkowane również przez jelitową tkankę limfatyczną (*gut-associated lymphoid tissues* – GALT) przeciwciała wydzielnicze IgA w znacznym stopniu wpływają na liczbę i skład mikroflory jelitowej [36]. Jelitowa alkaliczna fosfataza uczestniczy z kolei w defosforylacji reszt fosforanowych LPS-u, przez co związek ten traci właściwości toksyczne, a to z kolei zapobiega penetracji bakterii przez komórki nabłonka jelitowego [14]. Wynika więc z tego, że również wspominany enzym przyczynia się do zachowania jelitowej homeostazy.

Badania nad kaskadą przemian uruchomionych sygnałem z aktywowanego przez LPS TLR4 makrofagów wykazały ekspresję dwóch grup genów. Jedne z nich

odpowiadały na stymulację LPS-em we wczesnej fazie i były to geny kodujące prozapalne cytokiny i druga odpowiadająca na powtórną stymulację LPS-em skupiająca geny odpowiedzialne za wytwarzanie antybakteryjnych peptydów. Odpowiednia modyfikacja białek histonowych wpływała regulacyjnie na te przemiany i decydowała o wrażliwości na bakteryjne zakażenie. zachorowanie [4, 27].

W wyniku koewolucyjnego rozwoju gospodarza i jego autochtonicznej mikroflory dochodzi do wytworzenia mechanizmów tolerancji i braku odpowiedzi gospodarza na mikroorganizmy komensaliczne oraz skierowanie reakcji obronnej przeciwko patogenom. Biorą w niej udział przeciwciała IgA alkaliczna fosfataza, wiele różnych antybakteryjnych peptydów oraz mechanizmy kontrolujące odpowiedź prozapalną. W odpowiedzi na to patogenne mikroorganizmy wykształciły mechanizmy adaptacyjne, jak również wytwarzają szereg czynników zjadliwości, w tym białek efektorowych zapewniających im dodatkowe sposoby inwazji, czy też unikania reakcji ze strony układu odpornościowego gospodarza. Poprzez wpływanie na odpowiedni skład mikrobiontów przyczyniają do rozwoju odpowiedzi pozapalnej. Mikroorganizmy komensalne z kolei ewoluują nie tylko w kierunku wypełniania określonych w środowisku jelit funkcji, jak np. rozkładania cukrów, wytwarzania energii, przyspieszania dojrzewania i proliferacji komórek nabłonka jelitowego, ale również w kierunku eliminacji niepożądanych zdarzeń prowadzących do indukcji odpowiedzi pozapalnej [4, 17, 27, 35].

8. Mikrobiom a indukcja odpowiedzi poszczepiennej

Rola bakterii jelitowych w trawieniu i wchłanianiu się pokarmu, rozwoju jelit i syntezie substancji, których gospodarz sam nie jest w stanie wytworzyć, jak np. witamin została dość dobrze poznana. Również w świetle ostatnich badań pewna skłonność do zachorowań lub oporność na choroby przewodu pokarmowego, jak nieswoiste zapalenie jelit i inne, otyłość, czy również choroby obejmujące inne narządy wiązane są ze składem jelitowych mikrobiontów [18, 25, 37]. Dość dobrze poznany jest także udział bakterii jelitowych w rozwoju układu immunologicznego związanego z jelitami, indukcji mechanizmów odpornościowych i tolerancji na florę własną. Nie do końca jednak wiadomo, czy jelitowe mikrobionty wpływają na odporność indukowaną szczepionkami. Wiadomo, że występujące w jelitach segmentowane bakterie o morfologii niciowatej przyczyniają się do dojrzewania obecnych w tym środowisku limfocytów T. Mając na względzie oddziaływanie jelitowych bakterii na aktywność niektórych leków podawanych doustnie nie wyklucza się, że mogą one również wpływać na przetwarzanie wchodzących w jej skład antygenów [8, 21]. Badania kliniczne nad skutecznością doustnych szczepionek przeciwko polio, zakażeniom rotawirusami i cholerze wykazały ich niższą immunogenność u osób wywodzących się z krajów rozwijających się w porównaniu do populacji krajów wysokorozwiniętych o wysokich standardach higieny. Szczepionka przeciwko cholerze zastosowana u nikaraguańskich i szwedzkich dzieci indukowała dużo niższą odpowiedź immunologiczną u tych pierwszych. W badaniach z użyciem żywej szczepionki okazało się, że bakterie obficie namnażają się w jelitach dzieci pochodzących z krajów ubogich i prawdopodobnie tym faktem należy tłumaczyć niskie miana skierowanych przeciwko nim przeciwciał. Podobne doświadczenia przeprowadzone z użyciem szczepionki na bazie różnych szczepów *Shigella flexneri* u dorosłych i dzieci w Bangladeszu i USA wykazały wysoką odporność poszczepienną u Amerykanów i niską u ludności zamieszkującej Bangladesz [10]. W stawianych hipotezach mających na celu wyjaśnianie opisanych różnic uwzględnia się warunki socjoekonomiczne, dostępność pożywienia, czynniki genetyczne, jak również ewentualną wczesną ekspozycję ludności na te lub pokrewne mikroorganizmy. Chociaż zjawisko to jest słabo poznane, nie wyklucza się również wpływu jelitowych mikrobiontów na indukcję odporności w następstwie doustnego szczepienia. Analogicznie do obserwacji, co do prawdopodobnego wpływu wysokiej higieny we wczesnym okresie życia człowieka na wyższą skłonność takich osobników do alergii, nie wyklucza się, że podobnie rzecz się ma z indukcją poszczepiennej odpowiedzi immunologicznej. Przypuszcza się, że w stosunku do mikrobiota osobników narażonych na większą ekspozycję mikroorganizmów (antygenów) w społecznościach żyjących w niskich standardach higieny, organizm gospodarza wytwarza szerszą w stosunku do nich tolerancję, obejmującą również antygeny szczepionkowe, z którymi lub podobnymi mógł się spotkać w przeszłości. Powyższa hipoteza została poparta doświadczeniem na kurczętach, u których wcześniejsze podanie antybiotyków (ograniczenie składu mikrobiontów) wpływało na wzrost miana przeciwciał po immunizacji zwierząt drogą pokarmową. Doświadczenie to pokazuje również, że określone populacje bakterii mają wpływ na poszczepienną odpowiedź immunologiczną. Co więcej, niektóre probiotyczne bakterie w krótkim okresie po ich podaniu (od 1 do 5 tygodni) wpływają na zwiększenie odpowiedzi poszczepiennej przeciwko cholerze, salmonellozie, polio i zakażeniom rotawirusowym. Podobnie dodatnią korelację pomiędzy podaniem probiotyków a szczepieniami parenteralnymi zaobserwowano u niemowląt szczepionych przeciwko błonicy, tężcowi, zakażeniom *Haemophilus influenzae* typu B i zapaleniu wątroby typu B [4, 10]. Przytoczone dane nie pochodzą niestety z badań długofalowych, dlatego nie wiadomo, jak te zależności kształtują się wraz

z rozwojem życia człowieka. Nie wyklucza się jednak, że probiotyki wpływając na wzrost jednych populacji bakterii i przyhamowując wzrost innych mogą na tej drodze wpływać również na efektywność doustnych szczepionek. W doświadczeniu na myszach podanie frukto-oligosacharydowego prebiotyku zwiększało odpowiedź poszczepienną przeciwko pałeczkom *Salmonella*. Autorzy tego eksperymentu nie przeprowadzili jednak badań, z których wynikałoby, że miało to związek ze zmianami w mikroflorze jelitowej. Jednakże w innym doświadczeniu, w którym u myszy zastosowano mieszaninę prebiotyków, takich jak galakto- i frukto-oligosacharydów wykazano, że przyczyniło się to do podniesienia odporności ogólnej w wyniku szczepienia przeciwko grypie. W tym przypadku zaobserwowano wzrost niektórych składowych zespołu mikrobiontów sugerujący udział wspólnoty mikroorganizmów w indukcji odpowiedzi immunologicznej gospodarza [10].

Przytoczone dane pokazują, że mikrobionty ma wpływ na kształtowanie odpowiedzi poszczepiennej, jednakże istota tego zjawiska w większości jest niewyjaśniona. Ale już na tym etapie wiedzy poznanie mikrobiomów różnych, często geograficznie odległych ludzkich populacji może przyczynić się do prognozowania skuteczności szczepionek, jak również takie ich antygenowe dostosowanie, aby bardziej specyficznie i efektywnie indukowały odporność.

9. Podsumowanie

Badania nad mikrobiomem różnych nisz ekologicznych człowieka niewątpliwie przyczynią się do lepszego zrozumienia znaczenia drobnoustrojów autochtonicznych w biologii organizmu wyższego, w tym poznania tych relacji, które składają się na zachowanie zdrowia lub rozwoju choroby [2]. Analiza mikrobiomu w zależności od genotypowych cech gospodarza, jak również jego metabolicznego fenotypu pozwoli na poznanie tych wszystkich czynników, które oddziałują ze strony gospodarza na własne mikrobionty i ich reakcje przyczyniające się do zachowania homeostazy. Tworzenie zintegrowanych metabolicznych map (obejmujących zarówno gospodarza, jak i mikrobionty) takich środowisk i wykrywanie bioczynników wskazujących na predyspozycję do określonej choroby może przyczynić się do rozwoju nowych metod diagnostycznych w odniesieniu do poszczególnych osób, specyficznego doboru leków, czy też zindywidualizowanego leczenia. Wiele aktywnych bakteryjnych czynników i molekularnych mechanizmów ich interakcji z gospodarzem zostało dotychczas poznanych. Znacznie więcej jest jednak w dalszym ciągu nieznanych. Odkrycie nowych genów mikrobiontów i ich funkcji w wyniku realizowanego projektu badań nad mikrobiomem człowieka oraz ich powiązanie z genami człowieka, które odpowiadają na sygnały wysyłane przez bakterie jest kluczowe dla pełnego poznania fizjologii człowieka i poznania tych składników diety, które wpływają na liczbę i skład jelitowych mikrobiontów. W takim sensie realizowany projekt „Human Microbiome" otwiera drogę do nowego poznania, w którym organizm człowieka i jego mikrobom są ze sobą ściśle powiązane tworząc jeden wspólny superorganizm, a ich genomy można traktować jako wspólny metagenom [17].

Piśmiennictwo

1. Acheson D.W., Luccioli S.: Microbial-gut interaction in health and disease. Mucosal immune responses. *Best Prac. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 238–404 (2004)
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. Are A., Aronsson L., Wang S., Greicius G., Lee Y.K., Gustafsson S., Arulampalam V.: *Enterococcus faecalis* from newborn babies regulate endogenous PPARγ activity and IL-10 levels in colonic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1943–1948 (2008)
4. Blum S., Schiffrin E.J.: Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: implications for probiotic bacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol*. **4**, 53–60 (2003)
5. Brandl K., Plitas G., Schnabl B., DeMatteo R.P., Pamer E.G.: MyD88-mediated signals induce the bacterial lectin RegIIIγ and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med*. **204**, 1891–1900 (2007)
6. Brisbin J.T., Gong J., Sharif S.: Interaction between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. *Anim. Health Res. Rev*. **9**, 101–110 (2008)
7. Bry L., Falk P.G., Midvedt T., Gordon I.J.: A model for host--microbial cross-talk in an open mammalian ecosystem. *Science*, **272**, 1380–1383 (1996)
8. Clavel T., Haller D.: Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation. *Curr. Issues Intest. Microbiol*. **8**, 25–43 (2007)
9. Eckburg PB., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **308**, 35–1638 (2005)
10. Ferreira R.B.R., Antunes L.C.M., Finlay B.B.: Should the human microbiome be considered when developing vaccines? *PLoS Pathogens*, **6**, 1–2 (2010)
11. Flint H.J., Bayer E., Rincon M.T., Lamed R., White B.A.: Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 121–131 (2008)
12. Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R.: Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modification. *Nature*, **447**, 972–978 (2007)
13. Freitas M., Axelsson L.G., Cayuela C., Midvedt T., Trugnan G.: Microbial-host interactions specifically control glycosylation pattern in intestine mouse mucosa. *Histochem. Cell Biol.* **118**, 149–161 (2002)
14. Goldberg R.F., Austen W.G., Zhang X., Munene G., Mustafa G., Biswas S., McCormack M., Eberlin K.R., Nguyen J.T., Taflidede H.S., Warren H.S., Narisawa S., Millan J.L., Hodin R.:

Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3551–3556 (2008)
15. Griece E.A., Segre J.A.: The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol*. **9**, 244–253 (2011)
16. Handelsman J.: Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganismas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. **68**, 669–685 (2004)
17. Hattori M., Taylor T.D.: The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Research*, **16**, 1–12 (2009)
18. Holmes E., Loo R.L., Stamler J., Bictash M., Yap I.J.S., Chan Q., Ebbels T., De Ioro M., Brown I.J., Veselkov K.A., Daviglus M.L., Keteloot H., Ueshima H., Zhao L., Nicholson J.K., Elliott P.: Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure. *Nature*, **453**, 396–400 (2008)
19. Hörmannsperger G., Haller D.: Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. *Int.J.Med. Microbiol*. **300**, 63–73 (2010)
20. Hooper L.V., Gordon J.I.: Commensal host bacterial relationships in the gut. *Science*, **292**, 1115–1118 (2001)
21. Kelly D., King T., Aminov R.: Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat. Res*. **622**, 58–69 (2007)
22. Kizerwetter-Świda M., Binek M.: Salivaricin B gene-its localization and RFLP analysis in two potentially probiotic *Lactobacillus salivarius* strains. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, **54,** 513–516 (2010)
23. Koenig J.E., Spor A., Scalone N., Fricker A.D., Stombaugh J., Knight R., Angenent L.T., Ley R.E.: Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000081107
24. Lee Y.K., Mazmanian S.K.: Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science*, **330**, 1768–1773 (2010)
25. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I.: Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, **444**, 1022–1023 (2006)
26. Liu C.H., Lee S.M., Vanlare J.M., Kasper D.L., Mazmanian S.K.: Regulation of surface architecture by symbiotic bacteria mediates host colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 3951–3956 (2008)
27. Lu L., Walker W.A.: Pathologic and physiological interaction of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am. J. Clin. Nutr*. **73**, 1124S–1130S (2001)
28. Mardis E.R.: The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*. **24**, 133–141 (2008)
29. Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Takada T., Tanaka R.: Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for Real--time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol*. **70**, 7220–7228 (2004)
30. Ménard S., Forster V., Lotz M., Gütle D., Duerr C.U., Gallo R.L., Henques-Normark B., Pütsep K., Andersson M., Glocker E.O., Hornet M.W.: Developmental switch of interstinal antimicrobial peptide expression. *J. Exp. Med*. **205**, 183–193 (2008)
31. Mira A., Martin-Cuadrado A.B., D'Auria G., Rodriguez-Valera F.: The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. *Int. Microbiol*. **13**, 45–57 (2010)
32. Morita H., Kuwahara T., Ohshima K., Sasamoto H., Hoh K., Hattori M., Hayashi T., Takami H.: An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes Environ*. **22**, 214–222 (2007)
33. Pallen M.J., Loman N.J., Penn Ch.W.: High-throughput sequencing and clinical microbiology: progress, opportunities and challenges. *Curr. Opin. Microbiol*. **13**, 625–631 (2010)
34. Palmer C., Bik E.M., DiGiulio D.B., Relman D.A., Brown P.O.: Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. **5**, e177.doi:10.1371/journal.pbio.0050177 (2007)
35. Pamer E.G.: Immune response to commensal and environmental microbes. *Nat. Rev. Immunol*. **8**, 1173–1178 (2007)
36. Peterson D.A., McNulty N.P., Guruge J.L., Gordon J.I.: IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe*, **2**, 328–339 (2007)
37. Peterson D.A., Frank D.N., Pace N.R., Gordon J.I.: Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe*, **3**, 417–427 (2008)
38. Peterson J., Garges S., Giovanni M., McInnes P., Wang L., Schloss J.A., Bonazzi V., McEwen J.E., Wetterstrand K.A., Deal C., Baker C.C., Di Franesco V., Howcroft T.K., Karp R.W., Lunsford R.D., Wellington C.R., BelachewT., Wright M., Giblin C., David H., Mills M., Salomon R., Mullins C., Akolkar B., Begg L., Davis C., Grandison L., Humble M., Khalsa J., Little A.R., Peavy H., Pontzer C., Portnoy M., Sayre M.H., Starke-Reed P., Zakhari S., Read J., Watson B., Guyer M.: The NIH human microbiome project. *Genome Res*. **19**, 2317–2323 (2009)
39. Rautava S., Walker W.A.: Commensal bacteria and epithelial cross talk in the developing intestine. *Curr. Gastroenterol. Rep*. **9**, 385–392 (2007)
40. Reiff C., Kelly D.: Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *Int. J. Med. Microbiol*. **300**, 25–33 (2010)
41. Relman D.A.: New technologies, human-microbe interaction, and the search for previously unrecognized pathogens. *J. Infect Dis*. **186**, S254–S258 (2002)
42. Round J.L., Lee S.M., Li J., Tran G., Jabri B., Chatila T.A., Mazmanian S.K.: The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human micreobiota. *Science*, **332**, 974–977 (2011)
43. Savage D.C.: Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol*. **31**, 107–133 (1977)
44. 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)
45. Shapiro J.A.: Bacteria are small but not stupid: cognition, natural genetic engineering and socio-bacteriology. *Stud. Hist. Phi los.Biol. Biomed. Sci*. **38**, 807–819 (2007)
46. Stańkowska D., Kaca W.: Systemy komunikacji miedzykomórkowej bakterii Gram-ujemnych i ich znaczenie w ekspresjii cech fenotypowych. *Post. Mikrobiol*. **44**, 99–111 (2005)
47. Tyson G.W., Chapman J., Hugenholtz P., Allen E.E., Ram R.J., Richardson P.M., Solovyev V.V., Rubin E.M., Rokhsar D.S., Banfield J.E.: Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, **428**, 37–43 (2004)
48. Wehkamp J., Salzman N.H., Porter E., Nuding S., Weichenthal M., Petras R.E., Shen B., Schaeffeler E., Schab M., Linzmeier R., Feathers R.W., Chu H., Lima H., Fellermann K., Ganz T., Stange E.F., Bevins C.L.: Reduced Paneth cell α-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 1943–1948 (2005)
49. Woese C.R., Fox G.E.: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 161–177 (1977)
50. Zaura E., Keijser B.J.F., Huse S.H., Crielaard W.: Defining the healthy „core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol*. **9**, 259–271 (2009)
51. Zoetendal E.G., Rajilic-Stojanovic M., de Vos W.M.: High throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*, **57**, 1605–1615 (2008)

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 1, 37–45
http://www.pm.microbiology.pl

CHOROBY SERCA JAKO PÓŹNE POWIKŁANIA ZAKAŻEŃ ODZWIERZĘCYCH PRZENOSZONYCH PRZEZ KLESZCZE

Ilona Mączka[1]*, Stanisława Tylewska-Wierzbanowska[1]

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Samodzielna Pracownia Riketsji Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel./fax: 0-22 542 12 50, stylewska@pzh.gov.pl

Wpłynęło we wrześniu 2011

1. Wstęp. 2. Bartoneloza. 3. Borelioza z Lyme. 4. Gorączka Q. 5. Riketsjoza. 6. Diagnostyka. 7. Leczenie. 8. Podsumowanie

Heart disease as a late complications of zoonosis transmitted by a ticks

Abstract: Many bacterial species can be a cause of various heart diseases. The pathogens that trigger these disorders are very often fastidious, uncultured bacteria, such as: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Coxiella burnetii, Bartonella* spp. and *Rickettsia* spp. The following symptoms: *myocarditis, endocarditis*, *pancarditis*, *perimyocarditis*, dilated cardiomyopathy (DCM), conduction and rhythm disturbances, and atherosclerotic, cardiovascular and valvular disease may indicate a bacterial etiology of the disease. Detection of significant titers of specific antibodies allows to identify the origin of the disease. A research performed recently has shown the presence of *Bartonella* spp., *B. afzeli* and *C. burnetii* bacteria in malfunctioning human hearts. It indicates that these pathogens, occurring in the natural environment in ticks and other wild animals, play a significant role in constation of cardiovascular diseases.

1. Introduction. 2. Bartonellosis. 3. Lyme borreliosis. 4. Q fever. 5. Rickettsial disease. 6. Diagnostics. 7. Treatment. 8. Summary

Słowa kluczowe: *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi, Coxiella burnetii*, choroby serca, *Rickettsia* spp.
Key words: *Batonella* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Coxiella burnetii*, heart disease, *Rickettsia* spp.

1. Wstęp

Badania w ostatnich latach wskazują, że wiele chorób infekcyjnych może prowadzić do chorób serca. Takie objawy jak zapalenie mięśnia sercowego (*myocarditis*), zapalenie wsierdzia (*endocarditis*), zapalenie całego serca (*pancarditis*), kardiomiopatia rozstrzeniowa (DCM), zaburzenia przewodzenia i rytmu mogą wskazać na bakteryjną, grzybiczą lub wirusową etiologię choroby.

Bakterie są najczęstszym czynnikiem etiologicznym infekcyjnego zapalenie wsierdzia (IZW). Według Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (European Society of Cardiology – ESC), IZW to wewnątrznaczyniowe zakażenie obejmujące struktury serca (np. zastawki, wsierdzie przedsionków i komór), duże naczynia krwionośne klatki piersiowej (np. drożny przewód tętniczy, przetoki tętniczo-żylne, zwężoną cieśń aorty) oraz obcy materiał znajdujący się w jamach serca (np. protezy zastawkowe, elektrody rozrusznika serca, operacyjnie wytworzone połączenia naczyniowe). Bakterie wysiane z ogniska zakażenia, krążąc we krwi, z łatwością osadzają się na uszkodzonych lub sztucznych zastawkach. Za główne miejsce adhezji drobnoustrojów chorobotwórczych uważa się jałowe mikroskrzepliny przytwierdzone do uszkodzonego wsierdzia. Różnej wielkości wegetacje zawierające płytki krwi, erytrocyty, fibrynę, komórki zapalne oraz drobnoustroje to typowe zmiany charakterystyczne dla wczesnego IZW. Zastawki serca są najczęstszym obszarem wzrostu wegetacji, ale proces zapalny może rozwijać się również w przegrodzie, na strunach ścięgnistych lub w mięśniu serca [16]. Bakteryjne zapalenie wsierdzia najczęściej obejmuje lewą część serca z zajęciem zastawki mitralnej, aortalnej, trójdzielnej i pnia płucnego [2].

IZW jest jedną z najtrudniejszych do rozpoznania chorób w kardiologii, ponieważ często towarzyszą jej nieswoiste objawy. Stanowi to poważny problem diagnostyczny i terapeutyczny. Bakteryjne zapalenie wsierdzia bez leczenia ma charakter postępujący i prowadzi do śmierci. Zgon spowodowany jest głównie niewydolnością serca wynikającą z nasilenia wcześniej już istniejącej choroby serca lub z powodu ostrego zaburzenia czynności zastawki [2]. Najczęstszymi bakteryjnymi patogenami są: paciorkowce – 60–80% przypadków (*Streptococcus viridans*), gronkowce – 20–30% (*Staphylococcus aureus, S. epidermidis*), enterokoki 5–18% (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*), bakterie Gram-ujemne należące do tak zwanej grupy HACEK – 5% przypadków. HACEK jest to grupa bakterii Gram-ujemnych, będących florą fizjologiczną jamy ustnej, które w niekorzystnych okolicznościach mogą stać się przyczyną infekcyjnego zapalenia wsierdzia. Należą do niej takie bakterie jak: *Haemophilus parainfluenzae*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*,

* Autor korespondencyjny: Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny; ul. Chocimska 24, 02-791 Warszawa; tel. 22 542 12 50; e-mail: ilona.maczka@wp.pl

Cardiobacterium hominis, *Eikenella corrodens* i *Kingella* sp.), pałeczki Gram-ujemne nie należące do grupy HACEK w 5% (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonans* sp., *Klebsiella* spp.) [35].

Przyczyną zapalenia wsierdzia mogą być także bakterie, które stanowią ważną grupę czynników etiologicznych zakażeń dolnych dróg oddechowych. Wspólne cechy tych drobnoustrojów to często epidemiczny charakter zachorowań, małe rozmiary komórki, wewnątrzkomórkowe bytowanie i namnażanie się, brak ściany komórkowej lub pewnych jej składników i co za tym idzie, nieskuteczność leczenia antybiotykami β-laktamowymi. Do tej grupy należą należą chlamydie, mykoplazmy.

Niekiedy za rozwój zapalenia wsierdzia odpowiadają grzyby ok. (2–4%), jak np. *Candida albicans* (> 60% grzybiczych infekcji seca), *Aspergillus* sp. (> 10%), *Histoplasma capsulatum*. Zakażenia grzybicze są znacznie trudniejsze do wykrycia, niż zakażenia wywołane bakteriami. Masywne wegetacje z grzybami prowadzą do zniszczenia płatków zastawek, rzadko dochodzi do zakażenia mięśnia sercowego. *Aspergillus* może wywołać zakażenie mięśnia sercowego częściej niż wsierdzia, co w konsekwencji prowadzi do łącznego zajęcia i wsierdzia i mięśnia sercowego. Umiera ponad 80% dotkniętych grzybiczym zapaleniem wsierdzia (Tabela I).

Zapalenie wsierdzia u ludzi może być spowodowane zakażeniem wieloma gatunkami bakterii, które w standardowym postępowaniu diagnostycznym nie są wykrywane ponieważ nie rosną na sztucznych podłożach bakteriologicznych, ze względu na swoje wymagania odżywcze (tzw. ujemne posiewy krwi) (grupa 7 w tabeli I).

Badania ostatnich lat wykazały, że wiele chorób odzwierzęcych przenoszonych przez kleszcze może prowadzić do powikłań w postaci uszkodzenia zastawek lub mięśnia sercowego. Należą do nich borelioza z Lyme, bartonelozy, gorączka Q. Wymienione choroby należą do grupy tzw. nowo pojawiających się oraz nawracających zagrożeń (emerging/re-emerging diseases) i stanowią jeden z ważniejszych problemów zdrowia publicznego. Wśród nich borelioza z Lyme jest najczęściej występującą na półkuli północnej, chorobą przenoszoną przez kleszcze. Gorączka Q występuje w Polsce od 1956 roku jednak jej późne, przewlekłe postaci nie są rozpoznawane. Bartoneloza diagnozowana jest od kilku lat. Klinicznie rozpoznawana jest głównie choroba kociego pazura wywołana przez *Bartonella henselae,* która jest jednym z gatunków tego rodzaju, odpowiedzialnym za zapalenie wsierdzia i mięśnia sercowego.

Cechą wspólną tych bakterii jest bytowanie i namnażanie się wewnątrzkomórkowe. Ze względu na wewnątrzkomórkowe pasożytnictwo są to drobnoustroje o szczególnych wymaganiach wzrostowych oraz ograniczonej zdolności do proliferacji w tradycyjnych warunkach hodowli laboratoryjnej i w związku z tym wymagających specjalnych narzędzi diagnostycznych.

Patogeny te są odpowiedzialne za zapalenie wsierdzia z ujemnymi posiewami krwi znaczniej częściej niż wcześniej sądzono. Liczba zachorowań wynosi 2,5–31% wszystkich przypadków zapalenia wsierdzia. Organizmy te występują szczególnie często u chorych ze sztucznymi zastawkami, obecnością cewników żylnych, stymulatorami, niewydolnością nerek oraz w stanach upośledzonej odporności [11].

2. Bartoneloza

Ostatnio obserwuje się gwałtowny wzrost liczby nowo odkrytych gatunków rodzaju *Bartonella* i chorób wywoływanych przez te bakterie. Szeroki krąg naturalnych żywicieli oraz powszechne występowanie przenosicieli (wektorów) w środowisku naturalnym sprawiają, że bartoneloza zaliczana jest do tzw. nowopojawiających i nawracających zagrożeń (*re-emerging infectious diseases*) [48].

Bakterie *Bartonella* sp. stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka. *Bartonella henselae* jest odpowiedzialna za największą liczbę przypadków bartoneloz występujących na całym świecie [35]. Bakteria ta jest uznanym czynnikiem etiologicznym CSD (choroby kociego pazura). Rezerwuarem *B. henselae* są koty, zwłaszcza młode. Wektorami bakterii są wszy, pchły i kleszcze [6].

Bartonella quintana była znanym czynnikiem etiologicznym gorączki okopowej. Podczas pierwszej wojny światowej odnotowano około 400 000 zachorowań wśród wojsk Ententy i państw centralnych. W drugiej wojnie światowej epidemia nie osiągnęła tych rozmiarów, ale pojawiła się w wojsku niemieckim na froncie wschodnim. W latach 1940–1945 odnotowano przypadki zakażeń laboratoryjnych *B. quintana* u karmicieli wszy i pracowników w zakładach produkujących szczepionkę przeciw durowi plamistemu (*Rickettsia prowazeki*) wg Weigla w Krakowie i Warszawie. Obecnie *B. quintana* powoduje zakażenia sporadyczne przede wszystkim u ludzi z obniżoną odpornością, z chorobami wyniszczającymi, u osób chorych na AIDS, również u ludzi z wydolnym układem immunologicznym [34].

Bartonella spp. to bakterie wewnątrzkomórkowe, wykazujące tropizm do erytrocytów oraz komórek nabłonka naczyń krwionośnych [48]. *Bartonella* może atakować wiele układów i narządów [6]. W ostatnich latach coraz częściej odnotowuje się przypadki zachorowań ludzi wywołane przez gatunki rodzaju *Bartonella*, które jak dotychczas stwierdzano jedynie u zwierząt. Należy tu wymienić zapalenie wsierdzia powodowane przez *B. elizabethae* oraz zapalenie mięśnia sercowego w wyniku zakażenia *B. vinsonii* subsp. *arupensis* [48]. Wśród bakterii z rodzaju *Bartonella* 8 z 20 poznanych gatunków uznano za zdolne wywołać zapalenie wsierdzia u ludzi. Są to: *B. quintiana*, *B. henselae*, *B. elizabethae*,

Tabela I

Drobnoustroje i choroby serca przez nie wywoływane: infekcyjne zapalenie wsierdzia (*infective endocarditis* IE), zapalenie mięśnia sercowego (*myocarditis*), zapalenie całego serca (*pancarditis*), kardiomiopatia rozstrzeniowa (*dilated cardiomyopathy* DCM), zapalenie osierdzia (*pericarditis*)

Czynniki etiologiczne	Infekcyjne zapalenie wsierdzia (%)	Zapalenie mięśnia sercowego	Zapalenie serca	Kardiomiopatia rozstrzeniowa	Zapalenie osierdzia
1 Paciorkowce:	60–80[24]				
Streptococcus – grupa *Viridans*:	+[51]	+[47]	+[30]		
Streptococcus pneumoniae	+[51]	+[47]			+[24]
Streptococcus pyogenes – Grupa A	+[51]	+[24]	+[31]		
Streptococcus agalactiae – Grupa B	+[51]	+[47]			
Streptococcus bovis – Grupa D	+[51]				
2 Gronkowce:	20–30[24]				
Staphylococcus aureus	+[24]	+[24]	+[38]		
Staphylococcus epidermidis	+[24]				
3 Enterokoki:	5–18[24]				
Enterococcus faecalis	+[24]				
Enterococcus faecium	+[24]				
4 Gram(–) bakterie z grupy HACEK:	5[24]				
Haemophilus spp. (*H.aphrophilus i inne*)	+[51]	+[22]			+[24]
Actinobacillus actinomycetemcomitans	+[51]				
Cardiobacterium hominis	+[51]				
Eikenella corrodens	+[51]				
Kingella Kinga	+[51]				
5 inne pałeczki Gram (–):	5[24]				
Escherichia coli	+[24]	+[12]			
Klebsiella spp.	+[24]	+[20]			
Serratia spp.	+[24]	+[23]			
Proteus spp.	+[24]	+[47]			
Pseudomonas spp.	+[24]	+[47]			
Actinobacter spp.	+[24]				
Salmonella spp.	+[24]	+[24]			+[24]
6 Grzyby:	2–4[24]				
Candida	+[24]	+[24]			+[24]
Aspergillus	+[24]	+[24]	+[45]		+[24]
7 Bakterie o specjalnych wymaganiach wzrostowych:	2,5–31[37]				
Borrelia burgdorferi sl	+[14]	+[24]		+[32]	+[24]
Bartonella spp.	+[51]	+[37]			
Ehrlichia spp.	+[51]	+[37]	+[21]		
Coxiella burnetii	+[24]	+[37]			
Chlamydia psittaci	+[24]	+[24]			+[37]
Chlamydia pneumoniae	+[24]	+[24]		+[32]	+[37]
Chlamydia trachomatis	+[24]				+[37]
Mycobacterium spp.	+[51]				+[24]
Ricketsia spp.		+[24]			+[37]
Mycoplasma	+[24]	+[33]	+[32]	+[37]	+[33]

W tabeli w górnych indeksach podano pozycje cytowanego piśmiennictwa.

B. vinsoni [4], *B. kohlerae, B. clarridgeiae* [18]. Szacuje się, że *Bartonella* spp. odpowiada za 1–15% przypadków infekcyjnego zapalenia wsierdzia u ludzi [13, 17]. Pierwsze przypadki zapalenia wsierdzia spowodowane przez te bakterie odnotowano w roku 1993 u chorych na AIDS w Stanach Zjednoczonych i bezdomnych we Francji (*B. quintana*) [48]. W Polsce DNA *Bartonella* spp. wykryto w sercach dawców narządów [27].

Średni wiek pacjentów z zapaleniem wsierdzia wywołanym przez *Bartonella* spp. to 48 lat. Pacjenci ci są o wiele młodsi od chorych z zapaleniem wsierdzia wywołanym przez inne mikroorganizmy. Mężczyźni stanowią tutaj 85% przypadków, a kobiety 15%. Najczęściej zakażeniu *Bartonella* spp. ulegają zastawki aortalne zaś infekcje sztucznych zastawek odnotowano tylko u 9% pacjentów.

Istnieją dwie grupy zwiększonego ryzyka zachorowania na zapalenie wsierdzia wywołanych przez *Bartonella*. Jedna grupa to bezdomni alkoholicy narażeni na kontakt ze wszami i zakażeni *B. quintana*, bez uprzedniego

uszkodzenia zastawek i druga to zakażeni *B. henselae* chorzy z wcześniejszym uszkodzeniem zastawek, którzy mieli kontakt z kotem. Zapalenie wsierdzia wywołane przez *B. henselae* występuje u 87% pacjentów z wcześniejszym uszkodzeniem zastawek zaś wywołane przez *B. quintana* występuje tylko u 30% tej grupy pacjentów. Czynniki predysponujące do zapalenia wsierdzia wywołane przez *B. quintana* to bezdomność i alkoholizm, a także ekspozycja na kontakt ze wszami [4].

3. Borelioza z Lyme

Borelioza z Lyme jest wieloukładową chorobą zakaźną, wywoływaną przez krętki *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Jest to choroba odzwierzęca przenoszona przez kleszcze rodzaju *Ixodes*. *Lyme carditis* (LC) pierwszy raz opisał S t e e r e i wsp. w 1980 roku. Choroba ta występują u ok. 4–10% zakażonych *Borrelia burgdorferi* w Ameryce Północnej oraz u 0,3–4% w Europie [25]. Różnica w częstości występowania LC między Ameryką Północną a Europą wynika z tego, że w Europie częściej zakażenia wywołane są przez *B. afzelii* i *B. garinii*, które wykazują mniejsze powinowactwo do tkanek serca niż *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, która jest głównym genogatunkiem występującym w Ameryce Północnej [10]. Zróżnicowanie wskaźnika rozpowszechnienia LC wiąże się z geograficznym rozmieszczeniem poszczególnych genogatunków krętka na świecie i z ich różnym tropizmem do określonych narządów. *B. burgdoferi* s.s. wydaje się najbardziej artrogennym i kardiogennym spośród wszystkich krętków w obrębie gatunku *B. burgdorferi* s.l. [25]. Tropizm krętków do określonych tkanek sprawia, że poszczególne genogatunki wywołują choroby o zróżnicowanych objawach. Zapalenie stawów występuje w przebiegu zakażenia wszystkimi trzema genogatunkami, jednak najczęściej stwierdzane jest w przypadku zakażenia *B. burgdorferi* s.s. i jest dominującym objawem w przebiegu boreliozy z Lyme w Ameryce Północnej. Z kolei zakażenia *B. garinii* związane są z zapaleniem opon mózgowych, mózgu i rdzenia kręgowego, które są sporadycznie obserwowane w przebiegu zakażenia *B. burgdorferi* ss. Dla zakażenia krętkiem *B. afzelii* najbardziej typowe jest przewlekłe zanikowe zapalenie skóry [53]. *Lyme carditis* częściej dotyka mężczyzn niż kobiety (stosunek 3:1) [50]. Część badaczy wykazała obecność przeciwciał przeciw *B. burgdorferi* u 32,7% chorych z przewlekłą niewydolnością serca oraz u 11% osób oczekujących na przeszczep serca, co może sugerować możliwy związek przewlekłej infekcji *B. burgdoferi* z rozwojem późnych następstw kardiologicznych [25]. Ostatnio w usuniętych podczas zabiegu transplantacji sercach dawców wykryto DNA *B. burgdorferi* s.l. w zastawkach aortalnych i mitralnych, w mięśniu serca oraz we fragmentach aorty [27].

LC następuje z reguły po kilku tygodniach od zakażenia, w okresie wczesnej infekcji rozsianej, kiedy dochodzi do rozsiewu krętków drogą krwionośną [50]. Objawy *Lyme carditis* ujawniają się od 1 tygodnia do 7 miesięcy (średnio – 21 dni) po wystąpieniu rumienia wędrującego, często współistniejąc z innymi objawami wczesnej boreliozy (utrzymujący się rumień, wtórne ogniska rumienia wędrującego, zapalenie stawów, objawy neurologiczne) [15]. Najczęstszą manifestacją kliniczną LC jest blok przedsionkowo-komorowy o zmiennym stopniu nasilenia [25]. Stwierdzenie EM (w badaniu lub w wywiadach, zwłaszcza typowego: o średnicy większej niż 5 cm, z centralnym przejaśnieniem) u chorego z blokiem przedsionkowo-komorowym jest kluczem do prawidłowego rozpoznania LC [10].

Lyme carditis jest wywołane bezpośrednim zakażeniem przez krętki, co potwierdzono wykazując obecność *B. burgdorferi* w bioptatach mięśnia sercowego [36] oraz w płynie z worka osierdziowego [39]. Przenoszenie bakterii następuje drogą krwionośną i chłonną. Krętki kolonizując tkanki wykształcają nowe struktury, które pomagają w przeżyciu i uniknięciu mechanizmów obronnych gospodarza. Kolonizacja określonych miejsc przez bakterie chorobotwórcze jest związana ze zdolnością rozpoznawania charakterystycznych cząsteczek i ich ugrupowań – miejsc receptorowych na powierzchni tkanek docelowych gospodarza. Na powierzchni krętka są to adhezyny, białka: DbpA, DbpB, Bgp, BBK32, P66 łączące się odpowiednio z receptorami gospodarza takimi jak: dekoryna, glikozaminoglikany, fibronektyna, integryny. Ponieważ krętki *B. burgdorferi* wyposażone są w adhezyny wiążące się z glikozaminoglikanem, to najczęściej łączą się one z tkankami o znacznej zawartości włókien kolagenowych, m.in. w sercu i osierdziu [28].

Zajęcie przez proces chorobowy mięśnia sercowego objawia się niekiedy nietypowymi zmianami w EKG (nieswoiste zmiany zespołu ST-T, wydłużenie odstępu QT, zaburzenia rytmu i przewodzenia), wzrostem stężenia biochemicznych markerów uszkodzenia mięśnia sercowego, uogólnionymi zaburzeniami kurczliwości w badaniu echokardiograficznym i innych badaniach obrazowych (rezonans magnetyczny, scyntygrafia z użyciem galu). Następstwem inwazji krętków może być także łagodne zapalenie mięśnia sercowego i osierdzia (*myocarditis*, *pericarditis*), czasem z wysiękiem do worka osierdziowego. Sporadycznie opisywano również *pancarditis* o niekorzystnym rokowaniu. W pewnym odsetku zachorowań dochodzi do trwałego uszkodzenia mięśnia sercowego i jego niewydolności. Późnym następstwem boreliozowego zapalenia serca może być progresja do kardiomiopatii rozstrzeniowej (*dilated cardiomyopathy*, DCM), najczęściej spotykana na terenie Europy i Azji [25]. Wg niektórych autorów rozwojowi kardiomiopatii może sprzyjać długotrwała obecność krętków w sercu [10].

W odróżnieniu od dobrze udokumentowanej ostrej postaci *Lyme carditis*, możliwość przewlekłego zajęcia serca w przebiegu boreliozy pozostaje dyskusyjna. W roku 1990 Stanek i wsp. wyhodowali krętki *B. burgdorferi* z bioptatu mięśnia sercowego pacjenta z przewlekłą kardiomiopatią rozstrzeniową. Następnie autorzy ci wykazali zwiększoną częstość występowania przeciwciał dla *B. burgdorferi* u chorych z kardiomiopatią rozstrzeniową (26,4%) w porównaniu z pacjentami z chorobą wieńcową (12,4%) i osobami zdrowymi (8,2%). Sugeruje to, że nierozpoznane, przewlekłe zakażenie *B. burgdorferi* może odpowiadać za pewien odsetek przypadków kardiomiopatii. Seinost i wsp. rozpoznali u 11 spośród 46 pacjentów z kardiomiopatią rozstrzeniową pochodzących z obszaru endemicznego (Graz, Austria), boreliozę z Lyme na podstawie badania serologicznego i obecności objawów pozasercowych. W grupie chorych z boreliozą z Lyme zastosowano antybiotykoterapię (ceftriakson), uzyskując spektakularną poprawę. W ciągu 6 miesięcy nastąpiła normalizacja frakcji wyrzutowej lewej komory u 6 pacjentów i jej poprawa u kolejnych 3 chorych, wobec braku poprawy u pozostałych pacjentów, u których stosowano standardowe leczenie kardiologiczne. Wyniki niektórych innych badań nie potwierdziły jednak występowania przewlekłej postaci *Lyme carditis*, co sprawia, że trudno jest oszacować jej rzeczywistą częstość występowania i znaczenie kliniczne [39].

Chorzy, u których kardiologiczna postać boreliozy z Lyme przebiega łagodnie nie zgłaszają żadnych dolegliwości [52]. Szacuje się, że w około 50% przypadków zachorowań na LC przebieg jest bezobjawowy, widoczna jest skłonność do samoograniczania procesu chorobowego, a całkowite ustąpienie zmian w sercu uzyskuje się u ponad 90% chorych [25].

4. Gorączka Q

Gorączka Q to odzwierzęca choroba zakaźna wywołana przez bakterie *Coxiella burnetii*. Rezerwuarem *C. burnetii* w środowisku naturalnym są głównie małe gryzonie i kleszcze [41]. Poza tym rezerwuar *C. burnetii* stanowią zwierzęta hodowlane takie jak bydło, kozy i owce. Zwierzęta domowe, tj psy i koty są przyczyną miejskich ognisk gorączki Q [4]. Zwierzęta przechodzą zakażenie zwykle bezobjawowo wydalając bakterie w moczu, kale, mleku. Człowiek zakaża się od zwierząt głównie drogą wziewną. Osoby narażone na zakażenie i zachorowania to wszyscy, którzy mają bezpośredni kontakt z zakażonymi zwierzętami lub ich produktami. Do grupy zwiększonego ryzyka zachorowania należą: hodowcy bydła, owczarze, służby weterynaryjne, pracownicy rzeźni, garbarni itp. [41].

C. burnetii jest odpowiedzialna za zapalenia wsierdzia równie często jak wszystkie bakterie z grupy HACEK. U 60–70% osób z przewlekłym zakażeniem *C. burnetii* dochodzi do rozwoju zapalenia wsierdzia i stanowi to około 3–5% wszystkich przypadków zapaleń wsierdzia [15]. Zakażenie występuje w zdecydowanej większości u chorych z wadami zastawkowymi serca i znacznie częściej dotyczy mężczyzn [46].

Ostra postać gorączki Q charakteryzuje się objawami grypopodobnymi, wysoką gorączka trwającą nawet trzy tygodnie, towarzyszą jej dreszcze, osłabienie i bóle mięśni. Inne kliniczne objawy to zapalenie płuc, zapalenie wątroby, zapalenie osierdzia, zapalenie mięśnia sercowego i zapalenie opon mózgowych. Po miesiącu, a nawet po latach od ostrej postaci gorączki Q, u około 1% zakażonych pacjentów może rozwinąć się przewlekła postać choroby. Przewlekła gorączka Q zwykle dotyka pacjentów, u których w historii choroby występują uszkodzenia zastawek serca, tętniak naczyniowy, immunosupresja lub przewlekła niewydolność nerek. Najczęstszą manifestacją kliniczną przewlekłej choroby jest zapalenie wsierdzia (z ujemnymi posiewami krwi).

Poziom odporności odgrywa kluczową rolę w klinicznej manifestacji gorączki Q [4]. U pacjentów o obniżonej odporności (grupę ryzyka stanowią m.in. osoby po przeszczepach, z nowotworem, przewlekłą chorobą nerek, kobiety ciężarne) stwierdza się *endocarditis*. Czasami choroba przechodzi w formę przewlekłą prowadząc do uszkodzenia mięśnia sercowego, a także stanów zapalnych w obrębie układu nerwowego w postaci zapalenia opon mózgowych i mózgu [26]. U ok. 67% pacjentów temperatura ciała powyżej 37°C i ostra niewydolność serca to najczęstsze objawy zapalenia wsierdzia związanego z przewlekłą gorączką Q [4]. Pierwotna gorączka Q przebiegająca zarówno w postaci ostrej jak i bezobjawowej może przejść w zakażenie przewlekłe, prowadząc do zapalenia wsierdzia i uszkodzenia zastawek [41]. U 1–5% pacjentów z ostrą gorączką Q i u 60–80% pacjentów z przewlekłą gorączką Q rozwija się zapalenia wsierdzia. Względne ryzyko zachorowania na zapalenie wsierdzia w wyniku powikłań gorączki Q jest pięć razy wyższe u pacjentów w wieku 60 – do 69 lat, natomiast u pacjentów poniżej 40 roku życia ryzyko to jest niewielkie. Większość chorych z zapaleniem wsierdzia wywołanym przez *C. burnetii* (88,5%) ma wcześniej uszkodzone zastawki [4]. Śmiertelność wśród chorych z zapaleniem wsierdzia i uszkodzeniem zastawek o tej etiologii dochodzi do prawie 40% [41]. Zastawki aortalne i mitralne są w porównywalnym stopniu infekowane przez *C. burnetii*, jednak zapalenie zastawki trójdzielnej zostało tylko raz zgłoszone u dziecka z wrodzoną przetoką. 55,7% pacjentów z *endocarditis* posiada sztuczne zastawki serca [4]. Badając usunięte serca stwierdzono zakażenia mieszane. W jednym przypadku DNA charakterystyczne dla *Bartonella* spp. wykryto w zastawce aortalnej, a DNA *C. burnetii* w mięśniu sercowym. W drugim przypadku DNA

charakterystyczne dla *Bartonella* spp. stwierdzono w zastawce mitralnej, a DNA *C. burnetii* wykryto w mięśniu sercowym i zastawce aortalnej [27].

Zapalenie mięśnia sercowego wywołane zakażeniem *C. burnetii* występuje rzadko; interesujący jest jednak fakt, że zapalenie to może dotknąć ludzi w każdej grupie wiekowej. Śmiertelność w tym przypadku wynosi ponad 16%. Na zapalenie mięśnia sercowego wywołanego *C. burnetii* częściej umierają młodzi pacjenci, niż osoby, u których brak jest powikłań kardiologicznych spowodowanych gorączką Q. Cecha ta stała się szczególnie ważna, odkąd zapalenie mięśnia sercowego uznano za nagłą przyczynę śmierci młodych pacjentów. Ponadto zapalenie mięśnia sercowego histopatologicznie stwierdzono w 10–20% przypadków kardiomiopatii rozstrzeniowej. Badania te sugerują, że zaangażowanie chorób serca w ostrej gorączce Q może być bardziej powszechne niż wcześniej przewidywano i może stanowić wyjaśnienie zgonów osób młodych, bez wcześniej znanych objawów kardiologicznych [46].

5. Riketsjoza

Bakterie należące do rodzaju *Rickettsia* wywołują ostre choroby gorączkowe. Riketsjozy obejmują grupę gorączek plamistych, a także grupę durów wysypkowych [6]. Bakterie te występują u ssaków i przenoszone są przez wektor – owady (np. pchły, wszy) i pajęczaki (np. kleszcze) [1]. Rozmnażają się wyłącznie wewnątrzkomórkowo [49]. Zakażenie człowieka przez *Rickettsia prowazeki* następuje w trakcie drapania skóry, rozcierania ciał wszy oraz ich odchodów na uszkodzonej skórze lub też w trakcie ssania krwi przez wszy.

Dur szczurzy wywoływany przez *Rickettsia mooseri*, ma charakter endemiczny. Zachorowania zdarzają się na terenach o niskim poziomie sanitarnym jak na przykład w obozach dla uchodźców, a także w miastach portowych ze względu na duże populacje naturalnych rezerwuarów bakterii: szczurów i myszy. Riketsjozę tę przenoszą na człowieka pchły i wszy [6]. Wrota zakażenia przy riketsjozach stanowią drogi oddechowe lub powłoki skórne. Główna lokalizacja riketsji w organizmie gospodarza to komórki drobnych naczyń włosowatych. Tam riketsje namnażają się, wywołując zarazem efekt cytotoksyczny, co w ostateczności prowadzi do zniszczenia komórek śródbłonka. Tworzą się rozsiane wielonarządowe zmiany w drobnych naczyniach m.in. skóry, płuc, serca, nerek, mózgu. W związku z uszkodzeniem śródbłonka naczyń dochodzi do martwicy ogniskowej, tworzenia się nacieków wokół tych naczyń oraz do zwolnienia przepływu krwi w naczyniach włosowatych. Następstwem tego jest przechodzenie osocza przez ściany naczyń i tworzenie się obrzęków okołonaczyniowych. Niedokrwienie i niedotlenienie prowadzą do uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, nerek, nadnerczy, mięśnia sercowego oraz innych narządów i układów [9].

Rickettsia helvetica po raz pierwszy została wyizolowana w Szwajcarii z kleszcza *Ixodes ricinus*. Bakteria ta wówczas została uznana za niepatogenną wśród grupy gorączek plamistych. Ostatnie badania wskazują, że *R. helvetica* prawdopodobnie związana jest z *perimyocarditis*, tj. jednoczesnym ostrym zapaleniem osierdzia i mięśnia sercowego. Jest to mało poznana choroba, której towarzyszy gorączka. Choroba ta spotykana jest u ludzi w Europie. Rola *R. helvetica* w związku z wadą zastawek aorty jest jednak kontrowersyjna. W Szwajcarii, u osób poddanych operacji serca przeprowadzono badania wykazujące związek *R. helvetica* z wadami zastawek. Cienkie skrawki tkanek ze zwężonego odcinka aorty oraz z zastawki mitralnej poddano ekstrakcji DNA. Następnie wyizolowane DNA identyfikowano metodą Real-Time PCR w celu identyfikacji *R. helvetica, R. slovaca* i *B. burgdorferi*. DNA *R. helvetica* wykryto w zwężeniach zastawek serca. Nie wykryto natomiast *R. slovaca* i *B. burgdorferi*. Wyniki te dostarczają molekularnych dowodów na obecność *R. helvetica* w zwężeniu zastawek serca [8].

W 1999 roku w Szwecji stwierdzono przypadki zapalenia osierdzia, których przyczyną była *R. helvetica*. Etiologia została ustalona na podstawie badań serologicznych, molekularnych, a także badań w mikroskopie elektronowym [6].

Riketsje bardzo rzadko są przyczyną zapalenia wsierdzia.

Badania kleszczy na terenie Polski wskazują, że *R. helvetica* występuje w północnych oraz centralnych rejonach kraju. Brak jest jednak doniesień o zachorowaniach wywołanych przez te bakterie w Polsce. Obecność przeciwciał dla tych riketsji u ludzi wskazuje na wystąpienie u nich zakażeń i możliwość zachorowań [42].

6. Diagnostyka

Postęp w biologii molekularnej przyczynił się do poprawy diagnostyki słabo rosnących bakterii. Za pomocą testów serologicznych wykorzystujących immunofluorescencję pośrednią lub metodą immunoenzymatyczną (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) można zidentyfikować gatunki *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii*, *Borrelia burgdorferi* s.l. i *Rickettsia* spp. Tkanki zastawek, aorty, mięśnia sercowego można wykorzystać do badań molekularnych (PCR, sekwencjonowanie) w celu wykrycia drobnoustrojów niepoddających się hodowli lub o szczególnych wymaganiach wzrostowych i nierosnących na sztucznych podłożach bakteryjnych.

Podstawową metodą diagnostyczną zapalenia wsierdzia powodowanego przez *Bartonella* jest wykrywanie

swoistych przeciwciał techniką immunofluorescencji pośredniej. Posiewy krwi w przypadku zapalenia wsierdzia wywołanego przez *Bartonella* zwykle są ujemne. Utrudnia to prawidłową diagnozę i powoduje częstsze interwencje chirurgiczne oraz wyższą śmiertelność pacjentów w stosunku do przypadków zapalenia wsierdzia o innej etiologii. Najbardziej wiarygodnym badaniem diagnostycznym oprócz metody serologicznej jest PCR ze świeżo usuniętych zastawek. Metodą tą stwierdza się zakażenia *Bartonella* sp. nawet u pacjentów w czasie antybiotykoterapii [4]. Techniki biologii molekularnej pozwalają również na genotypowanie, identyfikację gatunków i analizę filogenetyczną w obrębie rodzaju *Bartonella* spp. Przy tych metodach stosuje się markery genetyczne mające zastosowanie w diagnostyce i badaniach epidemiologicznych. Jednym z najczęściej stosowanych markerów jest syntaza cytrynianowa GltA. Posiada ona wysoki poziom zmienności, co pozwala wykryć różnice pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami *Bartonella* [48].

Laboratoryjnym potwierdzeniem *Lyme carditis* jest izolacja krętków z tkanek lub płynów ustrojowych. Wykorzystuje się w tym celu łańcuchową reakcję polimerazy umożliwiającą wielokrotne powielanie określonych, charakterystycznych dla danego drobnoustroju fragmentów genomu. Startery użyte do reakcji muszą umożliwiać amplifikację fragmentów DNA charakterystycznych dla wszystkich chorobotwórczych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. U *B. burgdorferi* s.l. najczęściej wykrywane są sekwencje genów kodujących flagellinę, białka błony zewnętrznej (OspA), 16S-RNA i 5S-23S-RNA. Materiał genetyczny krętków częściej można wykryć w ostrej fazie choroby, niż w jej okresie przewlekłym [44].

Do prawidłowego wykrycia swoistych przeciwciał IgM lub IgG w surowicy zaleca się dwustopniową diagnostykę serologiczną. Polega ona na oznaczaniu w pierwszym etapie poziomu przeciwciał półilościowymi testami serologicznymi o wysokiej czułości (np. ELISA). W drugim etapie próbki surowic, z którymi uzyskano wynik dodatni lub wątpliwie dodatni poddaje się jakościowemu badaniu metodą Western-blot, które dzięki wysokiej swoistości pozwala zweryfikować wcześniejsze wyniki [44].

U chorych należy wykluczyć kiłę i inne choroby, w przebiegu których mogą wystąpić wyniki fałszywie dodatnie [40].

Lipopolisacharyd *C. burnetii* wykazuje zmienność antygenową i drobnoustrój może występować w dwóch fazach [46]. Metoda immunofluorescencji pośredniej z antygenami *C. burnetii* fazy I i II, pozwala na rozpoznanie i jednoczesne różnicowanie ostrej i przewlekłej gorączki Q. Przeciwciała fazy II pojawiają się we wczesnej, ostrej fazie choroby. Wykrycie przeciwciał fazy I, szczególnie IgA, ma ogromne znaczenie w diagnozowaniu przewlekłej gorączki Q i zapalenia wsierdzia wywołanego tym zakażeniem. Pojawienie się przeciwciał IgA fazy I wyprzedza wystąpienie objawów klinicznych zapalenia wsierdzia [41]. DNA *C. burnetii* można wykryć metodą PCR z wycinków serc (mikrobiopsje).

Jako że objawy riketsjoz są mało charakterystyczne ich precyzyjne rozpoznanie możliwe jest jedynie na podstawie badań laboratoryjnych. Wykrycie zachorowań w Polsce zależy od świadomości klinicysty i wykonania badań laboratoryjnych. W przypadku wszystkich riketsjoz są to badania serologiczne i dodatkowo badania molekularne – metodą PCR m.in. z pobranych wycinków skóry, ze strupów czy z krwi.

7. Leczenie

Przy zakażeniach serca o etiologii bakteryjnej, w zależności od rodzaju patogenu i jego wrażliwości, lekami z wyboru są różne grupy antybiotyków. Nieskuteczność leczenia i rozwój ciężkiej niewydolności serca prowadzą do konieczności przeszczepienia serca.

Leczenie bartoneloz zależne jest od postaci choroby jak i stanu układu odpornościowego chorych i polega najczęściej na połączeniu dwóch lub trzech antybiotyków. Kiedyś w zapaleniu wsierdzia w przebiegu bartonelozy skuteczną terapią było podawanie aminoglikozydów nie krócej niż przez 14 dni, co zapobiegało nawrotom jak i zmniejszało śmiertelność. W przypadkach braku odpowiedzi na leczenie nafcyliną i gentamycyną, gdy konieczna była wymiana zastawek serca, po zabiegu z powodzeniem stosowano wankomycynę z imipenemem. Obecnie w przypadkach niepotwierdzonych izolacją *Bartonella* sp., zaleca się stosowanie gentamycyny (i.v. 3 mg/kg/dzień przez 14 dni) połączonej z ceftriaksonem (1 × 2 g i.v. przez 6 tygodni) z możliwością uzupełnienia tej terapii o doksycyklinę (2 × 100 mg przez 6 tygodni). W przypadkach wyhodowania tego drobnoustroju stosuje się gentamycynę z doksycykliną w ww. schemacie [7].

U chorych z boreliozą serca, u których są objawy ze strony układu krążenia w postaci zaburzeń przewodnictwa z występowaniem bloków przedsionkowo-komorowych I stopnia, leczenie przyczynowe obejmuje stosowanie antybiotykoterapii doustnej jak w fazie rumienia wędrującego [43]. Jeżeli występuje blok przedsionkowo-komorowy wyższego stopnia niż I, lekami pierwszego rzutu są ceftriakson i penicylina G podawane dożylnie. Antybiotykoterapia trwa minimum 21 dni [52]. Rokowanie we właściwie leczonym LC jest dobre.

Przewlekła gorączka Q pod postacią zapalenia mięśnia sercowego wymaga długiego leczenia tetracyklinami (miesiące i lata) i jest jedną z najdłużej trwających antybiotykoterapii w chorobach bakteryjnych. Nierzadko kończy się ona niepowodzeniem lub nawrotami.

W niektórych przypadkach choroby konieczna jest operacyjna wymiana zastawek serca [5].

Leczenie skojarzone obejmujące linkomycynę z tetracykliną, ko-trymoksazol z tetracykliną lub ryfampicynę z tetracykliną nie daje spodziewanych efektów i mimo stosowania ich przez kilka lat z zastawek izolowano szczepy *C. burnetii*. Dobre efekty lecznicze uzyskano stosując połączenie doksycykliny z ofloksacyną. Śmiertelność spadła do około 5% przy nadal jednak dużym odsetku nawrotów (64%). Odsetek nawrotów spadł do 14% po stosowaniu przez 18 miesięcy doksycykliny (2 × 100 mg) z chlorochiną (3 × 200 mg). Schemat ten jest obecnie obowiązujący w leczeniu przewlekłej gorączki Q, również ze względu na zmniejszenie czasu trwania terapii u wielu pacjentów [19]. W przypadkach przeciwskazań dla chlorochiny podaje się doksycyklinę (2 × 100 mg) z ofloksacyną (3 × 200 mg) przez co najmniej 3 lata [7].

W leczeniu riketsjoz lekami z wyboru są doksycyklina (2 × 100 mg), tetracyklina (4 × 500 mg) lub chloramfenikol (4 × 500 mg) podawane przez 10–14 dni, chociaż chloramfenikol ze względu na swoje toksyczne działanie nie jest obecnie zalecany. W leczeniu gorączki śródziemnomorskiej czas trwania kuracji może być różny, od jednorazowego podania do 10 dni. Nie stwierdza się różnic w normalizacji gorączki po jednorazowym podaniu 200 mg doksycykliny w porównaniu z pełną kuracją tym antybiotykiem. Podobną skuteczność wykazuje ciprofloksacyna (2 × 750 mg). Dłuższy okres gorączkowy, średnio o jeden dzień, stwierdza się stosując tetracykliny oraz ofloksacynę (2 × 500 mg). U dzieci oraz kobiet w ciąży dobre efekty daje kuracja josamycyną (100 mg/kg/dzień) [7].

8. Podsumowanie

Kleszcze to pajęczaki należące do podgromady roztocze, które są pasożytami wszystkich kręgowców (także ludzi). Są rozpowszechnione na całym świecie. Rosnąca świadomość specjalistów dotycząca chorób jakie mogą przenosić kleszcze prowadzi do coraz liczniejszych doniesień o nowopojawiających się chorobach bakteryjnych. Od czasu identyfikacji krętków *B. burgdorferi* jako czynnika wywołującego boreliozę z Lyme w 1982 roku, w Europie zostało opisanych 11 odkleszczowych ludzkich patogenów bakteryjnych. Diagnostyka chorób przenoszonych przez kleszcze jest często trudna i odbywa się w specjalistycznych laboratoriach. Interpretacja wyników badań laboratoryjnych jest bardzo ważna przy ustalaniu diagnozy. Wytyczne te mają na celu pomóc lekarzom (w tym kardiologom) i mikrobiologom w diagnozowaniu zakażeń przenoszonych przez kleszcze i dostarczenie informacji w celu lepszego zrozumienia chorób zakaźnych [3].

Ponieważ zakażenia przenoszone przez kleszcze mogą być przyczyną poważnych chorób serca, diagnostyka przenoszonych przez kleszcze zakażeń takimi bakteriami jak *Bartonella* spp., *Borrelia* s.l., *C. burnetii* i *Rickettsia* spp. powinna być przeprowadzona w każdym przypadku infekcyjnego zapalenia wsierdzia z ujemnym posiewem krwi.

Piśmiennictwo

1. Azad A.F., Beard C.B.: Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg. Infect. Dis.* **4**, 179–186 (1998)
2. Berkow R.: Bakteryjne zapalenie wsierdzia. W: MSD MANUAL. Podręcznik diagnostyki i terapii. Red.: Berkow R. Urban&Partner, Wrocław 1995, str. 628–633
3. Broqui P., B. Wilske i wsp.: Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial disease in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 1108–1132 (2004) (wyżej cytowana praca jest dziełem 25 autorów)
4. Brouqui P., Raoult D.: Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 177–207 (2001)
5. Chmielewski T. Stare i nowe riketsjozy. *Post. Mikrobiol.* **45**, 23–25 (2006)
6. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: Nowe riketsjozy w Europie. *Post. Mikrobiol.* **47**, 307–311 (2008)
7. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: Riketsjozy i ich leczenie. *Nowa Klinika*, **11**, 753–755 (2004)
8. Dobec, Marinko, Wermelinger, Tobias, Kaeppeli, Franz, Sievers.: Molecular evidence of *Rickettsia helvetica* in stenotic heart valves in Switzerland. *Swiss Medical Weekly*, (2010) (in press)
9. Dziubek Z.: Riketsjozy. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze. Red: Dziubek Z. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2003, 190–192
10. Elikowski W., Małek M., Flieger J., Baszko A., Fagiewicz A., Wróblewski D.: Całkowity blok przedsionkowo komorowy a borelioza z Lyme: opis dwóch różnych przypadków i przegląd piśmiennictwa. *Kardiol. Pol.* **65**, 565–570 (2007)
11. Fournier P.E., D. Raoult i wsp.: Comprehensive diagnostic strategy for blood culture-negative endocarditis: a prospective study of 819 new cases *Clin. Infect. Dis.* **51**, 131–40 (2010) (wyżej cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
12. Gentile G., Meles E., Carbone C., Gantú E., Maggiolini S.: Unusual case of myocardial injury induced by *Escherichia coli* sepsis. *Monaldi. Arch. Chest. Dis.* **74**, 40–43 (2010)
13. Gouriet F., Lepidi H., Habib G., Collart F., Raoult D.: From cat scratch disease to endocarditis, the possible natural history of *Bartonella henselae* infection. *BMC Infect. Dis.* **7**, 30 (2007)
14. Grijalva M., Horváth R., Dendis M., Erný J., Benedík J.: Molecular diagnosis of culture negative infective endocarditis: clinical validation in a group of surgically treated patients. *Heart*, **89**, 263–268 (2003)
15. Hartzell J.D., Wood-Morris R.N., Martinez L.J., Trotta R.F.: Q fever: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin. Proc.* **83**, 574–579 (2008)
16. Horstkotte D., P. Vardas i wsp.: Guidelines on prevention, diagnosis and treatment of infective endocarditis executive summary; the task force on infective endocarditis of the European society of cardiology. *Eur. Heart. J.* **25**, 267–276 (2004) (wyżej cytowana praca jest dziełem 31 autorów)
17. Houpikian P., Raoult D.: Western immunoblotting for *Bartonella* endocarditis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 95–102 (2003)
18. Lamas C., Curi A., Bóia M., Lemos E.: Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis

on data from Brazil – a review. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **103**, 221–235 (2008)
19. Lecaillet A., Mallet M.N., Raoult D., Rolain J.M.: Therapeutic impact of the correlation of doxycycline serum concentrations and the decline of phase I antibodies in Q fever endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother*. **63**, 771–774 (2009)
20. Jagadish J.S., Mankani H.L., Shadaksharappa B.K., Donkari V.S.: Acute myocarditis in association with Klebsiella pneumonia. *J. Assoc. Physicians. India*, **35**, 652–654 (1987)
21. Jahangir A., Kolbert C., Edwards W., Mitchell P., Dumler J.S., Persing D.H..: Fatal pancarditis associated with human granulocytic Ehrlichiosis in a 44-year-old man. *Clin. Infect. Dis*. **27**, 1424–1427 (1998)
22. Schultz J.C., Hilliard A.A., Cooper L.T., Rihal C.S.: Diagnosis and treatment of viral myocarditis. *Mayo. Clin. Proc.* **84**, 1001–1009 (2009)
23. Johnson J.S., Croall J., Power J.S., Armstrong G.R.: Fatal *Serratia marcescens* meningitis and myocarditis in a patient with an indwelling urinary catheter. *J. Clin. Pathol*. **51**, 789–790 (1998)
24. Fowler V.G., Scheld W.M., Bayer A.S.: Endocarditis and intravascular infections. W: Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Red.: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. Elselvier Churchill Livingstone, 2005, str. 975–993
25. Maroszyńska-Dmoch E.: Borelioza z Lyme – niedoceniany problem w praktyce kardiologa. *Folia Cardiologica Excerpta,* **3**, 375–382 (2008)
26. Maurin M., Raoult D.: Q fever. *Clin. Microbiol. Rev*. **12**, 518–553 (1999)
27. Mączka I. Chmielewski T., Walczak E., Rozanski J., Religa G., Tylewska-Wierzbanowska S.: Tick-borne infections as a cause of heart transplantation. *Pol. J. Microbiol.* (in press)
28. Mączka I., Tylewska-Wierzbanowska S.: Cykl krążenia krętków *Borrelia burgdorferi* w środowisku. *Post. Mikrobiol.* **49**, 25–32 (2010)
29. Melmed S., Katz D., Bank H.: Streptococcal pancarditis. *Chest.* **69**, 108–110 (1976)
30. Nagi K.S., Joshi R., Thakur R.K.: Cardiac manifestations of Lyme disease: a review. *Can. J. Cardiol.* **12**, 503–506 (1996)
31. Ozkaya G., Shorbagi A., Ulger Z., Saglam A., Aybar M., Sardan Y.C., Uzun O.: Invasive group A streptococcal infection with pancarditis caused by a new emm-type 12 allele of Streptococcus pyogenes. *J. Infect*. **53**, 1–4 (2006)
32. Pankuweit S., Richter A., Ruppert V., Maisch B.: Familial predisposition and microbial etiology in dilated cardiomyopathy. *Herz,* **34**, 110–116 (2009)
33. Paz A., Potasman I.: Mycoplasma-associated carditis. Case reports and review. *Cardiol.* **97**, 83–88 (2002)
34. Podsiadły E., Sokołowska E., Tylewska-Wierzbanowska S.: Występowanie zakażeń *Bartonella henselae* i *Bartonella quintana* w Polsce w latach 1998–2001. *Przegl. Epidemiol.* **56**, 399–407 (2002)
35. Podsiadły E., Tylewska-Wierzbanowska S.: Występowanie *Bartonella* spp. w wybranych rezerwuarach i wektorach na terenie Polski. *Post. Mikrobiol*. **47**, 275–281 (2008)
36. Rostoff P., Gajos G., Konduracka E., Gackowski A., Nessler J., Piwowarska W.: Lyme carditis: epidemiology, pathophysiology, and clinical features in endemic areas. *Int. J. Cardiol.* **144**, 328–333 (2010)
37. Shah S.S., McGowan J.P.: Rickettsial, ehrlichial and Bartonella infections of the myocardium and pericardium. *Front. Biosci*. **8**, 197–201 (2003)
38. Schnoering H., Sachweh J.S., Muehler E.G., Vazquez-Jimenez J.F.: Pancarditis in a five-year-old boy affecting tricuspid valve and ventricular septum. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **34**, 1115–1117 (2008)
39. Stanek G., Klein J., Bittner R., Glogar D.: Borrelia burgdorferi as an etiologic agent in chronic heart failure? *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* **77**, 85–87 (1991)
40. Stanek G., Strle F.: Lyme boreliosis. *Lancet*, **9396**, 1639–1647 (2003)
41. Tylewska-Wierzbanowska S.: Gorączka Q. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka. Red.: Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A. α-medica press, Bielsko-Biała 2007, str. 120–123
42. Tylewska-Wierzbanowska S.: Nowe riketsjozy występujące w Europie. *Medycyna Zakażeń,* **17**, 337–339 (2010)
43. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T.: Borelioza z Lyme – rozpoznanie kliniczne i laboratoryjne. *Medycyna Zakażeń*, **15**, 565–570 (2008)
44. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T.: Diagnostyka serologiczna boreliozy z Lyme – wytyczne europejskie. *Post. Mikrobiol*. **44**, 289–293 (2005)
45. Vaideeswar P.: Aspergillus pancarditis manifesting as hospital-acquired infection: report of two cases and review of literature. *Cardiovasc. Pathol*. **19**, 253–257 (2010)
46. Vogiatzis I., Dimoglou G., Sachpekidis V.: Q fever myocarditis. *Hippokratia,* **12**, 46–49 (2008)
47. Wasi F., Shuter J.: Primary bacterial infection of the myocardium. *Front. Biosci*. **8**, 228–231 (2003)
48. Welc-Falęciak R.: Współczesna wiedza o zakażeniach wywoływanych przez pałeczki *Bartonella*. *Przegl. Epidemiol.* **63**, 11–17 (2009)
49. Woyciechowska S., Frygin C.: Riketsje. Państwowe Wyd. Rolnicze i Leśne, Warszawa 1979
50. Xanthos T., Lelovas P., Kantsos H., Dontas I., Perrea D., Kouskouni E.: Lyme carditis: complete atrioventricular dissociation with need for temporary pacing *Hellenic. J. Cardiol.* **47**, 313–316 (2006)
51. Zaremba M.L., Borowski J.: Infekcyjne zapalenie wsierdzia. W: Mikrobiologia lekarska. Red.: Plewa A. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 1997, str. 753–756
52. Zientara M., Martirosian G.: Borelioza z Lyme – choroba dzieci i ludzi dorosłych. *Medycyna Zakażeń*, **17**, 347–350 (2010)
53. Zyner W.: Borelioza u psów. *Życie Weterynaryjne*, **83**, (2008)

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 1, 47–53
http://www.pm.microbiology.pl

ZAKAŻENIA *BARTONELLA* SPP. ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM CHORÓB OCZU

Beata Fiecek[1]*, Tomasz Chmielewski[1], Stanisława Tylewska-Wierzbanowska[1]

[1] Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – PZH, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w sierpniu 2011

1. Wstęp. 2. *Bartonella* sp. – wewnątrzkomórkowy patogen. 3. Chorobotwórczość bakterii *Bartonella* sp. dla zwierząt. 4. Chorobotwórczość *Bartonella* sp. dla ludzi. 4.1. *Bartonella henselae* – patogen wywołujący choroby oczu. 5. Podsumowanie

Bartonella sp. infections with particular emphasis on eye diseases

Abstract: Bartonellosis is a zoonosis caused by bacteria of the genus *Bartonella* which are transmitted by vectors such as fleas, lice and ticks. It causes mainly cat scratch disease (CSD), but also endocarditis, meningitis, peliosis hepatitis, bacillary angiomatosis and pneumonia. It has been established that about 5–25% of infections caused by *Bartonella* spp. may have a form of inflammatory process within the eyeball. These diseases include optic neuritis, anterior uveitis, focal retinal vasculitis or focal choroiditis, lesions in the optic disc region, inflammation of the vitreous and the branch retinal arteriolar or venular occlusions. Ophthalmic bartonellosis should be particularly suspected in patients who have contact with a cat and develop a sudden fever with loss of vision.

1. Introduction. 2. *Bartonella* sp. intracellular pathogen. 3. Pathogenicity of *Bartonella* sp. in animals. 4. Pathogenicity *Bartonella* sp. in people. 4.1. *Bartonella henselae* a pathogen causing eye diseases. 5. Summary

Słowa kluczowe: *Bartonella* sp., choroby oczu, zapalenie nerwu wzrokowego
Key words: *Bartonella* sp., eye diseases, optic neuritis

1. Wstęp

Bartoneloza jest chorobą odzwierzęcą (zoonoza) wywoływaną przez bakterie z rodzaju *Bartonella* spp. należące do rzędu *Rickettsiales*. Chorują na nią ludzie na całym świecie, a zakażeniu ulegają przede wszystkim osoby z osłabionym układem immunologicznym z powodu przewlekłych chorób wyniszczających, otrzymujący leki immunosupresyjne (biorcy przeszczepów), zakażeni HCV lub HIV. Obecnie znane są 24 gatunki rodzaju *Bartonella.* Wśród nich, choroby u ludzi wywołują: *B. bacilliformis, B. quintana, B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffi*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. grahamii B. koehlerae*, *B. washoensis*, *B. alsatica*, *B. clarridgeiae B. rochalimae*, *B. tamiae* [26, 48]. Bakterie te są małymi, tlenowymi, pleomorficznymi, Gram-ujemnymi pałeczkami, bytującymi wewnątrzkomórkowo. Powodują one zapalenie wsierdzia, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, naczyniakowatość, zapalenie płuc, plamicę wątrobową, chorobę kociego pazura, zapalenie gałki ocznej [47]. Infekcja wywołana przez te bakterie może mieć przebieg ostry lub przewlekły i zwykle wymaga podania antybiotyków, a w niektórych przypadkach także interwencji chirurgicznej. W diagnostyce stosuje się badania serologiczne wykrywające w surowicy krwi swoiste przeciwciała klasy IgM i IgG, przeciw antygenom określonych gatunków *Bartonella* sp. Do identyfikacji zakażenia pobierany może być także wycinek powiększonego węzła chłonnego, w którym jest oznaczane DNA *Bartonella* sp. metodą PCR (najczęściej wykrywany jest gen syntazy cytrynianowej – *gltA*) i/lub histopatologicznie [12].

2. *Bartonella* spp. – wewnątrzkomórkowy patogen

Bartoneloza jest chorobą, która dotyczy ludzi mających kontakt z domowymi oraz dzikimi zwierzętami, będącymi rezerwuarem tego patogenu. Obecnie wiadomo, że rezerwuarem tych drobnoustrojów w zależności od gatunku *Bartonella* mogą być: sarny, wiewiórki ziemne, kangury, kojoty, króliki, krety, psy oraz koty (Tabela I). Bakterie te są przenoszone przez pchły, wszy i kleszcze, które żywią się krwią zakażonych ssaków i wykazują ścisłą preferencję dotyczącą zarówno przenoszonego gatunku bakterii jak i rezerwuaru. Wektorem *B. henselae* i *B. clarridgeiae* są przede wszystkim pchły kocie. Kontakt z ich odchodami powoduje przeniesienie drobnoustroju zarówno na inne zwierzęta jak i człowieka i zakażenie przez uszkodzoną skórę. Wykazano także, że ich wektorem są kleszcze z rodzaju *Ixodes*. Wszystkie stadia rozwojowe kleszcza mają zdolność przenoszenia zakażenia. Świadczy to o transtadialnym przekazie tego zakażenia, natomiast prawdopodobnie nie przekazują go następnym pokoleniom (transowarialnie).

* Autor korespondencyjny: Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – PZH, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 22 54 21 261; e-mail: bfiecek@pzh.gov.pl

Tabela I

Rezerwuary i wektory zakażeń wywołanych przez bakterie rodzaju *Bartonella*

Rezerwuar	Wektor	*Bartonella* spp.	Chorobotwórczość dla człowieka	Piśmiennictwo
Człowiek	Moskit	*B. bacilliformis*	Choroba Carrion'a: gorączka Oroya, verruga peruana	[21]
Człowiek	Pchły kocie i kleszcze, wszy	*B. quintana*	Gorączka okopowa, zapalenie wsierdzia, bacillary angiomatosis	[42]
Królik	Pchły	*B. alsatica*	Zapalenia wsierdzia, limfadenopatia	[41]
Kot	Pchły kocie	*B. clarridgeiae*	Cat scratch diseae – choroba kociego pazura	[34]
Szczur	Pchła szczurza	*B. elizabethae*	Zapalenie wsierdzia, zapalenie siatkówki i nerwu wzrokowego	[20]
Mysz , nornica	Pchły	*B. grahamii*	zapalenie siatkówki i nerwu wzrokowego	[5]
Kot, pies	Pchły kocie, kleszcze	*B. henselae*	CSD, bacillary angiomatosis, zapalenie wsierdzia, zapalenie siatkówki i nerwu wzrokowego, bakteriemia	[32, 33]
Kot	Pchła kocia (?)	*B. koehlerae*	Zapalenie wsierdzia	[35]
Lis, szop, kojot	Pchła	*B. rochalimae*	Bakteriemia, gorączka	[18]
Szczur (gryzonie)	Roztocza (?)	*B. tamiae*	Bakteriemia, gorączka	[25]
Myszak	Kleszcz	*B. vinsonii* subsp. *arupensis*	Bakteriemia, gorączka, zapalenie wsierdzia	[29]
Pies	Kleszcz, pchła	*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*	Zapalenie wsierdzia	[6]
Wiewiórka ziemna	Nieznany	*B. washoensis*	Zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie wsierdzia	[19]
Szczur wędrowny	Pchła szczurza	*B. birtlesii*	nieznany	[37, 44]
Bydło, kot	Nieznany	*B. bovis* (= *B. weissie*)	Nieznany	[10]
Sarna	Nieznany	*B. capreoli*	Nieznany	[2]
Bydło	Nieznany	*B. chomelii*	Nieznany	[28]
Mysz polna, nornica	Nieznany	*B. doshiae*	Nieznany	[44, 45]
Sarna, mysz	Nieznany	*B. peromysci*	Nieznany	[4]
Szczur	Pchła szczurza	*B. phoceensis*	Nieznany	[46]
Szczur	Pchła szczurza	*B. rattimassiliensis*	Nieznany	[46]
Sarna	Nieznany	*B. schoenbuchensis*	Nieznany	[30]
Mysz polna, nornica	Nieznany	*B. talpae*	Nieznany	[4]
Nornica	Pchła	*B. taylorii*	Nieznany	[45]
Szczur	Pchła szczurza	*B. tribocorum*	Nieznany	[46]
Mysz polna, nornica	Roztocza *vinsonii*	*B. vinsonii* subsp.	Nieznany	[14]

Wykazano, że w kleszczu *Ixodes ricinus* mogą jednocześnie współwystępować: *Bartonella* spp., *Borrelia burgdorferi sensu lato* i pierwotniak *Babesia* spp. W doświadczeniach laboratoryjnych stwierdzono, że dorosłe kleszcze (67%) częściej wywołują zakażenia u szczurów niż nimfy (15%) wszystkimi trzema patogenami [39]. Stwierdzono także, że samce *I. pacificus* znacznie częściej są zainfekowane *Bartonella* spp. niż samice i przenoszą: *B. henselae, B. quintana, B. washoensis* i *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii.* Ze względu na to, że bakterie te są chorobotwórcze dla ludzi, kleszcze rodzaju *Ixodes* odgrywają bardzo ważną rolę w przenoszeniu *Bartonella* spp. pomiędzy zwierzętami i ludźmi [8].

Bakterie z rodzaju *Bartonella* po wniknięciu do organizmu człowieka ulegają adhezji do komórek nabłonkowych (zwłaszcza śródbłonka naczyń krwionośnych). W przyleganiu tych bakterii do komórek gospodarza uczestniczy klasa białek Taas (trimeric autotransporter adhesins). Następnie na drodze fagocytozy bakterie penetrują do wnętrza komórek śródbłonka gdzie namnażają się w fagosomie. Możliwe jest także aktyno-zależne przedostawanie się drobnoustroju do wnętrza komórek nabłonkowych, związane z reorganizacją cytoszkieletu. Wymaga to udziału białek (Cdc42, Rho oraz Rac) będących GTP-azami – przełącznikami molekularnymi, których aktywność zależy od związania guanozynotrifosforanu (GTP). Zaobserwowano, że *B. henselae* formuje duże agregaty, które po związaniu się z powierzchnią komórki są wchłaniane tworząc wakuolę zwaną „inwasomem". Struktura ta stwarza

idealne warunki do replikacji bakterii chroniąc je przed odpowiedzią układu immunologicznego gospodarza i enzymami rozkładającymi białka, kwasy nukleinowe, węglowodany i tłuszcze, obecnymi w lizosomach. Kolejnym etapem jest uwolnienie tych mikroorganizmów do cytoplazmy.

W czasie namnażania się bakterii dochodzi do wydzielenia do otoczenia czynników prozapalnych, czynników wzrostu oraz zahamowania apoptozy zakażonych komórek. Szereg tych zmian stymuluje proliferację komórek gospodarza i powoduje powstanie guzowatych tworów w śródbłonku naczyń krwionośnych. Po upływie ok. 4 dni od momentu zakażenia następuje uwolnienie bakterii do krwi gdzie przy udziale białek Omp i pili przylegają one do błony cytoplazmatycznej erytrocyta, wnikają do niego i namnażają się wewnątrzkomórkowo do czasu jego wypełnienia (do 15 bakterii w erytrocycie). Obecne wewnątrz krwinki bakterie nie wpływają na długość jej życia i pozostają wewnątrz erytrocyta do czasu jego rozpadu. Zdolność bakterii z rodzaju *Bartonella* do pasożytowania we krwi ma duże znaczenie dla krążenia tych drobnoustrojów w środowisku. Są one bowiem przenoszone za pośrednictwem krwiopijnych wektorów. Wyjątek stanowi *B. bacilliformis*, która dzięki produkcji białka zwanego deforminą doprowadza do hemolizy krwinek [13, 17, 24, 40].

3. Chorobotwórczość bakterii *Bartonella* spp. dla zwierząt

Zwierzęta zakażone bakteriami z rodzaju *Bartonella* często przechodzą przewlekłą i bezobjawową bakteriemię, która prowadzi do zmian patologicznych w wielu narządach wewnętrznych. Przeprowadzono badania na 18 kotach, które zakażono *B. henselae* lub *B. clarridgeiae,* a następnie obserwowano przez 454 dni. U niektórych zwierząt pojawiły się niewielkie zmiany neurologiczne i gorączka. W 436 dniu u 6 kotów po przeprowadzeniu wziernikowania dna oka (oftalmoskopii) zdiagnozowano zaćmę, która jak się przypuszcza może być wynikiem przewlekłej infekcji. Nie stwierdzono natomiast zapalenia błony naczyniowej oka. Po upływie 454 dni 13 kotów uśpiono (1 padł wcześniej z innych przyczyn nie związanych z bartonelozą, 4 nie stwierdzono obecności swoistych przeciwciał) i ich narządy zbadano histopatologicznie. Wykazano, że u wszystkich kotów doszło do pojawienia się guzowatych tworów w węzłach chłonnych, u 9 kotów wystąpiły zmiany w śledzionie i zapalenie dróg żółciowych, 6 kotów miało zapalenie wątroby, 8 kotów zapalenie mięśnia sercowego, a 4 koty śródmiąższowe zapalenie nerek. DNA bartoneli wyizolowano z węzłów chłonnych, serca, wątroby, nerek, płuc i mózgu. Wykrycie tych zmian u kotów wskazuje na etiologiczną rolę *Bartonella* spp. w wielu procesach chorobowych u tych ssaków [24]. Bezdomne psy także stanowią rezerwuar kilku gatunków rodzaju *Bartonella*. Najczęściej występują u nich: *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii, B. henselae, B. clarridgeiae, B. washoensis, B. elzabetae* oraz *B. quintana*. Zakażenie psów tymi bakteriami powoduje zapalenie wsierdzia, arytmię, gorączkę, zapalenie węzłów chłonnych, zapalenie śluzówki nosa, krwawienie z nosa, zapalenie naczyń krwionośnych, zapalenie błony naczyniowej przedniego odcinka oka oraz anemię hemolityczną. Wektorami tych drobnoustrojów zwykle są pchły (*Ctenocephalides felis, Xenopsylla cheops*) i kleszcze (*I. ricinus*, *Dermacentor reticulatus*) [3, 9].

W Polsce przeprowadzono badania 102 dorosłych kleszczy *I. ricinus* usuniętych ze zwierząt domowych. Kleszcze pochodziły z 49 psów (83 szt.) i 11 kotów (19 szt.). Wszystkie były przyczepione do skóry zwierząt i usunięte zostały przez lekarza weterynarii. Wśród 83 kleszczy zdjętych z psów – 34 były napite, 9 z nich było częściowo napitych, a 40 głodnych. Natomiast z 19 kleszczy pochodzących od kotów – 4 były napite, 7 częściowo napitych, a 8 było głodnych. Obecność DNA *B. henselae* stwierdzono metodą PCR i następnie sekwencjonowania w 5 kleszczach zdjętych z psów (4 z nich były najedzone a 1 głodny). Po kilku miesiącach zbadano poziom swoistych przeciwciał w surowicy u 3 psów, od których pochodziły zakażone kleszcze. U dwóch z nich wykryto przeciwciała IgG dla *B. henselae*. Przedstawione doniesienia dowodzą, że bakterie z rodzaju *Bartonella* mogą bytować w kleszczach, które żerując na psach są wektorem zakażenia [39].

Obecnie, prowadzone zarówno u zwierząt jak i ludzi badania nad zapaleniem błony naczyniowej przedniego odcinka oka i zapaleniem naczyniówki, wskazują, że często czynnikiem etiologicznym są bakterie z rodzaju *Bartonella*. Stwierdzono, że u psa zapalenie błony naczyniowej oka oraz wieloogniskowe zmiany patologiczne w obrębie dna oka wywołane były przez *B. vinsoni* subsp. *berkhoffii*. W surowicy krwi wykryto swoiste przeciwciała (miano 512). Przypadek ten wskazuje na możliwość występowania związku pomiędzy wyżej wymienionymi chorobami oczu i infekcją *Bartonella* spp. u psów bez klinicznych objawów ze strony innych organów lub tkanek [31]. Przypuszcza się także, że szczepy patogenne dla zwierząt są również chorobotwórcze dla ludzi. Przeniesienie tych drobnoustrojów na człowieka zachodzi w wyniku naruszenia ciągłości tkanek.

4. Chorobotwórczość *Bartonella* spp. dla ludzi

U ludzi występują różne postaci bartoneloz w zależności od gatunku bakterii, która je wywołuje. *B. henselae* jest gatunkiem najczęściej powodującym zakażenia u ludzi i głównie jest przenoszona przez ślinę psów i kotów, wnikającą do organizmu człowieka poprzez zadrapanie lub ugryzienie. *B. henselae* jest przyczyną

choroby kociego pazura (cat scratch disease-CSD), będącą łagodną, mającą zdolność do samoograniczenia się chorobą. Pierwsze objawy występują w miejscu zadrapania lub pogryzienia przez kota. Powstała zmiana ma postać grudki, krosty lub pęcherzyka. Następnie w ciągu ok. 14 dni dochodzi do powiększenia okolicznych węzłów chłonnych (pachowych, pachwinowych, szyjnych podżuchwowych), które stają się tkliwe i mogą wykazywać tendencję do ropienia. Ciężki przebieg CSD oraz powikłania mające miejsce przede wszystkim u pacjentów z obniżoną odpornością, np. u chorych na AIDS; objawiają się limfadenopatią, encefalopatią i drgawkami, powiększeniem śledziony oraz wątroby, atypowym zapaleniem płuc, opłucnej lub wsierdzia, guzami trzustki, zapaleniem kłębuszkowym nerek. Istnieją badania sugerujące, że CSD może być związana z nowotworem piersi [43].

Głównymi objawami tego zakażenia jest gorączka lub powiększenie węzłów chłonnych w pobliżu miejsca zadrapania. Zdarza się, że u ludzi immunokompetentnych zakażenie ulega samoistnemu ograniczeniu jednak znacznie częściej wymaga antybiotykoterapii. Głównie stosuje się: azytromycynę, erytromycynę lub doksycyklinę.

Innym gatunkiem bakterii z rodzaju *Bartonella* zdolnym do wywołania choroby u ludzi jest *B. quintana*. Mikroorganizm ten w zeszłym stuleciu był czynnikiem etiologicznym występującej epidemicznie gorączki okopowej (trench fever), która w czasie I wojny światowej była najpowszechniej występującą chorobą. Infekcja wywołana przez *B. quintana,* ze względu na ogólnie panującą wszawicę (wektorem są wszy głowowe i odzieżowe) szerzyła się wśród żołnierzy przebywających w okopach. Po II wojnie światowej sądzono, że bakteria ta została całkowicie wyeliminowana jednak w ciągu ostatnich trzech dekad stwierdzono obecność tych bakterii wśród osób bezdomnych i alkoholików. Dawniej gorączka okopowa charakteryzowała się nawracającym co 5 dni gwałtownym wzrostem temperatury i utratą świadomości, którym towarzyszyła bakteriemia i zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego. Dziś zakażenia wywołane przez *B. quintana* mają inny przebieg oraz objawy. U chorych odnotowuje się gorączkę, zapalenie węzłów chłonnych, złe samopoczucie, dreszcze, jadłowstręt, pocenie się, uporczywy ból stawów i mięśni, zapalenie spojówek oraz liczne rumieniowate plamki lub guzki występujące na klatce piersiowej, brzuchu i plecach. Zakażenie bakterią *B. quintana* wymaga diagnostyki różnicującej z malarią, brucelozą, leptospirozą, durem wysypkowym lub chorobą Denga. Najskuteczniejsze w leczeniu tych zakażeń są tetracykliny.

Inną postacią bartonelozy jest *bacillary angiomatosis* (BA), czyli choroba rozrostowa naczyń. U 55–90% pacjentów związana jest ona ze zmianami patologicznymi warstw powierzchniowych naskórka lub skóry i warstw podskórnych. Czerwono-purpurowe guzki mogą powstawać w pojedynczych miejscach lub na całym ciele. Mogą sprawiać trudność w identyfikacji ze względu na objawy podobne do naczyniaka tkanki nabłonkowej lub ziarniniaka ropnego i dlatego wymagają potwierdzenia histopatologicznego. Rany powstałe podczas choroby mogą być gładkimi i równymi lub brodawkowatymi, sączącymi się i krwawiącymi guzkami, których obecność stwierdzono w mózgu, węzłach chłonnych, drogach oddechowych i przewodzie pokarmowym oraz szpiku. Na BA zapadają najczęściej osoby z osłabionym układem immunologicznym, np. chorzy na AIDS, pacjenci po transplantacji, przyjmujący leki immunosupresyjne oraz kobiety w ciąży. Schorzenie to jest wywoływane przez *B. quintana* i *B. henselae*. W Ameryce występuje taka sama liczba zakażeń wywołanych przez te dwa gatunki drobnoustrojów, natomiast w Europie przeważają infekcje *B. henselae*. Obydwa gatunki mają zdolność produkcji czynników mogących stymulować angiogenezę (proces tworzenia nowych naczyń włosowatych) oraz zmiany skórne, choć *B. quintana* przede wszystkim charakteryzuje się zdolnością do wywołania uszkodzeń podskórnych i kostnych, zaś *B. henselae* związana jest ze schorzeniami węzłów chłonnych i plamicą wątrobową (*peliosis hepatis* – PH) [38, 47]. PH jest to jednostka chorobowa związana z patologicznymi zmianami wątroby, prowadzącymi do uszkodzenia tego narządu i krwotoków. Charakteryzuje się licznymi, małymi oraz torbielowatymi zmianami występującymi w miąższu wątroby, mającymi od jednego milimetra do kilku centymetrów średnicy. Zwykle prowadzi do uszkodzenia ściany w zatoce naczyniowej, krwotoku, a następnie do nekrozy hepatocytów. Choroba ta może być wynikiem infekcji bakteryjnej i dotyczy ludzi przyjmujących przez dłuższy czas sterydy anaboliczne (np. 6-tioguaninę lub 6-merkaptopurynę) lub doustne środki antykoncepcyjne, a także chorych z nowotworem, mukowiscydozą albo zakażonych wirusem HIV [7, 11].

Równie niebezpieczna jest choroba Carrion'a, powszechnie występująca (ze względu na obecność wektora – *Phlebotomus noguchii* i *P. verrucarum*) w Andach (Peru), która jest wywoływana przez *Bartonella baciliformis*. Ostrą fazą tej choroby jest gorączka *Oroya* charakteryzująca się bakteriemią i hemolityczną anemią, bardzo często prowadzącą do śmierci. Natomiast faza przewlekła tej choroby nazywana *verruga peruana*, wywołuje zarówno głębokie jak i powierzchniowe naczyniakowate zmiany w obrębie skóry, będące wynikiem proliferacji kolonizowanych przez bakterie tkanek nabłonkowych. *B. baciliformis* jest przenoszona przez moskity, a człowiek jest jej naturalnym rezerwuarem. Patogen ten *in vitro* stymuluje proliferację komórek nabłonkowych. *In vivo* efekt ten uzyskano wszczepiając szczurom gąbkowe dyski nasączone ekstraktem z tych bakterii [21, 27].

4.1. *Bartonella* spp. – patogen wywołujący choroby oczu

Wiele badań wskazuje, że *B. henselae* może być związana z chorobami oczu. Zdiagnozowano chorobę kociego pazura objawiającą się: zapaleniem nerwu wzrokowego, zapaleniem błony naczyniowej przedniego odcinka oka, ogniskowym zapaleniem naczyń siatkówki lub naczyniówki, zmianami patologicznymi wokół tarczy nerwu wzrokowego, stanem zapalnym w obrębie ciałka szklistego oraz niedrożnością żyłkową lub tętniczkową w obrębie siatkówki [31, 36]. Dotychczas nie wyjaśniono czy *B. henselae* bezpośrednio powoduje choroby oczu czy są one wynikiem reakcji immunologicznych. Istnieje wiele doniesień na temat chorób oczu związanych z występowaniem *B. henselae* w organizmie człowieka. Opisano historię 42-letniej kobiety, która została podrapana przez kota i miała objawy CSD takie jak limfadenopatia, osłabienie oraz gorączka; odnotowano także znaczne zmniejszenie ostrości widzenia w lewym oku. Po dokładnych badaniach oka wykryto lekki obrzęk tarczy nerwu wzrokowego i częściowy obrzęk plamki żółtej. Zastosowano doksycyklinę (100 mg dwa razy dziennie) oraz kortykosteroidy. Zanik obrzęku plamki żółtej odnotowano po 4 tygodniach leczenia [49].

U trzech pacjentów, mających na co dzień kontakt z kotami, również opisano oczną bartonelozę wywołaną przez *B. henselae*. Stwierdzono u nich uporczywą gorączkę utrzymującą się od 15 do 21 dni oraz u dwóch osób wykazano nagłą, jednostronną utratę ostrości widzenia związaną z zapaleniem nerwu wzrokowego. U trzeciego pacjenta wystąpiły objawy zapalenia naczyniówki i siatkówki. W leczeniu ich zastosowano rifampicynę. Ostatecznie jednak okazało się, że u jednego z pacjentów doszło do trwałego uszkodzenia wzroku [43]. W Polsce także opisano przypadek zapalenia siatkówki i nerwu wzrokowego, z obrzękiem tarczy nerwu wzrokowego i plamki żółtej u dwóch osób. Wystąpiło u nich jednostronne, bezbolesne pogorszenie wzroku. Badania diagnostyczne, obydwóch pacjentów wykazały podwyższony poziom przeciwciał IgG dla *B. henselae*. Jeden z nich otrzymał doustny antybiotyk z grupy makrolidów i steroid, drugi zaś został pozostawiony bez leczenia. Ostatecznie stwierdzono, że czas trwania choroby oczu był dłuższy u osoby, która nie była poddana leczeniu [23]. Podobny przypadek odnotowano w Szwajcarii, gdzie 30-letnia kobieta zgłosiła się do kliniki okulistycznej z szybko postępującą i pogarszającą się wadą wzroku w lewym oku. Stwierdzono w nim zmiany patologiczne plamki żółtej i zapalenie naczyniówki. Badania serologiczne w kierunku *B. henselae* dały wynik pozytywny (wykryto obecność przeciwciał klasy IgG) wskazując na przewlekłą CSD [49]. Interesującym doniesieniem jest historia 4-letniego chłopca, który został podrapany na twarzy przez kota. Stwierdzono u niego silnie zaczerwienione oko i limfadenopatię węzłów szyjnych. Wykonano biopsję guzka zlokalizowanego w tęczówce, przeprowadzono badania serologiczne i molekularne (PCR) w kierunku *B. henselae*. W badaniach tych wykryto przeciwciała klasy IgM oraz DNA *B. henselae* w materiale z biopsji, co świadczyło o obecności świeżej, aktywnej infekcji wywołanej przez te bakterie. Badania histopatologiczne tęczówki wykazały jej strefowy, ziarniakowy stan zapalny, z centralnie umiejscowionym na niej ropniem otoczonym powłoką nabłonkowych histiocytów z limfocytami [16].

We Francji w latach 2001–2007 zbadano 1520 prób pobranych od pacjentów z zapaleniem błony naczyniowej oka. Pośród nich zdiagnozowano infekcję u 147 pacjentów (11.1%) z czego u 78 chorych (53%) zakażenie było wywołane przez takie bakterie jak: *Bartonella* spp. *Chlamydia* spp., *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii, Paracoccus yeti* i *Trephonema whipplei*, u 18 pacjentów zdiagnozowano zakażenie wirusem *Herpes,* a u 9 grzybami. Badania te wskazują, iż wiele drobnoustrojów może wywołać choroby oczu o podobnych objawach [15].

B. quintana i *B. grahamii* również mogą wywoływać patologiczne zmiany w obrębie gałki ocznej u ludzi. Obecność przeciwciał klasy IgG wykryto u pacjentów mających zapalenie siatkówki i niedrożność w obrębie jej naczyń, zapalenie błony naczyniowej oka, tęczówki i ciała rzęskowego. *B. elizabethae* także może powodować zapalenie siatkówki i nerwu wzrokowego. Zakażenia wywołane obecnością tych bakterii diagnozowane są coraz częściej u osób ze stanami zapalnymi w obrębie gałki ocznej [22].

Wiadomo, że u pacjentów zakażonych *B. henselae* i *B. quintana* dochodzi do powstania zespołu Parinaud'a (Parinaud's oculoglandular syndrome – POGS), czyli połączenia lokalnej limfadenopatii z zapaleniem spojówek, a dokładniej jednostronnym zapaleniem spojówek z polipowatym ziarniniakiem powieki lub spojówki oraz powiększonymi węzłami chłonnymi okolicy ucha. Innym objawem choroby oczu jest zapalenie siatkówki i nerwu wzrokowego, które następuje zwykle po jednej stronie. W późniejszym etapie gdy dochodzi do powstania licznych ognisk zapalnych w siatkówce i tarczy nerwu wzrokowego oraz powiększenia plamki ślepej, następuje ubytek pola widzenia. Czasem ma miejsce wyciek z naczyń siatkówki prowadzący do krwotoku i pojawienia się mętów ciała szklistego. Obserwowane jest również zapalenie błony naczyniowej przedniego odcinka oka oraz owrzodzenia. Zespół Parinaud'a może być różnicowany z innymi chorobami infekcyjnymi, jak np.: tularemią, gruźlicą, kiłą, mononukleozą. Zapalenie siatkówki i nerwu wzrokowego może występować także w przypadku toksoplazmozy, kiły, gruźlicy, infekcji wirusowych oraz boreliozy z Lyme. W leczeniu CSD u immunokompetentnych pacjentów stosuje się doksycyklinę (200 mg/dobę) ze względu na to, że

pokonuje ona barierę krew-mózg oraz krew-oko. Stosuje się również ciprofloksacynę (1,5 g/dobę), gentamycynę (3–5 mg/kg/dobę), erytromycynę (2 g/dobę), albo trimetoprim-sulfametoksazol (Baktrim 2 tabl./dzień), które stanowią dobrą alternatywę i tak jak doksycyklina są podawane 14–28 dni. Również może być podawana azytromycyna 500 mg/dobę przez 3–5 dni. Wobec pacjentów, którzy mają defekt układu immunologicznego powinna zostać przeprowadzona znacznie dłuższa terapia trwająca ok. 4 miesiące. W przypadku ocznych zmian stosuje się leczenie antybiotykami i sterydami [1].

5. Podsumowanie

Obecnie wiadomo, że infekcje wywołane przez *Bartonella* spp. mogą przyjmować formę związaną z chorobami oczu. Dlatego u pacjentów mających bliski kontakt z kotem, u których występuje postępująca gorączka i utrata ostrości widzenia należy podejrzewać oczną bartonelozę [43]. CSD oczu zwykle charakteryzuje się niewielkimi zmianami patologicznymi i często jest łagodna, choć zdarzają się poważne komplikacje takie jak wspomniane zapalenie siatkówki i nerwu wzrokowego oraz guzki naczyniówki i zapalenie rogówki.

Najnowsze doniesienia dotyczące CSD u ludzi i zwierząt wskazują, że występuje u nich duże podobieństwo miejsca i rodzaju zmian patologicznych. U zwierząt zdecydowanie lepiej są poznane infekcje wywołane przez *Bartonella* spp., a uzyskane informacje mogą stanowić bardzo dobre odniesienie w stosunku do zakażeń występujących u ludzi. Analiza poszczególnych przypadków klinicznych, w których stwierdzane są powiększone węzły chłonne, powinna uwzględniać w diagnostyce różnicowej CSD.

Piśmiennictwo

1. Accorinti M.: Ocular Bartonellosis. *Int. J. Med. Sci.* **6**, 131–132 (2009)
2. Bai Y., Cross P.C., Malania L., Kosoy M.: Isolation of *Bartonella capreoli* from elk. *Vet. Microbiol.* **148**, 329–332 (2011)
3. Bai Y., Kosoy M.Y., Boonmar S., Sawatwong P., Sangma+ needet S., Peruski L.F.: Enrichment culture and molecular identification of diverse *Bartonella* species in stray dogs. *Vet. Microbiol.* **146**, 314–319 (2010)
4. Birtles R.J., Harrison T.G., Saunders N.A., Molyneux D.H.: Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45,** 1–8 (1995)
5. Bown K.J., Bennet M., Begon M.: Flea-borne *Bartonella gra+ hamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. *Emerg. Infect. Dis.* **10**, 684–7(2004)
6. Breitschwerdt E.B., Blann K.R., Stebbins M.E., Muñana K.R., Davidson M.G., Jackson H.A., Willard M.D.: Clinicopathological abnormalities and treatment response in 24 dogs seroreactive to *Bartonella vinsonii (berkhoffii)* antigens. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **40**, 92–101 (2004)
7. Buchmann A.U., Kempf V.A. J., Kershaw O., Gruber A.D.: *Peliosis hepatis* in cats is not associated with *Bartonella henselae* infection. *Vet. Pathol.* **47**, 163–166 (2010)
8. Chang, C. C., Chomel B. B., Kasten R. W., Romano V., Tietze N.: Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1221–1226 (2001)
9. Celebi B., Carhan A., Kilic S., Babur C.: Detection and genetic diversity of *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* strains isolated from dogs in Ankara, Turkey. *J. Vet. Med. Sci.* **72**, 969–973 (2010)
10. Cherry N.A., Maggi R.G., Cannedy A.L., Breitschwerdt E.B.: PCR detection of *Bartonella bovis* and *Bartonella henselae* in the blood of beef cattle. *Vet. Microbiol.* **135**, 308–312 (2009)
11. Choi S.K., Jin J.S., Cho S.G., Choi S.J., Kim C.S., Choe Y.M., Lee K.Y.: Spontaneous liver rupture in a patent with *peliosis hepatis*: a case report world. *J. Gastroenterol.* **15**, 5493–5497 (2009)
12. Dawn A., Boman M., Straub H., Siperstein-Cook L., Couve+ laire K., Bruno B., Chomel D., Namekata Y., Kasten R.W.: Oral shedding of *Bartonella* in cats: correlation with bacteremia and seropositivity. *Vet. Microbiol.* **146**, 371–375 (2010)
13. Dehio C.: Molecular and cellular basis of bartonella pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **58,** 365–390 (2004)
14. Diederen B.M., Vermeulen M.J., Verbakel H., van der Zee A., Bergmans A., Peeters M.F.: Evaluation of an internally controlled real-time polymerase chain reaction assay targeting the groEL gene for the detection of *Bartonella* spp. DNA in patients with suspected cat-scratch disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **26**, 629–633 (2007)
15. Drancourt M., Berger P., Terrada C., Bodaghi B., Conrath J., Raoult D., LeHoang P.: High prevalence of fastidious bacteria in 1520 cases of uveitis of unknown etiology. *Medicine, Balt.* **87**, 167–176 (2008)
16. Font R.L., Valle M.D., Mitchell B.M., Boniuk M.: Cat-scratch uveitis confirmed by histological, serological, and molecular diagnoses. *Cornea,* **30**, 468–471 (2011)
17. Guz K., Goroszkiewicz W.: Biologia, ekologia i chorobotwórczość pałeczek z rodzaju *Bartonella*. *Post. Mikrobiol.* **48**, 43–54 (2009)
18. Henn J.B., Chomel B.B., Boulouis H.J., Kasten R.W., Murray W.J., Bar-Gal G.K., King R., Courreau J.F., Baneth G.: *Bartonella rochalimae* in raccoons, coyotes, and red foxes. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1984–1987 (2009)
19. Inoue K., Kabeya H., Hagiya K., Kosoy M.Y., Une Y., Yoshikawa Y., Maruyama S.: Multi-locus sequence analysis reveals host specific association between *Bartonella washoensis* and squirrels. *Vet. Microbiol.* **148**, 60–65 (2011)
20. Inoue K., Kawabata H. i wsp.: Prevalence and genetic diversity of *Bartonella species* isolated from wild rodents in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5086–5092 (2008)
21. Kaiser P.O., Riess T., O'Rourke F., Linke D., Kempf V.A.J.: *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 7–15 (2011)
22. Kalogeropoulos C., Koumpoulis I., Mentis A., Pappa C., Zafeiropoulos P., Aspiotis M.: Bartonella and intraocular inflammation: a series of cases and review of literature. *Clin. Ophthalmol.* **5**, 817–829 (2011)
23. Karolak J., Gotz-Wipckowska A.: Neuroretinitis in cat scratch disease. *Klin. Oczna.* **112**, 131–134 (2010)
24. Kordick D.L., Brown T.T., Shin K., Breitschwerdt E.B.: Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1536–1547 (1999)

25. Kosoy M., Petersen L.R.: *Bartonella tamiae* sp. nov., a newly recognized pathogen isolated from three human patients from Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 772–775 (2008)
26. Lamas C., Curi A., Bóia M., Lemos E.: Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil – a review**.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **103**, 221–235 (2008)
27. Maguina C., Guerra H., Ventosilla P.: Bartonellosis. *Clin. Dermatol.* **27**, 271–280 (2009)
28. Maillard R., Grimard B., Chastant-Maillard S., Chomel B., Delcroix T., Gandoin C., Bouillin C., Halos L., Vayssier-Taussat M., Boulouis H.J.: Effects of cow age and pregnancy on *Bartonella* infection in a herd of dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 42–46 (2006)
29. Mansueto P., Di Lorenzo G., Rizzo M., Mazzola G., Affronti M., Battista Rini G., Mansueto S.: Bartonellosis. *Recenti. Prog. Med.* **94**, 177–185 (2003)
30. Matsumoto K., Berrada Z.L., Klinger E., Goethert H.K., Telford S.R. 3rd.: Molecular detection of *Bartonella schoenbuchensis* from ectoparasites of deer in Massachusetts. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **8**, 549–554 (2008)
31. Michau T.M., Breitschwerdt E.B., Gilger B.C., Davidson M.G.: *Bartonella vinsonii subspecies berkhoffi* as a possible cause of anterior uveitis and chorodoitis in a dog. *Vet. Ophthalmol.* **6**, 299–304 (2003)
32. Mitchell B.M., Font R.L.: Molecular detection of *Bartonella henselae* for the diagnosis of cat scratch disease and *bacillary angiomatosis* of the conjunctiva. *Cornea*, **30**, 807–814 (2001)
33. Namekata D.Y., Kasten R.W., Boman D.A., Straub M.H., Siperstein-Cook L., Couvelaire K., Chomel B.B.: Oral shedding of *Bartonella* in cats: correlation with bacteremia and seropositivity. *Vet. Microbiol.* **146**, 371–375 (2010)
34. Ohad D.G., Morick D., Avidor B., Harrus S.: Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella koehlerae* from aortic valves of boxer dogs with infective endocarditis. *Vet. Microbiol.* **141**, 182–185 (2010)
35. Ormerod L.D., Dailey J.P.: Ocular manifestation of cat-scratch disease. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **10**, 209–216 (1999)
36. Paziewska A., Harris P.D., Zwolińska L., Bajer A., Siński E.: Recombination within and between species of the alpha proteobacterium *Bartonella* infecting rodents. *Microb. Ecol.* **61**, 134–145 (2011)
37. Pierard-Franchimont C., Quatresooz P., Pierard G.E.: Skin disease associated with *Bartonella* infection: facts and controversies. *Clin. Dermatol.* **28**, 483–488 (2010)
38. Podsiadły E., Chmielewski T., Sochon E., Tylewska-Wierzbanowska S.: *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks removed from dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **7**, 189–192 (2007)
39. Podsiadły E., Sapiejka E., Dąbrowska-Bień J., Majkowski J., Tylewska-Wierzbanowska S.: Diagnostyka choroby kociego pazura oraz współczesne metody rozpoznawania bartoneloz--opis przypadku. *Pol. Merk. Lek.* **152**, 131–135 (2009)
40. Raoult D., Roblot F., Rolain J.M., Besnier J.M., Loulergue J., Bastides F., Choutet P.: First isolation of *Bartonella alsatica* from a valve of a patient with endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 278–279 (2006)
41. Rolain J.M., Franc M., Davoust B., Raoult D.: Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae, B. henselae, B. clarridgeiae, Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 338–342 (2003)
42. Staggemeier R., Venker C.A., Klein D. H., Spilki F. R., Cantarelli V. V.: Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **105**, 873–878 (2010)
43. Tager F.M., Jahnsen K.J., Mediavilla R.M., Burgos L.R.: Ocular bartonellosis: report of three clinical cases. *Rev. Chilena. Infectol.* **25**, 58–63 (2008)
44. Telfer S., Clough H.E., Birtles L.R., Bennett M., Carslake D., Helyar S., Begon M.: Ecological differences and coexistence in a guild of microparasites: *Bartonella* in wild rodents. *Ecology,* **88**, 1841–1849 (2007)
45. Tsai Y.L., Chuang S.T., Chang C.C., Kass P.H., Chomel B.B.: *Bartonella* species in small mammals and their ectoparasites in Taiwan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 917–923 (2010)
46. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T.: Zoonozy przenoszone przez kleszcze na terenie Polski. *Post. Mikrobiol.* **49**, 191–197 (2010)
47. Vayssier-Taussat M., Le Rhun D., Bonnet S., Cotté V.: Insights in *Bartonella* host specificity. *Ann. NY Acad. Sci.* **1166**, 127–132 (2009)
48. Veselinović D.: *Bartonella henselae* as a cause of optical nerve neuritis. *Vojnosanit Pregl.* **63**, 971–974 (2006)
49. Wimmersberger Y., Baglivo E.: *Bartonella henselae* infection presenting as a unilateral acute maculopathy. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* **224**, 311–313 (2007)

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 1, 55–65
http://www.pm.microbiology.pl

PROBIOTYCZNE BAKTERIE FERMENTACJI MLEKOWEJ (LAB)

Julitta Gajewska[1]*, Mieczysław K. Błaszczyk[1]

[1]Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 159; 02-776 Warszawa

Wpłynęło w marcu 2010 r.

1. Wstęp. 2. Mikroorganizmy probiotyczne i ich cechy. 3. Cechy fizjologiczno-biochemiczne LAB. 4. pH wewnątrzkomórkowe LAB. 5. Potencjał oksydoredukcyjny bakterii mlekowych. 6. Fermentacje węglowodanów i produkcja kwasu mlekowego. 7. Wielkości genomów LAB. 8. Metabolizm azotowy LAB. 9. Metabolizm innych związków. 10. Polisacharydy produkowane przez LAB. 11. Podsumowanie

Probiotic lactic acid bacteria (LAB)

Abstract: The authors present physiological and biochemical properties of lactic acid bacteria (LAB). It is surprising that despite LAB multiple auxotrophy (they lack certain metabolic pathways and grow on full media only), they are not pathogens but probiotic microorganisms producing bacteriocins. A list of probiotic bacteria is not long and including mainly lactic acid bacteria. Their metabolic properties (hydrocarbonate fermentation, transformation of protein substrates, exopolysaccharide production) are explaited in food production and preservation.

1. Introduction. 2. Probiotic microorganisms and their abilities. 3 Short physiological and biochemic characteristics of LAB. 4. Intracellular pH of lactic acid bacteria. 5. Redox potential of LAB. 6. Carbohydrates fermentation and lactic acid production. 7. Genomes sizes of LAB. 8. Nitrogen metabolism. 9. Metabolism of other compounds. 10. Polysaccharides produced by LAB. 10. Summary

Słowa kluczowe: bakterie mlekowe, fizjologia i biochemia bakterii mlekowych, probiotyk
Key words: Lactic Acid Bacteria (LAB), physiology and biochemistry of LAB, probiotics

1. Wstęp

Bakterie mlekowe (LAB) są Gram-dodatnimi niesporującymi ziarenkowcami, pałeczkami lub laseczkami, zawierającymi w DNA chromosomalnym nie więcej niż 53% molowych par G+C. Nie wykorzystują tlenu jako akceptora elektronów (beztlenowce) oraz nie posiadają katalazy, zamiast niej syntetyzują dysmutazę nadtlenkową, usuwającą reaktywne formy tlenu. Prowadzą fermentację glukozy tylko do kwasu mlekowego (homofermentacja z wydajnością ≥ 85%) lub do kwasu mlekowego, etanolu (octanu) i CO_2 (heterofermentacja z wydajnością 50% produkcji kwasu mlekowego). Wszystkie bakterie mlekowe są beztlenowcami, niektóre z nich tolerują niewielkie stężenia tlenu w środowisku. Aktualnie tylko nieliczne zaliczane są do probiotycznych (*pro bios*), które razem z prebiotykami, znalazły zastosowanie w żywieniu i leczeniu ludzi [6, 21, 30, 40] oraz zwierząt hodowlanych, np. trzody chlewnej, są także używane jako substytuty antybiotykowych stymulatorów wzrostu [16, 20, 22, 23, 38, 56–58].

W ostatnim wydaniu Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – *The Firmicutes* (wyd. II, 2009) [5], bakterie mlekowe zebrane są w rzędzie *Lactobacillales*, w następujących rodzinach i rodzajach:

1) *Lactobacillaceae: Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*;
2) *Aerococcaceae*: *Aerococcus*, *Abiotrophia, Dolosicoccus, Eremococcus, Facklamia, Globicatella, Ignavigranum*;
3) *Carnobacteriaceae*: *Carnobacterium, Alkalibacterium, Allofustis, Alloiococcus, Atopobacter, Atopostipes, Desemzia, Dolosigranum, Granulicatella, Isobaculum, Marinilactibacillus, Trichococcus*;
4) *Enterococcaceae*: *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*;
5) *Leuconostocaceae*: *Leuconostoc*, *Oecococcus*, *Weisella*;
6) *Streptococcaceae*: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactovum*;
   oraz w rzędzie *Bacillales*
7) *Sporolactobacillaceae*: *Sporolactobacillus.*

Rodzaj *Lactobacillus*. Tannock [66] tak charakteryzuje *Lactobacillus*: „należą do bakterii mlekowych, które z olbrzymim potencjałem metabolicznym produkują kwas mlekowy jako końcowy produkt metabolizmu węglowodanów. Prowadzą fermentację węglowodanów, są aerotolerantami lub beztlenowcami, acidofilami lub tolerującymi środowiska kwaśne. Do wzrostu wymagają podłoża bogatego w węglowodany, aminokwasy, peptydy, kwasy tłuszczowe, estry, składniki kwasów nukleinowch i witaminy. Występują w środowisku zawierającym substancje pokarmowe, szczególnie węglowodany, w dużych ilościach, a więc w takich, jak nabłonek ludzki i zwierzęcy (jama gębowa, przewód pokarmowy, pochwa), na powierzchni roślin,

* Autor korespondencyjny: Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159; 02-776 Warszawa; tel. 22 59 32635; e-mail: gajewska3@wp.pl

w odchodach, ściekach oraz fermentowanej i psującej się żywności. *Lactobacillus* pojawiają się w przewodzie pokarmowym ludzi zaraz po urodzeniu." U zdrowego dorosłego człowieka *Lactobacillus* występują w jamie ustnej w ilości 10^3–10^7 jednostek tworzących kolonie jtk/ml, jelicie krętym w ilości 10^3–10^7 jtk/ml, w okrężnicy w ilości 10^4–10^8 jtk/ml oraz dominują wśród wspólnoty bakterii pochwy. Są wykorzystywane w produkcji fermentowanej żywności: warzyw, mięsa, a w szczególności fermentowanych produktów mlecznych. Zainteresowanie bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* rośnie, głównie z powodów biotechnologicznych, czego wyrazem są poszukiwania nowych gatunków. I tak w 1984 roku znano 44 gatunki *Lactobacilli*, 88 w 2003 a 135 gatunków 2007, zaś w następnym roku znaleziono i opisano kolejnych 10 gatunków. *Lactobacillus* jest rodzajem wysoko heterogennym (G+C w DNA od 33 do 55%). Do tej pory zsekwencjonowano genomy następujących gatunków: *L. acidophilus, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, L. johnsonii, L. sakei, L. salivarius* i *L. plantarum* [4].

Taksonomia i miejsce filogenetyczne gatunków rodzaju *Lactobacillus* nie korespondują z właściwościami metabolicznymi. 145 gatunków bakterii mlekowych [13], należących do *Lactobacilli* wedle typu fermentacji można podzielić na trzy grupy: (1) obligatoryjnie homofermentatywne, (2) fakultatywnie heterofermentatywne oraz (3) obligatoryjnie heterofermentatywne. Obligatoryjnie homofermentatywne *Lactobacilli* są zdolne do fermentacji glukozy do kwasu mlekowego szlakiem EMP (Embden-Meyerhof-Parnas), podczas gdy pentozy oraz glukonian nie są fermentowane z powodu braku fosfoketolazy (rozkłada rybulozo-5P na triozo-3P i acetylo-P). Degradację heksoz do kwasu mlekowego szlakiem EMP prowadzą następujące gatunki: *L. acidophilus, L. amylolyticus, L. amylophilus, L. animalis, L. avarius, L. catenaformis, L. crispatus, L. delbrueckii, L. equi, L. farciminis, L. gallinarum, L. helveticus, L. iners, L. johnsonii, L. kalixensis, L. kefiranofaciens, L. mali, L. manihotivorans, L. mindensis, L. nagelli, L. pantheris, L. ruminis, L. saerimneri, L. salivarius, L. satsumensis, L. sharpeae, L. suntoryeus, L. ultunensis, L. versmoldensis, L. vitulinus*.

Fakultatywnie heterofermentatywne *Lactobacilli* degradują heksozy do kwasu mlekowego oraz degradują pentozy i często glukonian, gdyż posiadają zarówno aldolazę fruktozo-1,6-difosforanową [rozszczepia fruktozo-1,6-bifosforan na dwie cząsteczki: aldehyd 3-fosfoglicerynowy (C_3) i fosfodihydroksyaceton (C_3)], jak i fosfoketolazę. Należą tu: *L. acetotolerans, L. acidipiscis, L. agilis, L. algidus, L. alimentarius, L. arizonensis, L. bifermentans, L. casei, L. coleohominis, L. coryniformis, L. curvatus, L. cypricasei, L. fornicalis, L. fuchuensis, L. graminis, L. hamsteri, L. homohiochii, L. intestinalis, L. jensenii, L. kimchii, L. kitasatonis, L. murinus, L. paracasei, L. paralimentarius, L. paraplantarum, L. pentosus, L. perolens, L. plantarum, L. rhamnosus, L. sakei, L. spicheri, L. zeae* [13].

Trzecia grupa *Lactobacilli* obligatoryjnie heterofermentatywna – zawiera drobnoustroje degradujące heksozy i pentozy w szlaku fosfoglukonowym z wydzieleniem CO_2. Należą tu następujące gatunki: *L. antri, L. buchneri, L. collinoides, L. diolivorans, L. durianis, L. ferintoshensis, L. fermentum, fructivorans, L. frumenti, L. gastricus, L. hilgardii, L. ingluviei, L. kefiri, L. kunkeei, L. lindneri, L. malefermentans, L. mucosae, L. oris, L. panis, L. parabuchneri, L. paracolinoides, L. parakefiri, L. pontis, L. psittaci, L. reuteri, L. rosii, L. sanfranciscensis, L. suebicus, L. vaccinostercus, L. vaginalis* [13].

2. Mikroorganizmy probiotyczne i ich cechy

Wśród wielu mikroorganizmów produkujących kwas mlekowy w procesie fermentacji cukrów, jedynie nieliczne są uważane za gatunki probiotyczne (tabela I).

Termin probiotyk został po raz pierwszy użyty przez Lilly i Stilwell w 1965 roku do opisania substancji wydzielanej przez jeden organizm, która stymuluje wzrost i rozwój innego. Rodzaje, gatunki i szczepy bakterii uznanych za bezpieczne (GRAS) dla zwierząt i człowieka określone zostały przez: FDA oraz raporty i zarzą-

Tabela I

Mikroorganizmy uważane za probiotyczne dla ludzi i/lub zwierząt (Z: Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition,* 73: 365–373; za zgodą American Society for Nutrition)

Grupa mikroorganizmów	Gatunki mikroorganizmów
Gatunki *Lactobacillus*	*L. acidophilus, L. amylovorans, L. casei, L. crispatus, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, L. gallinarum, L. gassei, L. johnsonii, L. paracasei, L. plantarum*[1], *L. reuteri, L. rhamnosus*
Gatunki *Bifidobacterium*	*B. adolescentis, B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. lactis*[2], *B. longum*
Inne bakterie mlekowe	*Enterococcus faecalis*[1], *Enterococcus faecium, Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus acidilactici*[3], *Sporolactobacillus inulinus*[1], *Streptococcus thermophilus*[3]
Bakterie i grzyby niemlekowe	*Bacillus cereus* var. *toyoi* [1, 2], *Escherichia coli* szczep nissle, *Propionibacterium freundenreichii*[1, 2], *Saccharomyces cerevisiae*[2], *Saccharomyces boulardii*[2]

Legenda: 1 – gatunki zwierzęce; 2 – gatunki farmaceutyczne; 3 – słabo znany jako probiotyczny

dzenia Unii Europejskiej. O dopuszczeniu do stosowania preparatów probiotycznych w Polsce decyduje Komisja Oceny Pasz przy Ministerstwie Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej RP. W 2008 r. odbyła się II Europejska Konferencja EUPROBIO dotycząca probiotyków i ich zastosowania (www.euprobio.com), w czasie której dokonano przeglądu aktualnego zastosowania probiotyków w medycynie ludzkiej, udoskonalenia metod otoczkowania preparatów oraz mechanizmów ich działania.

Cechy probiotyków. W 2004 roku Libudzisz [40] zaproponowała następujące kryteria selekcji i wymagania jakie powinny być stawiane bakteriom probiotycznym, podkreślając takie aspekty, jak bezpieczeństwo stosowania (7 punktów), cechy funkcjonalne (7 punktów) oraz cechy technologiczne (7 punktów), prezentowane poniżej.

Bezpieczeństwo stosowania: (1) pochodzenie od człowieka (jeśli preparat przeznaczony jest do stosowania dla ludzi); (2) izolowany z przewodu pokarmowego zdrowych osobników; (3) dokładna identyfikacja diagnostyczna; (4) historia bezpiecznego stosowania; (5) brak informacji o powiązaniu a chorobami infekcyjnymi serca lub przewodu pokarmowego; (6) brak zdolności rozszczepiania soli kwasów żółciowych; (7) brak genów oporności na antybiotyki, zlokalizowanych na elementach niestabilnych.

Cechy funkcjonalne: (1) przeżywalność w przewodzie pokarmowym, oporność na kwasowość soku żołądkowego sole żółci; (2) aktywność antagonistyczna w stosunku do patogenów jelitowych, normalizacja składu mikroflory jelitowej; (3) adherencja i zdolność kolonizacji określonych miejsc w przewodzie pokarmowym; (4) konkurencyjność w stosunku do mikroflory zasiedlającej ekosystem jelitowy, w tym blisko spokrewnionych gatunków; (5) oporność na bakteriocyny, kwasy i inne związki antagonistyczne produkowane przez mikroflorę jelitową; (6) zależny od szczepu efekt poprawy zdrowia człowieka; (7) immunomodulacja.

Cechy technologiczne: (1) łatwość produkcji dużej ilości biomasy; (2) oporność na procedury utrwalania starterów (zamrażanie, liofilizacja, przechowywanie), (3) żywotność i stabilność cech bakterii w czasie przygotowania i dystrybucji produktów probiotycznych; (4) wysoka przeżywalność przechowalnicza w gotowym produkcie; (5) brak pogorszenia cech organoleptycznych gotowych produktów; (6) oporność na bakteriofagi; (7) stabilność genetyczna. Więcej informacji o zastosowaniu bakterii probiotycznych jako probiotyków można znaleźć w pracach [39, 55, 67].

Żaden z postulatów podawanych przez różnych autorów nie podejmuje sprawy potencjału oksydoredukcyjnego (*Eh*), który wydaje się jednym z najistotniejszych czynników środowiskowych i determinujących występowanie i rozwój danego gatunku LAB w środowisku. W środowisku naturalnym, bakterie rozmieszczone są wedle gradientu potencjału redoks oraz wedle gradientu chemicznego substancji odżywczych. Wysokie dodatnie wartości *Eh* wskazują na warunki tlenowe o niskiej aktywności elektronów, oraz tendencję do utleniania, ujemne wartości *Eh* wskazują na warunki zredukowane o wysokiej aktywności elektronów. *Eh* odpowiada proporcjom substancji utlenianych do zredukowanych w środowisku. Wartość E_7 jest rozumiana jako *Eh* przy wartości pH 7,0 wynoszące 0,2 V (lub 200 mV), a ta wartość jest linią dzielącą warunki utlenione od zredukowanych. Wartość $E_7 > 0{,}2$ V wskazuje na utlenienie, wartość $E_7 < 0{,}2$ V wskazuje na redukowanie. Niektóre jony występują w formie utlenionej lub zredukowanej w zależności od wartości potencjału redoks, np. rozpuszczalne w wodzie sole Fe^{+2} dominują przy $< 0{,}2$ V a sole Fe^{+3} dominuje przy $> 0{,}2$ V i są nierozpuszczalne. Potencjał oksydoredukcyjny jest ściśle związany z obecnością lub brakiem tlenu cząsteczkowego. Środowisko jest w równowadze z tlenem atmosferycznym przy potencjale redoks wynoszącym +0,8 V. Wiele środowisk naturalnych pozbawionych jest tlenu lub zawierają tlen w znacznie mniejszych ilościach. W środowiskach tych nie tylko licznie występują mikroorganizmy szybkorosnące, lecz także takie, które mogą być bardzo wrażliwe na tlen cząsteczkowy. Istnienie obok siebie środowiska beztlenowego i tlenowego nie jest możliwe, występuje pomiędzy nimi interfaza, w której rozwijają się mikroorganizmy zwane mikroaerofilami, które rosną przy znacznie niższym stężeniu tlenu. Ta sytuacja sprawia, że istnieje stosunkowo liczna grupa bakterii fakultatywnie beztlenowych, która rośnie w warunkach beztlenowych, fermentując węglowodany lub różne grupy bakterii, które wykorzystują nieorganiczne akceptory elektronów typu azotany, siarczany, węglany i Fe(III) lub korzystają z innych mechanizmów oddychania. Tego typu zjawisko ma miejsce np. w silnie zeutrofizowanych ekosystemach wodnych. Niektóre mikroorganizmy tlenowe posiadają wysoce efektywny system wyszukiwania tlenu i często są zdolne do współzawodniczenia z mikroaerofilnymi bakteriami w warunkach obniżonego stężenia tlenu.

3. Cechy fizjologiczno-biochemiczne LAB

Bakterie mlekowe pozyskują energię z fermentacji cukrów. Nie są zdolne do hydrolizy polisacharydów typu celuloza. Z powodu ograniczeń zdolności biosyntezy różnych związków (silna auksotrofia) występują w środowiskach, które są bogate w aminokwasy, witaminy, puryny i pirymidyny, słowem rosną na podłożach pełnych, które zaspakajają ich zapotrzebowanie. Niektóre z nich są organizmami wolnożyjącymi, inne żyją w asocjacjach ze zwierzętami kręgowymi, a także mogą występować u ludzie i zwierząt jako potencjalne patogeny (*Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*). Występują

powszechnie w mleku i jego produktach oraz w materiale roślinnym. Wchodzą także w skład mikroflory ludzkiej jamy ustnej, przewodu pokarmowego oraz pochwy, pełniąc wielokrotnie pozytywną rolę. Powszechnie, nie tylko u roślinożerców, występują w przewodzie pokarmowym ryb, płazów, gadów, ptaków i ssaków. Izoluje się je z hodowli namnażających uprzednio zaszczepionych próbkami pobranymi z gleb lub osadów dennych, co wskazuje, że w glebach i wodzie nie pełnią ważnej roli ekologicznej [12]. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że w glebach i wodzie brak jest dostatecznie dużo substratów białkowych, które zaspokajały potrzeby aminokwasowe tej wielokrotnie auksotroficznej grupy bakterii. Pierwszy gatunek należący do szczepów heterofermentujących bakterii mlekowych *Lactobacillus acidophilus* był izolowany w 1900 roku z odchodów zwierzęcych a nie z gleby czy wody [47].

4. pH wewnątrzkomórkowe LAB

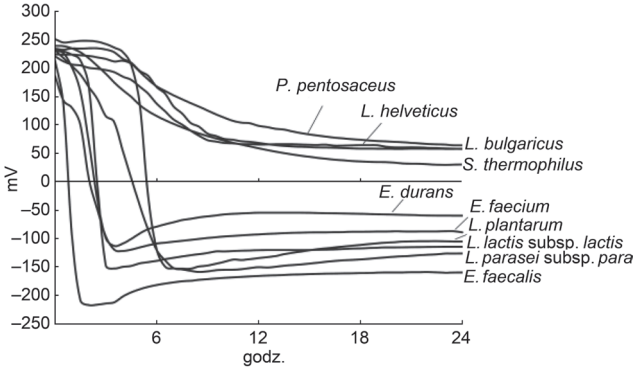
Bakterie mlekowe posiadają zdolność regulacji wewnątrzkomórkowego pH i ta cecha jest dla nich bardzo istotna, pozwala na życie w stosunkowo niskim pH środowiska. Bakterie niezdolne do utrzymania pH zbliżonego do neutralnego wewnątrz komórek, w czasie wzrostu przy niskim pH tracą zdolność do życia i aktywności metabolicznej. Generalnie bakterie mlekowe rosną do momentu: (1) wyczerpania się węglowodanów, aminokwasów oraz innych substancji koniecznych do życia; (2) nagromadzenia się substancji toksycznych lub hamujących wzrost, tego typu jak nadtlenek wodoru; (3) stężenia jonów wodoru, poniżej którego bakterie mlekowe nie są w stanie tolerować. I tak np. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* oraz *Streptococcus thermophilus* rosną w mleku, dopóki pH środowiska nie obniży się do wartości 4,5 i to niezależnie od nielimitowanego stężenia substancji odżywczych. Również *Lactobacillus helveticus* oraz *L. debrueckii* subsp. *bulgaricus* wykazują najwyższą szybkość wzrostu przy pH 5,5–5,8. Niektóre gatunki *Lactobacillus* są neutrofilami i rosną w zakresie pH 6,3–6,9. Są one nazywane szczepami starterowymi w procesie kwaszenia mleka. Innym przykładem jest *Streptococcus thermophilus*, który rośnie najlepiej przy pH 6,5–7,5. Generalnie bakterie mlekowe rosną oraz pozostają żywe przy pH w zakresie od 4,5 do 7,0 [28, 33]. Wiele przebadanych enzymów degradujących białka oraz fermentujących węglowodany wykazuje maksymalną aktywność przy odczynie w zakresie neutralnym. Przy pH hamującym wzrost bakterii mlekowych, obecny w mleku kwas powoduje niszczenie błon cytoplazmatycznych, co objawia się wyciekaniem jonów magnezu i potasu z komórek do środowiska zewnętrznego. Np. wyciekanie magnezu z komórek *Lactobacillus casei* odbywa się przy pH < 3,0. Jednakże przy pH suboptymalnym w czasie wzrostu i fermentacji, pH cytoplazmatyczne komórek pozostaje bardziej alkaliczne niż środowiska, w którym żyją. Dzieje się tak, ponieważ bakterie mlekowe szybko wydzielają kwas mlekowy z komórek za pośrednictwem tranasporterów, nadto błony biologiczne są względnie nieprzepuszczalne dla protonów oraz cząsteczek kwasu mlekowego. W ten sposób tworzy się gradient pH (ΔpH) pomiędzy cytoplazmą a środowiskiem ich życia. I tak *Streptococcus thermophilus* utrzymuje pH wewnątrzkomórkowe do momentu, kiedy pH środowiska nie jest niższe niż 5,2. Jeśli pH w podłożu hodowlanym spada dalej, komórki *Streptococcus thermophilus* nie są w stanie utrzymać pH cytoplazmatyczne na poziomie wartości neutralnych i obumierają**.** Zmiany pH komórkowego z wartości 7,5 do 6,6 powodują 50% redukcji szybkości wzrostu *Enterococcus faecalis* [33].

LAB mogą tolerować obniżenie pH w komórkach tylko o jedną jednostkę (Δ pH ~ 1,0), zwłaszcza zaś te, których optimum pH mieści się w zakresie neutralnego (np. 7,5). Flora mlekowa należąca do rodzaju *Lactococcus* i *Streptococcus* utrzymuje neutralne pH wewnątrz komórek, również wtedy, kiedy spada pH w fermentowanym mleku. Takie procesy jak transport aminokwasów i peptydów do komórek oraz proteolizy, są zależne od pH cytoplazmatycznego komórek LAB oraz pH środowiska [33].

Poza pH wiele czynników ma wpływ na wzrost i produkcję biomasy bakterii mlekowych, w tym głównie temperatura, skład chemiczny podłoża hodowlanego oraz obecność tlenu. Najszybciej procesy fermentacji i produkcji biomasy zachodzą w temperaturze od 26 do 42°C, większość hodowli tych bakterii prowadzi się w temperaturze 3537°C. W warunkach laboratoryjnych hodowle LAB prowadzone są w podłożach zawierających trypton, ekstrakt drożdżowy i laktozę. Szczepy niewykorzystujące laktozy są hodowane w podłożach zawierających glukozę. Bakterie mlekowe w większości tolerują niewielkie stężenia tlenu, są więc mikroaerofilami. Niektóre szczepy jak *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* i *Leuconostoc mesenteroides* w obecności niewielkiej ilości tlenu produkują zwiększone ilości kwasu mlekowego. W hodowlach laboratoryjnych tworzą od 2 do 6,5 g biomasy/l przy specyficznej szybkości wzrostu wynoszącej od 0,180 do 0,256, co sprawia, że w czasie 48 godzin hodowle osiągają gęstość komórek wynoszącą $10^9 10^{10}$ jtk/ml [78].

5. Potencjał oksydoredukcyjny bakterii fermentacji mlekowej

Jednym z czynników determinującym występowanie i wzrost określonych gatunków bakterii w danym środowisku jest potencjał oksydoredukcyjny (*Eh*), definiowany jako mierzalna wartość zdolności chemicznego lub



Rys. 1. Zmiany potencjału oksydoredukcyjnego w czasie wzrostu różnych szczepów bakterii mlekowych w sterylizowanym odtłuszczonym mleku [7]

(Z: Brasca M., Morandi S., Lodi R., Tamburini A. 2007. Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 1516–1524; dzięki uprzejmości i za zgodą Wydawnictwa Wiley-Blackwell)

biochemicznego systemu do utleniania (oddawania elektronów) lub redukcji (przyjmowania elektronów). Stan utleniania i redukcji wskazują na dodatnie lub ujemne wartości mV. W różnych hodowlach mikroorganizmów wartości *Eh* zmieniają się od około +300 mV (tlenowce) do mniej niż –400 mV (beztlenowce) (Rys. 1).

Niski potencjał sprawia, że w danym środowisku rozwijają się tylko bakterie beztlenowe. I tak np. *Eh* świeżego mleka wynosi +150 mV, *Eh* sera Cheddar wynosi –140 mV, a Camembert aż –350 mV [7]. W tych warunkach w serach nie występują bakterie należące do rodzaju *Pseudomonas, Brevibacterium, Bacillus* i *Micrococcus*. Jeden z dziesięciu badanych gatunków LAB *Enterococcus faecalis* jest zdolny do obniżenia potencjału oksydoredukcyjnego, osiągając $Eh_{min} = -221 \pm 13{,}4$ mV w czasie $1{,}1 \pm 0{,}3$ godziny ($\Delta_{max} = 326 \pm 93{,}1$ mV) [7]. W przewodzie pokarmowym, w dalszych jego odcinkach, istnieją warunki sprzyjające rozwojowi bakterii beztlenowych i fakultatywnych beztlenowców. Warto tutaj dodać, że potencjał oksydoredukcyjny w jelicie grubym świń jest niski i wynosi –214±55 mV [32]. To wskazuje na fakt, że tylko część z mikroorganizmów probiotycznych, lub tylko *E. faecalis*, jest zdolny do wzrostu i rozwoju przy tak niskich wartościach potencjału oksydoredukcyjnego. *E. faecalis* ze względu na warunki panujące w przewodach pokarmowych wydaje się być najbardziej stosownym gatunkiem probiotycznym (wymaga niskiego potencjału redoks), z drugiej strony istnieją doniesienia o jego oportunistycznej aktywności w przewodzie pokarmowym [54], powoduje także zakażenia dróg moczowych, bakteremię oraz zapalenie wsierdzia. Inny gatunek *Enterococcus faecium*, który również rozwija się przy niskim potencjale redoks a jest rekomendowany jako probiotyk także jest powodem schorzeń [17, 54]. *E. faecalis* i *E. faecium* są zdolne do tworzenia biofilmów na różnych powierzchniach biotycznych i abiotycznych, w tym również urządzeniach medycznych, rozprzestrzeniając się [48].

W tabeli II podano średnie wartości parametrów kinetycznych szybkości zmiany potencjału redoks w hodowlach dziesięciu gatunków LAB w odtłuszczonym sterylnym mleku. Niektóre z tych szczepów jak widać mogą rosnąć tylko w warunkach, gdzie istnieje dodatni potencjał redoks. Wydaje się, że ta informacja dyskryminuje je jako gatunki probiotyczne. Są to: *Lactobacillus helveticus, Streptococcus thermophilus, Pediococcus pentosaceus* a nawet *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Wszystkie z dziewięciu badanych szczepów, w tym *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, rosną tylko przy potencjale redoks nie niższym niż +23 mV, ale niektóre przy +87 mV [7], co wydaje się dyskryminować je jako szczepy probiotyczne.

Tabela II

Średnie wartości parametrów kinetycznych szybkości obniżania potencjału redoks w czasie w hodowlach LAB w odtłuszczonym sterylizowanym mleku (Z: Brasca M., Morandi S., Lodi R., Tamburini A. 2007. Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, **103**, 1516–1524; dzięki uprzejmości i za zgodą Wydawnictwa Wiley-Blackwell)

Gatunek	Eh_{min} (mV)	t_{min} (h)	Δ_{max}	t* (h)
Enterococcus faecalis	-221,1±13,4	2,7±0,6	326,8±9,0	1,1±0,3
Enterococcus faecium	-137,7±31,3	3,7±1,7	141,1±37,6	2,4±0,5
Enterococcus durans	-120,5±29,0	3,4±0,6	154,3±53,3	2,2±0,6
Streptococcus thermophilus	7,9±12,3	22,2±3,2	26,5±14,7	3,6±0,9
Lactobacillus lactis subsp. *lactis*	-162,3±32,9	3,8±0,8	246,6±79,2	2,2±0,9
Pediococcus pentosaceus	59,0±23,5	20,3±4,7	24,3±8,9	5,8±2,2
Lactobacillus delbrueckii subsp.*bulgaricus*	54,2±20,4	15,7±6,1	41,7±13,1	6,0±1,7
Lactobacillus plantarum	-153,8±18,2	7,6±0,6	229,5±88,6	5,4±0,4
Lactobacillus helveticus	54,4±23,8	13,6±5,5	30,8±10,5	6,4±1,6
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei*	-169,1±13,8	7,5±2,7	174,2±56,2	4,2±1,3

Legenda: Δ_{max} – maksymalna różnica między oznaczeniami; t* – czas przy którym występuje najniższa wartość potencjału redoks; Eh_{min} – minimalna wartość *Eh* po 24 h; t_{min} – czas korespondujący z Eh_{min}.

6. Wielkości genomów LAB

Dotychczas zsekwencjonowano niewiele ponad dwadzieścia genomów LAB oraz piętnaście gatunków *Bifidobacteria,* produkujących kwas mlekowy. Sekwencje te opublikowano pod adresem: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial _taxtree.html. Szczegółowy wykaz prac dotyczących zsekwencjonowanych genomów wybranych gatunków bakterii mlekowych probiotycznych można znaleźć pod ww adresem.

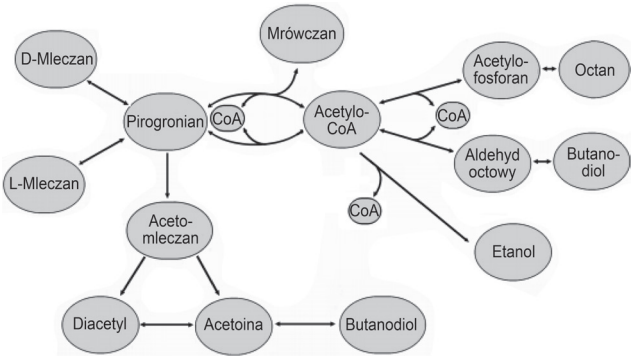
LAB w swoich chromosomach wielkości 1.269.484 pz do 3.308.274 pz (odpowiednio dla *Lactobacillus iners* DSM 13335 i *L. plantarum* WSFS1), kodują głównie białka strukturalne i funkcjonalne, najmniej auksotroficzny gatunek *L. plantarum* koduje tylko 3.007 białek. Niewielka liczba genów u bakterii mlekowych w porównaniu z prototroficznym szczepem K12 *Escherichia coli* (4290 białek) wskazuje na ich utratę w czasie rozwoju ewolucyjnego [42]. Dobroczynny i probiotyczny zdaniem wielu autorów *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* zawiera tylko 1.856.951 pz w swoim chromosomie oraz syntetyzuje nieco ponad półtora tysiąca białek strukturalnych i funkcjonalnych. U bakterii mlekowych około 10–12% sekwencji chromosomowych to pseudogeny (od 17 do 206). Z analizy sekwencji genów wynika, że genomy LAB zawierają kilka szlaków uniwersalnych, włączając proces glikolizy. Różne genetyczne zdarzenia, jak mutacje, duplikacja genów, horyzontalny transfer genów, itd. nadają pewne swoiste cechy gatunkom LAB. W 2003 roku zsekwencjonowano genom *L. plantarum* WCFS1 jako pierwszy wśród rodzaju *Lactobacillus* [47]. Zawiera on najdłuższy analizowany do tej pory genom, który składa się z kolistego chromosomu (3.3 Mpz) oraz trzech plazmidów (1,9 i 2,3 i 36 kpz). Genom zawiera 3.052 geny kodujące białka, w tym pięć operonów *rrn* oraz sekwencje sześćdziesięciu dwóch tRNA. Genom koduje szlaki wielu aminokwasów, z wyjątkiem val, leu i ileu oraz nie zawiera sekwencji pozakomórkowej proteazy – odpowiednika PrtP występującej u *Lactococcus lactis*. Genom *L. plantarum* koduje wszystkie enzymy dwóch szlaków przemian glukozy – glikolizy oraz fosfoketolazy oraz przemian kwasu pirogronowego, co związane jest z pojawianiem się różnych produktów końcowych fermentacji. Nadto posiada duże ilości genów kodujących systemy regulacyjne, transportowe (włączając 25 kompletnych PEP-PTS systemów transportu cukru) oraz białka kilku rodzajów stresu. Geny te pozwalają gatunkowi *L. plantarum* na zasiedlanie różnych środowisk i zajmowania określonych nisz ekologicznych. Genom zawiera informacje o ponad 200 różnych pozakomórkowych białkach, pozwalających na budowę otoczki oraz ochronę przed fagocytozą. Stosunkowo duży odcinek genomu w okolicach odcinka początku replikacji DNA zawiera geny odpowiedzialne za transport, degradacją itd. *Lactobacillus sakei* 23K, którego genom ma 1,8 Mpz, nie jest zdolny do syntezy aminokwasów, z wyjątkiem kwasu asparaginowego i glutaminowego, ale posiada geny odpowiedzialne za syntezę substancji antybakteryjnych, oporności na wysokie stężenia soli kuchennej oraz zmiany potencjału redoks [47]. Probiotyczny *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118, obok chromosomu, posiada megaplazmid pMP118, który koduje hydrolazę soli żółciowych oraz produkcję bakteriocyny Abp118 *in vivo*, skierowanej m.in. przeciwko *Listeria monocytogenes* [47].

7. Fermentacja węglowodanów i produkcja kwasu mlekowego

LAB są wykorzystywane w utrwalaniu żywności. Nadają one nie tylko wygląd i smak wielu produktom fermentacji, ale także hamują wzrost bakterii, które żywność tę psuje. Rosną w zakresie temperatur od 10 do 45°C, przy zasoleniu 6,5% NaCl, i pH w zakresie 4–9,6. Pewne z nich w procesie fermentacji wydzielają CO_2, inne (homofermentacyjne) w procesie fermentacji produkują albo obydwa izomery L i D – kwasu mlekowego lub tylko izomer L. W czasie fermentacji węglowodanów syntetyzują ATP w procesie fosforylacji substratowej. ATP jest następnie wykorzystywane do biosyntez komórkowych. Pierwsza grupa bakterii mlekowych prowadzi fermentację glukozy tylko do kwasu mlekowego (homofermentacja) wykorzystując szlak degradacji glukozy EM (Embden-Meyerhof) i zawiera *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, gatunki należące do rodzaju *Brochothrix, Carnobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus* oraz *Vagococcus*. Homofermentatywne bakterie mlekowe katabolizują jeden mol glukozy do dwóch moli kwasu pirogronowego, który przy zrównoważonym potencjale redoks utlenia NADH, redukując się do kwasu mlekowego. Druga grupa zawierająca gatunki należące do rodzaju *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Weissella* oraz *L. fermentum, L. brevis* i *L. kefiri* to bakterie mlekowe heterofermentatywne, które katabolizują glukozę szlakiem PP (pentozowo-fosforanowym). Z jednego mola glukozy, poddanej uprzednio dekarboksylacji powstają: jeden mol gliceryloaldehydu fosforanowego, z którego powstaje mol kwasu mlekowego oraz jeden mol fosforanu acetylu, który jest redukowany do etanolu (Rys. 2).

W sumie z mola glukozy powstają: mol kwasu mlekowego, mol etanolu i mol dwutlenku węgla. Gatunki posiadające obydwie dehydrogenazy mleczanowe, produkują mieszaninę racemiczną izomerów kwasu mlekowego, posiadające tylko jedną z dehydrogenaz produkują tylko jeden z izomerów.

Lactobacillus casei KH-1 rośnie optymalnie w podłożu MRS o pH 5,7, zawierającym ekstrakt drożdżowy, namok kukurydziany i glukozę odpowiednio w stęże-



Rys. 2. Przemiany kwasu pirogronowego u bakterii mlekowych [3]
(Z: Baj i Markiewicz (red.). Biologia molekularna bakterii. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2006, za zgodą wydawnictwa PWN)

niach 1,276%, 3,505% i 2,390%, przy μ_{max} wynoszącym 0,994 h^{-1}. Jednakże optymalna produkcja kwasu mlekowego (~0,7 g/l h^{-1}) ma miejsce przy stężeniu tych surowców odpowiednio: 0,697%, 1,708% i 2,215% i μ_{max} wynoszącym 0,491 h^{-1} [28]. Wydajność produkcji kwasu mlekowego dla wybranych szczepów bakterii mlekowych przedstawia Tabela III.

Cytrynian jest substratem obecnym w wielu naturalnych substratach jak mleko, owoce, warzywa i jest metabolizowany przez niektóre gatunki LAB. Heterofermentatywne bakterie mlekowe jak *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* oraz *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremonis* są zdolne do metabolizmu cytrynianu w warunkach beztlenowych w obecności fermentowanego cukru np. glukozy czy laktozy [15]. W tych właśnie warunkach powstaje specyficzny produkt silnie zapachowy, jakim jest diacetyl. Kwas cytrynowy pobrany przez permeazę cytrynianiową jest najpierw hydrolizowany do octanu, pirogronianu i CO_2. Losy obecnego w komórce pirogronianu mogą być następujące: (1) pirogronian może być przekształcony do acetyloCoA i dalej do octanu i/lub aldehydu octowego/etanolu; (2) jest konwertowany do mrówczanu przy udziale liazy pirogronian:mrówczan; (3) jest przekształcany do acetomleczanu, który jest konwertowany do acetoiny i diacetylu ($CH_3{\cdot}CO{\cdot}CO{\cdot}CH_3$) oraz 2,3-butanediolu. Produkcja diacetylu oraz produktu pośredniego – acetoiny – zachodzi przy pH ~5,5. (4) redukowany do mleczanu, przy udziale dehydrogenazy mleczanowej. Inne szczepy tego typu jak

Tabela III

Produkcja kwasu mlekowego przez wybrane szczepy bakterii mlekowych na podłożach z różnymi substratami

Szczep LAB	Substrat	Kwas mlekowy g/l	Wydajność g/l × godz^{-1}	Piśmiennictwo
Lactobacillus amylovorans ATCC 33620	kukurydza kassava ziemniaki	10,1 4,8 4,2	0,8 0,2 0,1	[72] [72] [76]
Lactobacillus amylophilus GV6	jęczmień	27,3	0,3	[67]
Lactobacillus casei NRRL B-441	serwatka jęczmień	46,0 162,0	4,0 3,4	[9] [41]
Lactobacillus delbrueckii NCIBMB 8130	melasa	90,0	3,8	[37]
Lactobacillus delbrueckii NRRL B-445	drewno	108,0	0,9	[49]
Lactobacillus coryniformis subsp. *torquens*	celuloza	24,0	0,5	[76]
ATCC 25600	pulpa	23,1	0,5	[76]
Lactobacillus lactis subsp. *lactis* ATCC 19435	pszenica	106,0	1,0	[31]
Lactobacillus paracasei No. 8	żyto sorgo sorgo	84,5 81,5 106,0	2,4 2,7 3,5	[60] [60] [59]
Lactobacillus helveticus R211	jęczmień	66,0	1,4	[61]
Lactobacillus sp.RKY-2	ryż	129,0	2,9	[77]
Enterococcus faecalis RKY1	melasa pszenica kukurydza drewno	95,7 102,0 63,5 93,0	4,0 4,8 0,5 1,7	[72] [52] [52] [71]
Bifidobacterium longum	kozie mleko	–	1,62	[29]
Lactobacillus acidophilus	kozie mleko	–	2,4	[29]
Lactobacillus plantarum ATTC 21028	laktoza	41,0	1,0	[19]
Lactobacillus pentosus ATCC 8041	ścieki winiarskie	21,8	0,8	[8]
Lactobacillus delbrueckii mutant Uc-3	celobioza	90	2,2	[1]
Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469	ścieki papiernicze	73	2,9	[45, 74]
Lactobacillus bulgaricus	jęczmień	20,8	0,3	[25]

Streptococcus thermophilus oraz *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nie metabolizuje cytrynianu. Zdolność ta jest wykorzystywana w fermentacji żywności, nadając jej charakterystyczny zapach (np. serom). Wyprodukowany diacetyl nadaje charakterystyczny zapach świeżym serom, sfermentowanemu mleku, śmietanie oraz masłu. Losy kwasu cytrynowego mogą być jeszcze inne. W środowisku, w którym znajduje się maltoza i kwas cytrynowy, niektóre gatunki bakterii mlekowych (np. *L. sanfranciscensis*) produkują kwas mlekowy i octowy, ale po wyczerpaniu cytrynianu, głównym produktem fermentacji maltozy jest kwas mlekowy i etanol. Jak wynika z obserwacji maltoza jest źródłem węgla i energii, zaś kwas cytrynowy jest akceptorem elektronów [64].

8. Metabolizm azotowy LAB

LAB mają ograniczone możliwości syntezy aminokwasów, jeśli do ich syntezy wykorzystują nieorganiczne formy azotu. Bakterie mlekowe do wzrostu wymagają egzogennych aminokwasów i peptydów, które są uwalniane w procesie proteolizy białek obecnych w surowym materiale. Niektóre z bakterii do wzrostu wymagają od 6 do 13–18 aminokwasów w podłożu hodowlanym. *Lactobacillus johnsonii, L. sakei* i *L. delbrueckii*, są auksotroficzne w stosunku do 18 aminokwasów a *L. acidophilus* do 14 aminokwasów [49]. *L. plantarum* jest auksotroficzny tylko w stosunku do 3 aminokwasów: leucyny, izoleucyny i waliny. Przy braku dostatecznej ilości aminokwasów w środowisku bakterie mlekowe posiadają sprawny system proteolityczny, pozwalający na hydrolizę peptydów oraz białek celem uzyskania odpowiednich aminokwasów. Degradują nie tylko kazeinę w mleku, ale także albuminy, globuliny, gliadyny (np. w zacierach pszenicznych). I tak u *L. acidophilus* istnieje prawdopodobnie aż 20 różnych peptydaz oraz dwa kompletne systemy transportu oligopeptydów a nie tylko aminokwasów, dzięki którym zaspakajane są potrzeby związane głównie ze ich wzrostem i produkcją biomasy [2].

Proteolityczna aktywność bakterii mlekowych jest wykorzystywana przy produkcji żywności, które degradując białka nadaje smak, zapach i teksturę wyprodukowanej żywności np. sery typu Cheddar.

Auksotroficzność bakterii mlekowych dotyczy nie tylko aminokwasów, ale także witamin i zasad purynowych i pirymidynowych. I tak *Lactobacillus plantarum* do wzrostu wymaga 18 różnych związków organicznych z tej grupy, zaś *L. casei*, *L. helveticus* i *L. acidophilus* wymagają odpowiednio 20, 29 i 31 różnych związków organicznych koniecznych dla zaspokojenia ich podstawowych potrzeb [50].

W przemianach aminokwasów uczestniczą liczne enzymy, które katalizują reakcje transaminacji, deaminacji, dekarboksylacji oraz rozszczepienie łańcucha aminokwasów [36]. Transaminacja jest kluczowym etapem konwersji aminokwasów do związków aromatycznych przy udziale bakterii mlekowych. Tego typu reakcje obserwowane są w hodowlach mezofilnych gatunków takich jak np.: *L. paracasei, L. casei, L. plantarum, L. rhamnosus* oraz w hodowlach gatunków termofilnych jak: *L. helveticus, L. delbrueckii* (subsp. *lactis* oraz subsp. *bulgaricus*). W transaminacji leucyny, fenyloalaniny a także innych aminokwasów przy udziale *L. sakei* oraz *L. plantarum* bierze udział α-ketoglutaran jako akceptor grupy aminowej. Rozgałęzione aminokwasy mogą ulegać transaminacji do ketokwasów, które dalej są konwertowane do aldehydów i kwasów karboksylowych [63]. W procesie degradacji aminokwasów związanej z dekarboksylacją bakterie mlekowe w białkowych produktach żywnościowych tworzą aminy pierwszorzędowe, pełniące rolę obronną tych bakterii [43, 44]. Ich nadmiar, w szczególności wysoki poziom putrescyny i agmatyny, mogą stwarzać problemy toksylologiczne. Putrescyna i agmatyna wzmacniają działanie histaminy, która w nadmiernych ilościach jest toksyczna dla ludzi. Istnieją doniesienia o zwiększonej ilości tych dwóch amin (putrescyna i agmatyna), które powstają w czasie degradacji argininy i ornityny przez *Lactobacillus hilgardii* w sokach owocowych oraz dojrzewającym winie. Nadto aminy takie jak putrescyna (w winie) oraz kadaweryna (w piwie) są prekursorami karcynogennych nitrozoamin. W sokach owocowych obok wymienionych wyżej amin w znacznych ilościach mogą występować histamina, tyramina i fenyloetyloamina. Aktywność dekarboksylazy histaminowej oraz syntezę histaminy stwierdza się u *Pediococcus pentosaceus, Oenococcus oeni* oraz *Lactobacillus hilgardii*.

9. Metabolizm innych związków

LAB są zdolne do degradacji tłuszczów zawartych w produktach mlecznych, zamieniając je do metyloketonów, laktonów, tioestrów, keto- i hydroksykwasów, które nadają produktom mlecznym ostateczny zapach. Bakterie mlekowe posiadają odpowiedni zestaw enzymów esterolitycznych i lipolitycznych, dzięki którym hydrolizują estry kwasów tłuszczowych do kwasów tłuszczowych. Powstałe nienasycone kwasy tłuszczowe mogą ulegać autooksydacji lub oksydacji przy udziale lipooksygenazy bakterii mlekowych. Aktywność enzymów estero- i lipolitycznych jest obserwowana w zakresie temperatury od zera do 65°C, powyżej której są trwale inaktywowane.

10. Polisacharydy produkowane przez LAB

LAB produkują pozakomórkowe polisacharydy, które są albo bezpośrednio związane z powierzchnią komórek jako otoczki lub wydzielane z komórek do środowiska

Tabela IV

LAB produkujące egzopolisacharydy oraz ich skład chemiczny

Gatunek/podgatunek	Cukry budujące LPS	Ciężar molekularny	Piśmiennictwo
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*	glukoza, galaktoza, ramnoza	5×10^5	[10]
L. bulgaricus HP1	glukoza, galaktoza	–	[18]
L. helveticus	glukoza, galaktoza, ramnoza, N-acetyloglukozoamina	$1{,}6 \times 10^6$	[74]
L. paracasei subsp. *paracasei*	glukoza, galaktoza, ramnoza	–	[11]
S. thermophilus	glukoza, galaktoza, N-acetyloglukozoamina	1×10^6	[14]
S. thermophilus T10	glukoza, galaktoza, mannoza	–	[18]
L. lactis subsp. *cremoris*	galaktoza	–	[26]
L. lactis subsp. *cremoris*	glukoza, galaktoza, N-acetyloglukozoamina	1×10^6	[46]
L. lactis subsp. *cremoris*	glukoza, galaktoza, ramnoza, N-acetyloglukozoamina	1×10^4	[43]

w postaci śluzu. Są to egzopolisacharydy (EPS) [70]. Pełnią one w ich naturalnym środowisku ważną rolę: zabezpieczają przed odwodnieniem komórek, fagocytozą, atakiem fagów, antybiotykami i substancjami toksycznymi, zżeraniem przez pierwotniaki, stresem osmotycznym. Nie jest pewne czy EPS służy jako rezerwa pokarmowa dla bakterii, ponieważ nie są w stanie ich katabolizować [46]. Przykładami bakteryjnych egzopolisacharydów są także dekstran, ksantan, gellan, pullulan, alginian. Wiele mikroorganizmów wykorzystywanych w produkcji żywności produkuje EPS, w szczególności dotyczy bakterii mlekowych, *Propionibacteria* i *Bifidobacteria*. Wiele produkujących EPS bakterii mlekowych zostało wyizolowane z produktów mleczarskich takich jak jogurty, fermentowane mleko, ziaren kefiru, serów dojrzewających, fermentowanego mięsa i warzyw.

EPS bakterii mlekowych można podzielić na dwie grupy [70]: (1) homopolisacharydy, które można zaliczyć do czterech kategorii: (a) K-D-glukany np. produkowany przez *Leuconostoc mesenteroides* dekstran, zbudowany z cząsteczek glukozy, połączonych ze sobą wiązaniem K-1,6-glikozydowym, z odgałęzieniami K-1,3 lub K-1,6; (b) L-D-glukany zbudowane z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami L-1,3, z rozgałęzieniami L-1,2, produkowane przez *Pediococcus* i *Streptococcus*; (c) fruktany zbudowane z cząsteczek D-fruktozy połączonych ze sobą wiązaniami typu L-2,6 np. lewan produkowany przez *Streptococcus salivarius*; (d) inne jak np. poligalaktany. (2) heteropolisacharydy produkowane przez szczepy bakterii mlekowych odpowiednio mezofilnych i termofilnych: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis, L. lactis subsp. cremoris, Lactobacillus casei, L. sake, L. rhamnosus* oraz *L. acidophilus, L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, L. helveticus* i *Streptococcus thermophilus* [11]. Pewne z tych polisacharydów przyczyniają się do zdrowia ludzi albo jako niestrawialna frakcja przeciwguzowa, przeciwwrzodowa (np. żołądka), albo immunomodulacyjna albo obniżająca poziom cholestrolu we krwi. Ilości wyprodukowanych egzopolisacharydów w warunkach laboratoryjnych w zależności od szczepu i wielu innych czynników wahają się od kilkudziesięciu do jednego grama/l. W tabeli IV wymieniono bakterie mlekowe produkujące egzopolisacharydy oraz produkty uwalniane w procesie ich hydrolizy.

11. Podsumowanie

Pewne zdolności LAB takie jak fermentacja laktozy, metabolizm cytrynianu, aktywność proteinazowa, produkcja niektórych bakteriocyn, produkcja polimerów węglowodanowych, oporność na bakteriofagi, oporność na metale ciężkie, są kodowane plazmidowo i są opisane w pracach [24, 34–36, 51, 53, 62, 69].

Istnieje stosunkowo dużo informacji naukowych dotyczących niewielkiej grupy prokariota – LAB. Pomimo swojej wyjątkowo wielokrotnej auksotroficzności (chromosomy od ~1,3 do 3,2 Mpz), to dzięki wielkiemu potencjałowi metabolicznemu są dobrodziejstwem dla ludzi i zwierząt, ich kolejne aplikacje biotechnologiczne zadziwiają. Zrozumienie tej grupy bakterii odbywa się także poprzez rozszyfrowywanie zapisów genomowych (sekwencjonowanie kolejnych gatunków). LAB działają głównie poprzez wydzielane do środowiska ich życia produkty metaboliczne pierwotne i wtórne. Warto dodać, że tak ważne biotechnologicznie, nie są istotne ekologicznie w środowiskach dominujących na globie ziemskim – w wodach i na lądach, choć ostatnio mówi się o „morskich bakteriach mlekowych".

Piśmiennictwo

1. Adsul M., Khire J., Bastawde K., Gokhale D.: Production of lactic acid from cellobiose and cellotriose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5055–5057 (2007)
2. Altermann E., Russell W.M., Azcarate-Peril M.A., Barrangou R., Buck B.L., McAuliffe O., Souther N., Dobson A., Duong T., Callanan M., Lick S., Hamrick A., Cano R., Klaenhammer T.R.: Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3906–3912 (2005)

3. Baj i Markiewicz (red.). Biologia molekularna bakterii. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2006
4. Bemardeau M., Vernoux J.P., Dubemet S.H., Gueguen M.: Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 278–285 (2008)
5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Wyd. II. tom III – The Firmicutes. Red. Vos P., Garrity G., Jonem D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B., Wyd. Springer 2009
6. Bielecka M.: Żywność probiotyczna. *Pediatria Współczesna. Gastroenterologia. Hepatologia i Żywienie Dziecka*, **4**, 27–32 (2002)
7. Brasca M., Morandi S., Lodi R., Tamburini A.: Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 1516–1524 (2007)
8. Bustos G., Moldes A.B., Cruz J.M., Domínguez J.M.: Production of fermentable media from vine-trimming wastes and bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*. *J. Sci. Food Agri.* **84**, 2105–2112 (2004)
9. Büyükkilci A.O., Harsa S.: Batch production of L(+)-lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**, 1036–1040 (2004)
10. Casalta E., Montel M.K.: Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 271–273 (2008)
11. Cerning J., Renard C.M.G.C., Thibault J.F., Bouillanne C., Landon M., *Desmazeaud* M., Topisirovic L.: Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG 11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3914–3919 (1994)
12. Chen Y.S.; Yanagida F., Shinohara T.: Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Lett. Appl. Microbiol.* **40**, 195–200 (2005)
13. Claesson M.J., van Sinderen D., O'Toole P.W.: *Lactobacillus* phylogenomics – towards a reclassification of the genus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 2945–2954 (2008)
14. Doco T., Fournet B., Carcano D., Ramos P., Loones A.: Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Carbohydr. Res.* **198**, 313–321 (1990)
15. Drider D., Bekal S., Prévost H.: Genetic organization and expression of citrate permease in lactic acid bacteria. *Gen. Mol. Res.* **3**, 273–281 (2004)
16. Fabijańska M., Siedlecki J., Rekosz-Burlaga H., Górska E., Jankowski W., Gajewska J.: Wyniki odchowu prosiąt na mieszankach bezantybiotykowych stymulatorów wzrostu zastąpionych probiotykami i syntetycznym zeolitem. *Nauka Proizwodstwu. Zootechnija* (Wyd. Akademii Rolniczej w Grodnie) **2**, 231–237 (2001)
17. Fisher K., Phillips C.: The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol.* **155**, 1749–1757 (2009)
18. Frengova G.I., Simova E.D., Beshkova D.M., Simov Z.I.: Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Z. Naturforsch*. **57c**, 805–810 (2002)
19. Fu W., Mathews A.P.: Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Bioch. Eng. J.* **3**, 163–170 (1999)
20. Gajewska J., Fabijańska M., Rekosz-Burlaga H., Siedlecki J., Jankowski W., Górska E.: Charakterystyka tlenowej i beztlenowej mikroflory przewodu pokarmowego prosiąt żywionych mieszankami paszowymi z dodatkiem probiotyków i syntetycznego zeolitu. *Ann. Warsaw Agric. Univ.,* zeszyt specjalny, 230–235 (2001)
21. Gajewska J., Laks M.: Characteristics of faecal *Bifidobacterium* sp. bacteria isolated from patient with colitis ulcerosa diagnosis. Second Eur. Conf. Probiotics and their Applications – EUPROBIO 2008, Cracow, 15–17 October 2008.
22. Gajewska J., Masznicz M., Rekiel A., Batorska M., Pawlicka E., Więcek J.: Skład mikroflory kału prosiąt i tuczników otrzymujących dodatek preparatu probiotycznego i/lub kwasu benzoesowego. *Rocz. Nauk. PTZ,* **4**, 33–41 (2008)
23. Gajewska J., Twardowska A., Woszczyk M., Rekiel A., Batorska M.: Wpływ różnych dodatków paszowych w programach żywienia na skład mikroflory kałowej rosnących świń. *Ekol. Tech.* **16**, 33–37 (2008)
24. Gautier M., Chopin M.C.: Plasmid-determined restriction/modification system and abortive infection in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 923–927 (1987)
25. Ghasemi M., Najafpour G., Rahimnejad M., Beigi P.A., Sedighi M., Hashemiyeh B.: Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *Afric. J. Biotechnol.* **8**, 81–84 (2009)
26. Gruter M., Leelang B.R., Kuiper J., Kamerling J.P., Vliegenhart F.G.: Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk. *Carbohydr. Res.* **231**, 73–291 (1992)
27. Gupta V., Garg R.: Probiotics. *Ind. J. Med. Microbiol.* **27**, 202–209 (2009)
28. Ha M.Y., Kim S.W., Lee Y.W., Kim M.J., Kim S.J.: Kinetics analysis of growth and lactic acid production on pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast extract/corn steep liguor/glucose medium. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 134–140 (2003)
29. Hadadji M., Bensoltane A.: Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat's milk. *Afric. J. Biotechnol.* **5**, 505–509 (2006)
30. Heczko P.B., Strus M., Kochan P.: Projektowanie probiotyków do zastosowań medycznych. *Post. Mikrobiol.* **47**, 431–434 (2008)
31. Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B.: L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **20**, 301–307 (1997)
32. Hornich M., Chrastova V.: The redox potential of the large intestine in swine in relation to swine dysentery. *Vet. Med.* **26**, 593–598 (1981)
33. Hutkins R.W., Nannen N.L.: pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **76**, 2354–2365 (1992)
34. Kaletta C., Entian K.D.: Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* **171**, 1597–1601 (1989)
35. Klaenhamer T.R.: Genetics of bacteriocins produced by lactis acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39–85 (1993)
36. Kok J.: Genetic of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev*. **87**, 15–42 (1990)
37. Kotzanmanidis C. Roukas T., Skaracis G.: Optimization of lactic acid production from beet molasses *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World J. Microbiol. Biotech.* **18**, 442–444 (2002)
38. Kowalski C., Łebkowska B., Pomorska M.: Probiotyki – potencjalna alternatywa dla terapii antybiotykowej. *Magazyn Weterynaryjny* – (Supl. *Świnie*), **6**, 60–66 (2006)
39. Lee D.K., Jang S., Baek E.H., Kim M.J., Lee K.S., Shin H.S., Chung M.J., Kim J.E., Lee K.O., Ha N.J.: Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content. *Lipids Health Dis.* **8**, 21–28 (2009)
40. Libudzisz Z.: Mikroflora jelitowa a probiotyki. *Zakażenia*, **6**, 49–51 (2004)
41. Linko Y.Y., Javanainen P.: Simultaneous liquefaction, saccharification, and lactic acid fermentation on barley starch. *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 118–123 (1996)
42. Makarova K., Mills D., i wsp.: Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 15611–15616 (2006); (praca jest dziełem 49 autorów)

43. Manca de Nadra M.C., Arena M., Saguir F.M.: Nutritional requirements and amino acids utilization by lactic acid bacteria from wine – A short review. *Food, Agri. Environ*. **1**, 76–79 (2003)
44. Manca de Nadra M.C.: Nitrogen metabolism in lactic acid bacteria from fruits: a review. *Com. Cur. Res. Edu. Top. Trends Appl. Microbiol*. 500–510 (2007)
45. Marques S., Santos J.A., Gírio F.M., Roseiro C.: Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioch. Eng. J.* **41**, 210–216 (2008)
46. Marshall V.M., Cowie E.N., Moreton R.S.: Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* LC330. *J. Dairy Res.* **62**, 621–628 (1995)
47. Mayo B., van Sinderen D., Ventura M.: Genome analysis of food grade lactic acid-producing bacteria: from basics to applications. *Curr. Genom*. **9**, 169–183 (2008)
48. Mohamed J.A., Huang D.B.: Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol*. **56**, 1581–1588 (2007)
49. Moldes A.B., Alonso J.L., Parajó J.C.: Strategies to improve the bioconversion of processed wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, 279–284 (2001)
50. Morishita T., Deguchi Y., Yajima M., Sakarai T., Yura S.: Multiple nutritional requirements of *Lactobacilli:* genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J. Bacteriol*. **148**, 64–71 (1981)
51. Nakajima H., Sirota T., Toba T., Ito T., Adach S.: Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495. *Carbohydr. Res*. **224**, 245–253 (1992)
52. Oh H., Wee Y.J., Yun J.S., Han S.H., Jung S., Ryu H.W.: Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Biores. Technol.* **96**, 1492–1498 (2005)
53. Parada J.L., Caron C.R., Medeiros A.B.P., Soccol C.R.: Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification properties and use as biopreservatives. *Bras. Arch. Biol. Technol*. **50**, 521–542 (2007)
54. Piekarska K.: Enterokokki – czynniki wirulencji i chorobotwórczość. *Post. Mikrobiol*. **45**, 195–207 (2006)
55. Reid G.: The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3763–3766 (1999)
56. Rekiel A. Więcek J., Bielecki W., Gajewska J., Cichowicz M., Kulisiewicz J., Batorska M., Roszkowski T., Beyga K.: Effect of addition of feed antibiotic flavomycin or prebiotic BIO-MOS on production results of fatteners, blood biochemical parameters, morphometric indices of intestine and composition of microflora. *Arch. Tierz. Dummerstorf*. **50**, 172–180 (2007)
57. Rekiel A., Gajewska J., Pawlicka E., Masznicz M., Tokarska G.: Charakterystyka enterokokków kałowych izolowanych od prosiąt otrzymujących preparaty Lactiferm lub Biogen. *Med. Wet.* **64**, 1141–1145 (2008)
58. Rekiel A., Gajewska J.: Zmiany mikroflory jelitowej tuczników pod wpływem wybranych czynników żywieniowych. *Med. Wet.* **62**, 925–930 (2006)
59. Richter K., A. Träger A.: L(+)-lactic acid from sweet sorghum by submerged and solid state fermentations. *Acta Biotech.* **14**, 367–378 (1994)
60. Richter K., Berthold C.: Biotechnological conversion of sugar and starchy crops into lactic acid. *J. Agri. Eng. Res.* **71**, 181–191 (1998)
61. Schepers A.W., Thibault J., Lacroix C.: *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part II: Kinetic modeling and model validation. *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 187–194 (2002)
62. Semjonovs P., Jasko J., Auzina L., Zikmanis P.: The use of exopolysaccharide-producing culture of lactis acid bacteria to improve the functional value of fermented food. *J. Food Technol*. **6**, 101–109 (2008)
63. Smit G., Verheul A., van Kranenburg R., Ayad E., Siczen R., Engels I.: Cheese flavour development by enzymatic conversion of peptides and amono acids. *Food Res. Int*. **33**, 153–160 (2000)
64. Stolz P., Boker G., Hammes W.P., Vogel R.F.: Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. I. *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Z. Lebensmittel-Untersuch. Forschung.* **201**, 402–410 (1995)
65. Suskovic J., Kos B., Goreta J., Matosic S.: Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Tech. Biotechnol.* **39**, 227–235 (2001)
66. Tannock G.W.: A special fondness for *Lactobacilli*. *Appl. Environ. Microbiol*. **70**, 3189–3194 (2004)
67. Trachoo N., Boudreaux C.: Therapetic properties of probiotic bacteria. *J. Biol. Sci*. **6**, 202–208 (2006)
68. Vishnu C., Seenayya G., Reddy G: Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 429–433 (2002)
69. Vos W.M., Boeriggter L., van Rooyen R.J., Reiche B., Hengstenberg W.: Characterization of the lactose-specific enzymes of the phosphotranspherase system in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem*. **265**, 22554–22560 (1990)
70. Vuyst L., Degeest B.: Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 15 –177 (1999)
71. Wee Y.J., Kim J.N., Yun J.S., Ryu H.W.: Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme Microb. Technol.* **35**, 568–573 (2004)
72. Wee Y.J., Yun J.S., Park D.H., Ryu H.W.; Biotechnological production of L (+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Biotech. Lett.* **26**, 71–74 (2004)
73. Xiaodong W., Xuan G., Rakshit S.K.: Direct fermentative production of lactic acid on cassava and other starch substrates. *Biotech. Lett.* **19**, 841–843 (1997)
74. Yamamoto Y., Murosaki S., Yamauchi R., Kato K., Sone Y.: Structural study on an exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* TY1-2. *Carbohydr. Res.* **261**, 67–78 (1994)
75. Yáńez R., Alonso J.L., Parajó J.C.: D-lactic acid production from waste cardboard. *J. Chem. Tech. Biotechnol*. **80**, 76–84 (2005)
76. Yáńez R., Moldes A.B., Alonso J.L., Parajó J.C.: Production of D (–)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. *Biotechnol. Lett*. **25,** 1161–1164 (2003)
77. Yun R.,Wee A.B.,Kim J.N., Ryu H.W.: Fermentative production of DL-lactic acid from amylase-treated rice and wheat brans hydrolyzate by a novel lactic acid bacterium, *Lactobacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* **26**, 1613–1616 (2004)
78. Zannini E., Santarelli S., Osimani A., Della'Aquila L., Clementii F.: Effects of parameters process on the production of lactic acid bacteria in batch fermentation. *Ann. Microbiol.* **55**, 273–278 (2005)

POST. MIKROBIOL.,
2012, 51, 1, 67–74
http://www.pm.microbiology.pl

NOWOCZESNE TECHNIKI MIKROSKOPOWE I BIOLOGII MOLEKULARNEJ W OCENIE GRANULOWANANEJ BIOMASY

Beata Kończak[1]*, Jagna Karcz[2], Korneliusz Miksch[1]

[1] Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska, Gliwice
[2] Pracownia Mikroskopii Skaningowej, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski, Katowice

Wpłynęło w maju 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Polimery zewnątrzkomórkowe. 2.1. Charakterystyka EPS z wykorzystaniem nowoczesnych technik mikroskopowych. 2.2. Analiza składu białek zewnątrzkomórkowych z wykorzystaniem techniki SDS-PAGE. 3. Charakterystyka granul. 3.1. Charakterystyka kanałów i porów z wykorzystaniem techniki CLSM. 3.2. Dystrybucja mikro-populacji w granuli z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. 3.3. Dystrybucja mikro-populacji w granuli z wykorzystaniem techniki PCR-DGGE. 4. Podsumowanie

New microscopic and molecular biology techniques in the evaluation of granular biomass

Abstract: The aerobic granular activated sludge process is a promising technology for compact wastewater treatment plants. This system is superior to conventional activated sludge processes in terms of high biomass retention, high conversion capacity, less biomass production, excellent settleabilty and resistance to inhibitory and toxic compounds. The majority of research on granular sludge has focused on optimization of engineering aspects related to reactor operation with little emphasis on fundamental microbiology. The combination of physico-chemical characteristics of granular sludge and the new microbiological methods may provide conceptual information benefiting start-up procedures for full-scale granular-sludge reactors. This article presents a short review of microbiological fingerprinting techniques such as denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE), SDS-PAGE or fluorescence in situ hybridization (FISH) and other techniques such as transmission and scanning electron microscopy (TEM, SEM) or confocal microscopy (CLSM) to give additional information about the structure and bacterial composition of granules.

1. Introduction. 2. Extracellular polymeric substances. 2.1. Characterization of EPS by new microscopic techniques. 2.2. Analysis of exoprotein composition by SDS-PAGE technique. 3. Characterization of granules. 3.1. Characterization of canales and pores by CLSM. 3.2. Distribution of micro-population in granule by fluorescent microscopy. 3.3. Distribution of micro-population in granule by PCR-DGGE technique. 4. Summary

Słowa kluczowe: tlenowe granule, polimery zewnątrzkomórkowe, SDS-PAGE, FISH, PCR
Key words: aerobic granule, extracellular polymeric substances, SDS-PAGE, FISH, PCR

1. Wprowadzenie

Najpopularniejszym i stosowanym na szeroką skalę sposobem oczyszczania ścieków jest metoda osadu czynnego. Osad czynny stanowi skupisko różnych grup bakterii zooglealnych, bakterii nitkowatych, grzybów, glonów i pierwotniaków. Mikroorganizmy te tworzą małe kłaczki o średnicy 50–300 μm [7, 8, 34]. W reaktorach, w których osad czynny poddany jest działaniu dużych sił hydrodynamicznych, małe agregaty łączą się ze sobą i tworzą granule o sferycznym lub elipsoidalnym kształcie, a ich średnica wynosi wtedy od 0,2 mm do 20 mm. Pierwsze wzmianki o beztlenowych granulach formujących się w reaktorze UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) pojawiły się w latach 80-tych [20]. Obecnie trwają badania nad technologią granulowanego osadu w warunkach tlenowych [17, 21, 37]. Granule o kompaktowej, gęstej strukturze, dużej bioróżnorodności oraz o doskonałych właściwościach sedymentacyjnych wykorzystuje się do oczyszczania ścieków zarówno o niskim, jak i wysokim obciążeniu ładunkiem zanieczyszczeń, usuwania związków azotu i fosforu, a także toksycznych substancji.

Zaletą procesów wykorzystujących granulowany osad czynny jest przede wszystkim zmniejszenie wymiarów reaktorów, w których prowadzone są procesy. Dodatkowo zwiększa się czas retencji i stopień koncentracji biomasy w układzie, a poprzez to następuje poprawa efektów oczyszczania ścieków. Granule osadu czynnego formują się w obecności różnorodnych substratów, takich jak np. glukoza, skrobia, octan sodu, etanol, metanol, fenol, fruktoza, maltoza oraz przy zapewnieniu odpowiednich warunków, takich jak wysokie stężenie tlenu rozpuszczonego, krótki czas sedymentacji, warunki „uczta/głód", działanie sił hydrodynamicznych, wysokie obciążenie ładunkiem zanieczyszczeń [24]. Dokładny

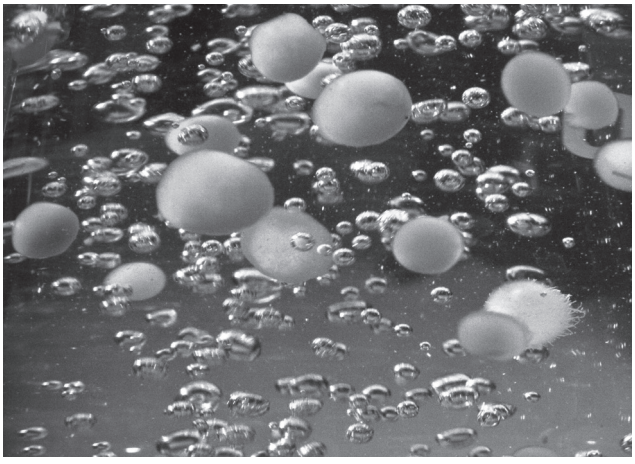
* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Śląska, ul. Akademicka 2, 44-100 Gliwice; tel.: (032) 237 26 94; e-mail: beata.konczak@polsl.pl

mechanizm granulacji osadu nie został jeszcze poznany i wymaga dalszych badań, tak aby z sukcesem udało się pozyskać granule w pełnowymiarowych reaktorach. W piśmiennictwie odnajdujemy wiele informacji na temat właściwości fizykochemicznych granul, oceny skuteczności usuwania związków węgla, azotu i fosforu. Jednakże, aby móc dokładnie zdefiniować mechanizm formowania granul, konieczne jest poznanie interakcji pomiędzy grupami mikroorganizmów egzystującymi w granuli, poznanie mechanizmu ich adaptacji do życia w warunkach stresowych oraz opisanie relacji pomiędzy strukturą granul a kompozycją ścieków, warunkami pracy reaktora czy jego konfiguracją. Uformowanie granul osadu o zwartej, jednorodnej strukturze, które będą zachowywały długo swoją stabilność, niezależnie od obciążenia reaktora ładunkiem zanieczyszczeń biogennych czy obecności substancji toksycznych w dopływających ściekach, stanowi wyzwanie dla badaczy.

W ciągu ostatnich 10 lat badania skupione były na ocenie populacji mikroorganizmów występujących w granuli, a także dystrybucji polimerów zewnątrzkomórkowych, kanałów i porów w strukturach granuli. Oceny mikrostruktury dokonuje się z wykorzystaniem najnowocześniejszych technik mikroskopowych, takich jak mikroskopia fluorescencyjna z wykorzystaniem hybrydyzacji *in situ* (FISH – fluorescent *in situ* hybridization), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM – transmission electron microscopy), skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM – scanning electron microscopy), mikroskopia konfokalna (CLSM – confocal laser scanning microscopy), a także nowoczesnych technik biologii molekularnej, takich jak technika PCR-DGGE, analiza białek z wykorzystaniem techniki SDS-PAGE [1, 12, 13, 22, 32]. W artykule zgromadzono najważniejsze informacje dotyczące budowy granul tlenowych w mikro skali. Zebranie i usystematyzowanie wiedzy na temat struktury granul w odniesieniu do warunków, w jakich zostają uformowane jest niezwykle praktyczną wskazówką dla przyszłych badaczy. Wskazuje, w jakim kierunku powinny być prowadzone dalsze badania, pozwala też lepiej zrozumieć istotę i mechanizm procesu formowania granul.

2. Charakterystyka polimerów zewnątrzkomórkowych

Polimery zewnątrzkomórkowe – EPS (Extracellular Polymeric Substances) są to substancje wydzielane przez mikroorganizmy, produkowane podczas lizy komórki bądź adsorbowane z pożywki i akumulowane na powierzchni komórki, do których zaliczamy różnorodne związki organiczne, takie jak egzopolisacharydy (PS), egzoproteiny (PN), DNA, kwasy humusowe, kwasy uronowe itp. Odgrywają one bardzo ważną rolę w procesie granulacji [35].



Rys 1. Tlenowe granule osadu czynnego. (Fot. B. Kończak)

Wydzielanie polimerów zewnątrzkomórkowych jest powszechnie spotykane w przyrodzie. Dla większości mikroorganizmów jest strategią życiową. I tak na przykład bakterie płytki nazębnej intensywnie produkcją polimery zewnątrzkomórkowe i tworzą warstwę biofilmu, która pomaga im przyczepić się do powierzchni zęba, długo na niej utrzymać, a dodatkowo zapewnia im ochronę przed siłami mechanicznymi.

Granule są bardzo dynamicznym i aktywnym układem, poddanym silnemu oddziaływaniu sił hydrodynamicznych (rys. 1). Szansę przetrwania mają tylko mikroorganizmy o silnych właściwościach adhezyjnych i mających zdolność wydzielania polimerów zewnątrzkomórkowych [23, 33]. Macierz EPS pokrywająca powierzchnię granuli stanowi materiał, do którego przyczepiają się cząstki, komórki bądź małe agregaty komórek, a zarazem pomaga w utrzymywaniu integralności struktur granul. Polimery zewnątrzkomórkowe tworzą kapsułki, które otaczają i zamykają skupiska komórek w granuli osadu. Mogą one też pokrywać ciała orzęsek, bądź też formować macierz wokół kolonii bakterii.

Dzięki otoczce utworzonej z EPS możliwe jest koegzystowanie koło siebie różnych typów mikroorganizmów, nawet, gdy jedne z nich produkują substancje toksyczne dla innych. I tak na przykład, w środowisku naturalnym kolonie bakterii *Acinetobacter* sp. uniemożliwiają rozwój bakterii *Bacillus sphaericus*, natomiast w granuli obserwuje się wzrost tychże populacji w niewielkiej odległości od siebie. Jest to możliwe dzięki produkcji EPS, które tworzą ochronną przestrzeń dla każdej z kolonii mikroorganizmów i efektywnie adsorbują substancje toksyczne [2].

2.1. Wizualizacja i ocena struktury EPS za pomocą nowoczesnych technik mikroskopowych

Wizualizowanie i ocena struktury EPS za pomocą konwencjonalnego mikroskopu świetlnego jest praktycznie niemożliwe. Stąd też w ostatnich latach coraz

więcej uwagi poświęca się technikom mikroskopii elektronowej oraz konfokalnej.

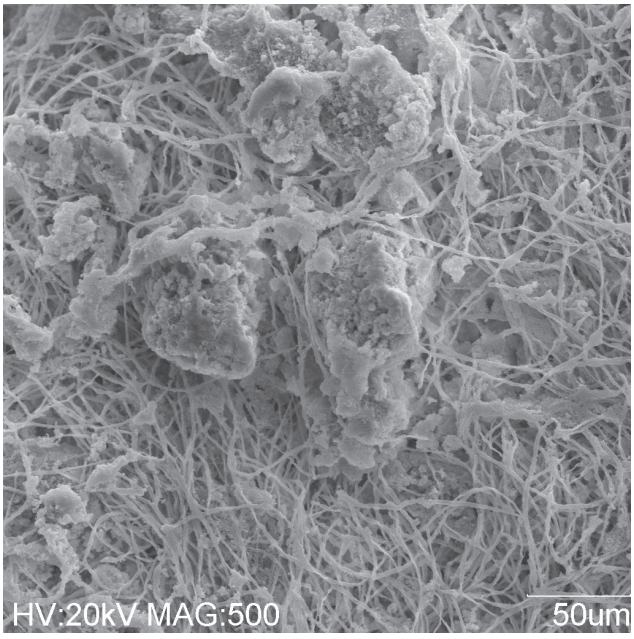
W mikroskopie elektronowym światło widzialne zastąpione jest przez wiązkę elektronów, dzięki czemu można badać strukturę polimerów zewnątrzkomórkowych już na poziomie atomowym. W praktyce wykorzystuje się trzy rodzaje mikroskopów:

- TEM – transmisyjny mikroskop elektronowy,
- SEM – skaningowy mikroskop elektronowy,
- ESEM – środowiskowy skaningowy mikroskop elektronowy.

Mikroskopia elektronowa z uwagi na wysoką próżnię panującą w komorze mikroskopu wymaga specjalnego przygotowania preparatu. W mikroskopie transmisyjnym typowa procedura obejmuje: utrwalanie, odwadnianie, nasycenie obiektu żywicą syntetyczną i jej polimeryzację, pocięcie bloku żywicy na ultracienkie skrawki (poniżej 0,1 μm) oraz barwienie skrawków solami metali ciężkich. Technika ta umożliwia szczegółowe obserwacje na poziomie makrocząsteczkowym elementów struktury obiektu biologicznego, np. komórki bakterii, różniące się powinowactwem do jonów metali ciężkich, a uzyskany obraz tych struktur jest „płaski", dwuwymiarowy [18].

W przeciwieństwie do TEM preparaty biologiczne badane w mikroskopie elektronowym typu SEM mogą być różnej grubości, a wiązka elektronów skanując powierzchnię analizowanego preparatu uwalnia z niej sygnały elektronowe, które następnie po przetworzeniu dają trójwymiarowy obraz próbki. Ponadto preparaty oprócz utrwalania i odwadniania muszą być wysuszone, w przeciwnym razie umieszczone w próżni mogą stać się źródłem par i spowodować uszkodzenie mikroskopu. Suszenie odbywa się poprzez technikę liofilizacji bądź technikę suszenia w punkcie krytycznym, która pozwala wysuszyć materiał biologiczny bez jego deformacji. Niestety próbki przed suszeniem muszą zostać utrwalone w glutaraldehydzie, który może powodować zmianę struktury EPS i być źródłem niepożądanych artefaktów. Aby tego uniknąć stosuje się stabilizację glikokaliksu poprzez użycie przeciwciał, czy lecytyny, a także barwienie EPS za pomocą barwników zawierających czerwień rutenu, dzięki czemu można wizualizować materiał fibrylarny leżący pomiędzy komórkami [30, 36]. Natomiast nowoczesny mikroskop elektronowy ESEM może pracować przy wyższym ciśnieniu (sięgającym ciśnienia pary nasyconej wody w temp. 20°C), w obecności gazu w komorze obserwacyjnej, dzięki czemu możliwe jest badanie materiałów mokrych i oleistych. Preparaty biologiczne wizualizowane za pomocą ESEM nie wymagają uprzedniego przygotowania próbek ani napylania ich cząsteczkami złota [39].

Nowe techniki badawcze, takie jak SEM czy TEM, pozwoliły nie tylko na stwierdzenie, iż w obrębie granuli występują różnorodne typy morfologiczne bakterii (pałeczki lub ziarenkowce), ale także na określenie dystansu pomiędzy nimi. Okazało się, iż w każdym agregacie utworzonym przez odmienne populacje bakteryjne ten dystans jest inny. W agregatach o gęsto upakowanych komórkach, ilość EPS jest mniejsza niż w agregatach utworzonych z luźno rozrzuconych komórek [19]. Ponadto udało się stwierdzić, iż w centralnej części granuli, znajdują się gęsto upakowane komórki bakteryjne i polimery zewnątrzkomórkowe, natomiast w warstwach zewnętrznych ilość komórek, jak i polimerów zewnątrzkomórkowych jest mniejsza, co z kolei ułatwia dyfuzję oraz transport masy i tlenu rozpuszczonego do głębszych warstw [27, 34].



Rys. 2. Różnorodność form fibrylarnych EPS. SEM (Fot. J. Karcz)

L e m e r i e i wsp. [19], zwracają uwagę, iż kształt komórek bakteryjnych w centralnej części granuli jest nieregularny, co sugeruje, iż są to martwe komórki. Włókna utworzone z EPS prezentują różnorodność kształtów, deseni, które uwidaczniają się podczas obserwacji za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego, a wynikają z różnorodnej chemicznej kompozycji EPS (rys. 2).

Nowy pogląd na temat polimerów zewnątrzkomórkowych przyniosła technika mikroskopii konfokalnej CLSM (confocal laser scanning microscopy), stanowiąca odmianę mikroskopii świetlnej, charakteryzującej się dużą rozdzielczością i kontrastem. Dzięki tej technice udało się zidentyfikować i określić dystrybucję międzykomórkowych EPS. M c S w a i n i wsp. [23] podają, iż kompozycja i stężenie EPS zmienia się wraz z głębokością warstwy. W technice CLSM świeże, uwodnione granule wybarwia się stosując barwniki zawierające odpowiedni fluorochrom, który wiąże się z reaktywnymi grupami. Do najpopularniejszych zaliczamy:

- Fluoresceina (FITC) (488 nm/500–550 nm)* – barwnik reagujący z grupami aminowymi, służący do wybarwiania wszystkich białek i aminocukrów [3];
- Konkanawalina A (conA) (561/570–590 nm)* – służy do wybarwiania α-mannopiranozy i α-glukopiranozy (polisachrydy) [25];
- Biały kalkofluor (CW) (347/450 nm)* – wybarwia ściany komórkowe bakterii i grzybów [15];
- Grupa barwników SYTO – wybarwianie kwasów nukleinowych oraz znakowanie żywych i martwych komórek, dzięki wykorzystaniu różnicy w przepuszczalności błon komórkowych; najczęściej stosuje się SYTO63 (633/650–700 nm)* i Syto Blue (458/460–480 nm)* [3];
- Czerwień Nilu (514/625–700 nm)* – wybarwianie lipidów [14].

Badania techniką mikroskopii konfokalnej wykazały, iż zewnętrzne warstwy granul utworzone są przede wszystkim z żywych komórek, „sklejonych" ze sobą za pomocą α- i β-D-glukopiranozy (polisacharydy) i chronione są warstwą lipidów. Natomiast białka rozproszone są w całej objętości, przy czym ich największa ilość znajduje się w centrum granuli [1, 9, 23]. Chen i wsp. [9] i Adav i wsp. [1], zwracają uwagę no to, iż centrum granuli utworzone jest przede wszystkim z martwych komórek, zatem obecne tam białka, to najprawdopodobniej polimery wewnątrzkomórkowe, uwolnione w wyniku lizy komórek. W centrum granuli penetracja substratu i tlenu jest utrudniona, uwolnione białka mogą więc stanowić źródło substancji odżywczych dla żywych i aktywnych mikroorganizmów z tej strefy.

2.2. Analiza składu białek zewnątrzkomórkowych z wykorzystaniem techniki SDS-PAGE

Jak wspomniano powyżej, białka są istotnym komponentem granul, dla tego wielu badaczy podejmuje się prób analizy jakościowej białek współtworzących macierz EPS. W tym celu wykorzystuje się najczęściej technikę SDS-PAGE. Jest to jedna z metod elektroforezy polegająca na rozdzielaniu białek w żelu poliakrylamidowym w obecności dodecylosiarczanu sodu (SDS). SDS jest związkiem denaturującym i opłaszczającym białko. W wyniku jego działania wszystkie białka nabierają charakteru liniowego, posiadają ładunek ujemny i mogą swobodnie migrować w żelu, przy czym szybkość ich migracji zależy od masy cząsteczkowej białka. Po wybarwieniu żelu, uzyskane prążki porównuje się ze wzorcem, dzięki czemu można wyznaczyć masę cząsteczkową analizowanych białek [26]. Badacze podają, iż egzoproteiny występujące w macierzy EPS mają masę cząsteczkową rzędu 31–97,4 kDa. W wyniku analizy profilu białek w żelu, Feng i wsp. [12] stwierdzili, iż ilość białek wzrasta wraz z procesem granulacji, często też pojawiają się nowe prążki, które świadczą o tym, iż mikroorganizmy syntetyzują nowe białka podczas łączenia się w agregaty. Istnieje także korelacja pomiędzy ilością zewnątrzkomórkowych białek a hydrofobowością komórek. Stwierdzono, iż wraz z procesem granulacji rośnie ilość wydzielanych białek, wzrasta hydrofobowość, maleje natomiast ładunek powierzchniowy.

* (eksytacja/emisja)

3. Charakterystyka granul

3.2. Struktura granul

Tlenowe granule charakteryzuje heterogenna budowa, a każda granula składa się z kilku małych agregatów ułożonych radialnie bądź w postaci koncentrycznych warstw. W większych granulach obserwuje się obecność mikrogranul w obrębie jednej, dużej granuli [11, 23, 31].

Warstwowa i heterogenna budowa granuli jest wynikiem ograniczonej dyfuzji substratów i tlenu do wnętrza granuli. Środowisko chemiczne w granuli często zmienia się diametralnie wraz z głębokością. Substancje biogenne występujące w cieczy otaczającej są konsumowane przez mikroorganizmy z warstw zewnętrznych i ich stężenie maleje wraz z głębokością. Z drugiej strony wzrasta stężenie produktów metabolicznych, które akumulowane są we wnętrzu granuli. Zatem, ograniczona dyfuzja wywołuje poziomy bądź odwrotny gradient substancji i generuje zmienność mikroorganizmów w granuli, które dostosowują się do lokalnych warunków. Najlepszym tego przykładem jest ograniczona dyfuzja tlenu. Tlen konsumowany jest szybko w powierzchniowych warstwach granuli (do 100 μm głębokości) przez mikroorganizmy wykazujące tlenowy metabolizm i utleniające azot amonowy do azotynów. Natomiast w głębszych warstwach powstają warunki odpowiednie do rozwoju, mikroorganizmów utleniających azotyny do azotanów [4, 10]. W centrum granuli, gdzie dyfuzja tlenu jest ograniczona, azotany redukowane są do wolnego azotu.

Agregaty bakterii utleniających azot amonowy są wydłużone radialnie, co związane jest z krokową dyfuzją tlenu do wnętrza granuli, a także z odwrotnym gradientem azotu amonowego uwalnianego z głębokich warstw utworzonych z martwych komórek. Radialne wydłużanie agregatów jest też strategią przeżyciową, ponieważ posiadają one wtedy wysoki stosunek powierzchni do wysokości, co znacznie poprawia transfer substratu. Grubość warstwy aktywnej w dużej mierze zależy od koncentracji substancji biogennych w cieczy oraz aktywności metabolicznej mikroorganizmów. Kiedy występuje nadmiar substancji odżywczych, penetrują w głąb i warstwa aktywna jest wtedy cieńsza. Natomiast, gdy substancji odżywczych jest mniej, przeciwnie są one szybko zużywane i wtedy warstwa aktywnych mikroorganizmów jest relatywnie grubsza.

Tabela I

Charakterystyka poszczególnych warstw granuli [1, 16, 23, 24, 32, 33]

Warstwa	Średnia głębokość warstwy od powierzchni granuli i jej grubość	Rola w granuli, informacje dodatkowe
Warstwa utworzona z agregatów bakterii utleniających azot amonowy	70 μm (głębokość), 20 μm (grubość)	Najaktywniejsza warstwa, której grubość zależy od ilości tlenu i stopnia jego dyfuzji.
Fakultatywne bakterie beztlenowe	Koncentracja wzrasta, aż osiąga maksymalną wartość na głębokości 450 μm i aż do 850 μm utrzymuje stałą wartość	Przeprowadzają procesy tlenowego i beztlenowego utleniania zanieczyszczeń.
Obligatoryjne bakterie beztlenowe (*Bacteroides sp.*)	850μm (głębokość), 150μm (grubość)	Odpowiedzialne za beztlenowe procesy rozkładu zanieczyszczeń.
Białka	Rozproszone w całej objętości granuli	Są źródłem substancji zapasowych dla mikroorganizmów z głębszych warstw.
Polisacharydy	Występują w całej objętości, przy czy największe stężenie polisacharydów występuje tuż przy powierzchni	Stanowią szkielet granuli. Mogą utrudniać dyfuzję substratu w głąb granuli.
Kora utworzona z martwych komórek w centrum granuli	Głębokość 1000 μm. Grubość zależy od średnicy granuli	Dostarczają monomerów i wolnego azotu do warstw zewnętrznych.

W każdej granuli wyróżnić możemy dwie strefy: korę oraz obrzeże. Luźna warstwa zewnętrzna utworzona jest w głównej mierze przez bakterie, orzęski osiadłe i grzyby. Ta część granuli jest najbardziej dynamicznym i aktywnym układem poddanym silnemu oddziaływaniu sił hydrodynamicznych. W granulach o kompaktowej i zwartej strukturze, w powierzchniowych warstwach obserwuje się tylko grzyby i orzęski. Kora utworzona jest przez gęsto upakowane komórki bakteryjne i polimery zewnątrzkomórkowe [27, 34].

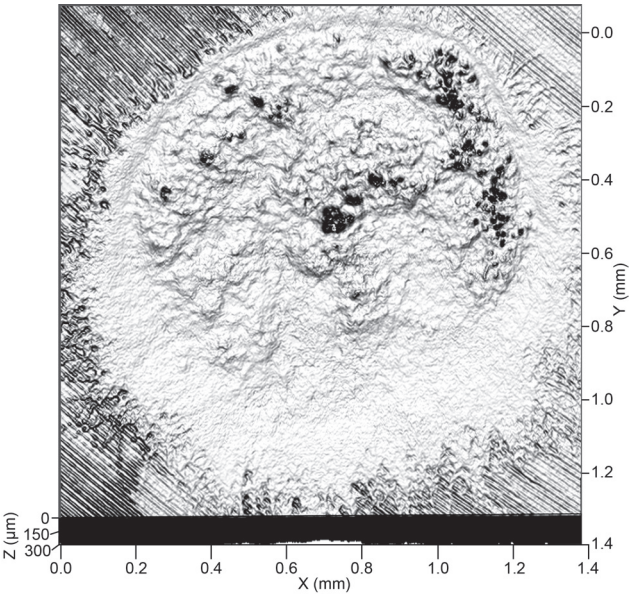
3.1. Wizualizacja kanałów i porów z wykorzystaniem techniki CLSM

Kanały i pory obserwowano w granulach kultywowanych na pożywce z dodatkiem octanu sodu [38]. Tworzą one w granuli sieć, która uczestniczy w transporcie substratów i metabolitów. Lemaire i wsp. [19] podają, iż w dużych granulach występuje duży por, połączony systemem kanalików z warstwami zewnętrznymi (rys. 3). Ponadto informują, iż duże granule o zbitej strukturze z czasem rozpadają się i tworzą się z nich nowe granule.

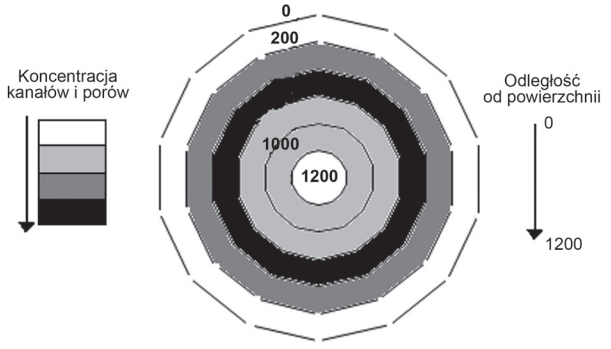
Kanały często wypełnione są polimerami zewnątrzkomórkowymi, a transport w nich przypomina transport wód podziemnych, które cyrkulują wolnymi przestrzeniami i porami występującymi w glebie. W tym typie kanałów nie występują mikro-agregaty, ze względu na stały przepływ cieczy w kanałach, który uniemożliwia adhezję i powoduje wymywanie cząstek. W sytuacji, gdy kanały nie są wypełnione polimerami zewnątrzkomórkowymi, transport przypomina ruch wód śródlądowych, który nie jest prawie niczym ograniczony. Ten typ kanałów najczęściej ulokowany jest pomiędzy dwoma agregatami o kształcie przypominającym „kalafiorową różyczkę".

Zheng i wsp. [38] badali techniką mikroskopii konfokalnej dystrybucję kanałów i porów o średnicy większej niż 0,1 μm z użyciem TetraSpec Fluorescent Microsphere Standards (Molecular Probes, OR, USA). Wykazali oni pozytywną relację pomiędzy aktywnością granul a obecnością porów. Wykazali też, iż ilość porów maleje wraz ze wzrostem średnicy granul. Najprawdopodobniej jest to wynikiem zablokowania porów przez polimery zewnątrzkomórkowe. Mniejsza ilość wolnych porów wpływa na ograniczony transport substancji biogennych do wnętrza, a to z kolei wpływa na mniejszą aktywność mikroorganizmów tej strefy.

Jak podają Ivanow i wsp. [16] grubość warstwy porów koreluje ze średnicą granuli. Jako przykład podają,



Rys. 3. Dystrybucja kanałów i porów w tlenowej granuli. CLSM (ultraskrawek o grubości 300 μm). (Fot. B. Kończak)



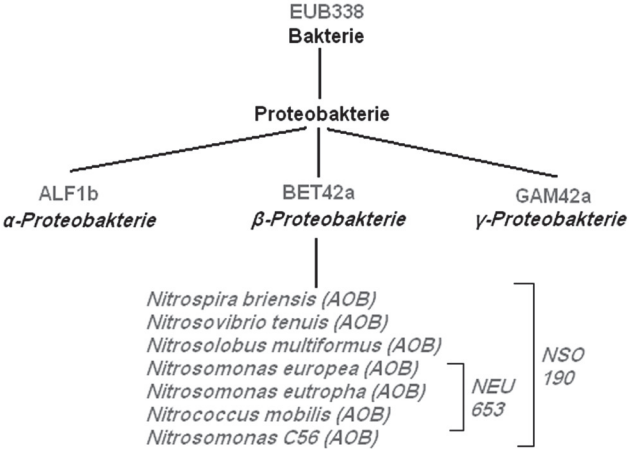
Rys. 4. Rozkład kanałów i porów w granuli o średnicy 1200 μm

iż w granuli o średnicy 1000 μm, grubość warstwy porów sięga 350 μm. Natomiast w granuli o średnicy 550 μm, grubość ta wynosi 250 μm. W granuli, której średnica wynosi 1200 μm rozkład porów i kanałów prezentuje się tak jak przedstawia to rys. 4.

Pory i kanały penetrują granule aż do głębokości 900 μm. Największa ich koncentracja występuje w obszarze 300–500 μm od powierzchni granuli. Zaznaczają także, iż w przypadku dużych granul nie obserwuje się penetracji cząstek o średnicy większej niż 0,1 μm do centralnych warstw granuli.

3.2. Dystrybucja mikro-populacji w granuli z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej

Dystrybucję żywych i martwych populacji w granuli bada się z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych SYTO63 i Baclight Live-Dead Staining Kit. Zarówno w centrum, jak i na powierzchni obserwuje się komórki zamknięte w macierzy utworzonej z EPS. Żywe komórki występujące w powierzchniowych warstwach mają gładką powierzchnię i kolisty kształt, natomiast martwe komórki występujące w centrum charakteryzuje nieregularny kształt [19]. Podczas oceny składu populacji granulowanego osadu często wykorzystuje się mikroskopię fluorescencyjną i cytogenetyczną technikę



Rys. 5. Sondy używane w badaniach granulowanego osadu czynnego

hybrydyzacji *in situ* służącą do wykrywania w badanym materiale genetycznym określonej sekwencji DNA za pomocą fluorescencyjnych sond DNA.

Dzięki mikroskopii fluorescencyjnej można określić dystrybucję poszczególnych grup mikroorganizmów w granuli. W badaniu tym wykorzystuje się podstawowe sondy, takie jak ALF1b, BET42a, GAM42a, które pozwalają na określenie rozmieszczenia w granuli mikroorganizmów należących do klas: Alfa, Beta i Gamma proteobakterii. Sondy te używa się w połączeniu z EUB338I. Jak podają Figueroa i wsp. [13] większość bakterii, współtworzących mikro-populacje w granuli należy do klasy β-proteobakterie. Pozostałe należą do klasy γ- i większość z nich to mikroorganizmy nitkowate. Ze względu na to, iż granule osadu czynnego mogą być wykorzystane do oczyszczania ścieków ze związków azotu, bardzo często wykonuje się badania, mające na celu określenie dystrybucji bakterii nitryfikacyjnych w granuli. W tym celu najczęściej używamy sond NEU653 oraz NSO190. Badania Figueroa i wsp. [13] wykazały dominację bakterii heterotroficznych w granuli i tylko niewielki udział bakterii nitryfikacyjnych z rodzaju *Nitrosomonas* (sonda NEU653).

Podobne wyniki badań zaprezentowała Arrojo i wsp. [5], którzy podają, iż większość bakterii należy do bakterii amonifikacyjnych. Populacje bakterii nitryfikacyjnych występowały rzadziej i przede wszystkim były to bakterie z rodzaju *Nitrospira* i *Nitrobacter.*

Badania z wykorzystaniem techniki FISH wciąż wymagają ustalenia jednoznacznej procedury. Jak do tej pory nie udało się ustalić optymalnego czasu inkubacji prób z sondami, z reguły wynosił on od 5 do 30 min. Ze względu na ograniczoną dyfuzję substratu, czas inkubacji powinien być dobrany zgodnie ze średnicą granul [9, 23].

3.2. Dystrybucja mikro-populacji w granuli z wykorzystaniem techniki PCR-DGGE

Badania populacji współtworzących granulę z wykorzystaniem tradycyjnych metod posiewowych są nieużyteczne ze względu na wolne tempo wzrostu, zwłaszcza bakterii nitryfikacyjnych. Rozwiązanie tych problemów przyniosła technika PCR-DGGE. Technika PCR polega na amplifikacji badanej sekwencji DNA przy użyciu pary oligonukleotydowych starterów, z których każdy jest komplementarny do jednego końca sekwencji docelowej DNA. Startery te są wydłużane w kierunku przeciwnym, za pomocą termostabilnej polimerazy DNA, w cyklu, który obejmuje trzy podstawowe etapy:

- denaturacja dwuniciowej matrycy – 90–95°C,
- wiązanie starterów do jednoniciowej matrycy 50–65°C,
- synteza nici komplementarnej 68–72°C.

Wizualizacji produktów PCR dokonuje się poprzez rozdział elektroforetyczny z wykorzystaniem m.in. elek-

troforezy w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE). Cząsteczki DNA umieszczone w żelu migrują w polu elektrycznym od ujemnie do dodatnie naładowanej elektrody, a ich szybkość zależy od wielkości cząsteczki. Następnie prążki wybarwia się bromkiem etydyny i stają się one widoczne po naświetleniu światłem UV [26].

Technikę PCR-DGGE wykorzystuje się między innymi w celu określenia populacji dominujących w tlenowych granulach w zależności od warunków prowadzenia procesu [28, 29]. Wykonuje się też analizy ilości i bioróżnorodności populacji bakterii z grupy Alfa, Beta proteobakterii, a także bakterii utleniających azot amonowy (AOB) czy bakterii nitryfikacyjnych podczas rozruchu i normalnej pracy reaktorów biologicznych z klasycznym osadem czynnym oraz granulowaną biomasą [32]. Badania Baek i in. [6] wykazały, iż technika PCR-DGEE może być wykorzystana w monitoringu populacji bakterii utleniających azot amonowy w oczyszczalniach ścieków.

4. Podsumowanie

W ostatniej dekadzie wiele pionierskich badań poświęconych jest formowaniu tlenowych granul. Głównym zainteresowaniem cieszą się badania charakteryzujące fizykochemiczne właściwości granul, takie jak rozmiar, hydrofobowość, ładunek powierzchniowy, gęstość, morfologia. Pomimo, iż na całym świecie wzrasta bardzo szybko liczba publikacji skupiających się wokół tematu granulowanego osadu czynnego, wciąż nieznanych jest wiele aspektów związanych z formowaniem granul. Dalsze badania powinny dać odpowiedź na wiele nurtujących pytań, takich jak: skąd wynika utrata stabilności granul i jak ją poprawić, jaki jest skład mikropopulacji współtworzących granule, jakie znaczenie mają polimery zewnątrzkomórkowe, a zwłaszcza międzykomórkowe, czy występuje zmienność ilości i kompozycji EPS w trakcie formowania granul. Odpowiedzi na te pytania należy szukać w oparciu o fundamentalne badania mikrobiologiczne. Połączenie fizykochemicznych metod z nowoczesnych technikami mikroskopii (SEM, TEM, ESEM) i biologii molekularnej (FISH, PCR-DGGE, SDS-PAGE) pozwoli na uzyskanie pełnego obrazu na temat charakterystyki granul i może być źródłem niezbędnych informacji do projektowania reaktorów w pełnej skali, a następnie do ich rozruchu.

Praca finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr N N523 453936)

Piśmiennictwo

1. Adav S.S., Lee D.-J., Tay J.-H.: Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Wat. Res.* **42**, 1644–1650 (2008)
2. Adav S.S., Lee D.-L., Lai J.H.: Aerobic granules with inhibitory strains and role of extracellular polymeric substances. *J. Hazardous Materials,* **174**, 24–428 (2010)
3. Adav S.S., Lin J., Yang Z.,Whiteley Ch.G., Lee D.J., Peng X.F., Zhang Z.P.: Stereological assessment of extracellular polymeric substances, exo-enzymes, and specific bacterial strains in bioaggregates using fluorescence experiments. *Biotechnology Advances*, **28**, 255–280 (2010)
4. Ahn J., Daidau T., Tsenuda S., Hirata A.: Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *Wat. Res.* **36**, 403–412 (2002)
5. Arrojo B.: Advanced systems for biological treatment of high nitrogen-loaded wastewater, Praca doktorska, Uniwersytet Santiago de Compostela, 2007, s. 16–20
6. Baek K., Park C., Oh H.M, Yoon B.D., Kim HS.: Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge treating different types of wastewater. *J. Microbiol Biotechnol*, **20**, 1128–1133 (2010)
7. Burdman S., Jurkevitch E., Diaz M., Gil-Serrano A., Okon Y.: Extracellular polysaccharide composition of Azospirillum brasilense and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 259–264 (2000)
8. Burdamn S., Okon Y., Jurkevitch E.: Surface characteristics of Azospirillum brasilense in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Crit. Rev. Microbiol.* **26**, 91–110 (2000)
9. Chen M.Y., Lee D.J., Tay J.H.: Distributions of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Granules. *Appl. Microbiol. Biot.* **73**, 1463–1469 (2007)
10. De Beer D., Stoodley P., Roe F., Lewadowski Z.: Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 1131–1138 (1994)
11. Felipe M.O., Juan L., Ramón M., Flor C.L., Jorge G.: Role of exopolymeric protein on the settleability of nitrifying sludges. *Bioresource Technol.* **94**, 43–48 (2004)
12. Feng X., Zhuc N., Chen J.: Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology*, **41**, 551–557 (2007)
13. Figueroa, M., Alonso J., Campos, J.L., Méndez Pampín R.J., Mosquera A.: Identificación de microorganismos implicados en la eliminación de nitrógeno en sistemas de tratamiento de aguas residuales mediante técnicas de biología molecular. *Tecnologia del Agua*, **317**, 44–53 (2010)
14. Fowler S.D., Greenspan P.: Application of Nile Red, a Fluorescent Hydrophobic Probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparision with Oil Red. *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 833–836 (1985)
15. Hoch H.C., Galvani C.D., Szarowski D.H., Turner J.N.: Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. *Mycologia*, **97**, 580–588 (2005)
16. Ivanov V., Tay J.-H., Tay S.T.-L., Jiang R.: Removal of micro-particles by microbial granules used for aerobic wastewater treatment. *Wat. Sci. Technol.* **50**, 147–154 (2004)
17. Jang A., Yoon Y.-H., Kim I.S., Kim K.-S., Bishop L.P.: Characterization and evaluation of aerobic granules in sequencing batch reactor. *J. Biotechnol.* **105**, 71–82 (2003)
18. Karcz J.: Nowoczesna mikroskopia elektronowa w diagnostyce środowiska. *Problemy Środowiska i Jego Ochrony*, **15**, 223–244 (2007)
19. Lemaire R., Webb R.I., Yaun Z.: Microscale observation of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient rich industrial wastewater. *ISME J.* **2**, 528–541 (2008)
20. Lettinga, G., van Velsen A. F. M., Hobma S. W., De Zeeuw W., Klapwijk A.: Use of upflow sludge blanket reactor concept for

biological waste water treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioengineer*. **22**, 699–734 (1980)
21. Liu Y., Wu W., Tay J., Wang J.: Formation and long-term stability of nitrifying granules in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technol*. **99**, 3919–3922 (2008)
22. MacLeod F.A., Guiot S.R., Costerton J.W.: Electron microscopic examination of the extracellular polymeric substances in anaerobic granular biofilms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 481–485, (1995)
23. McSwain B.S., Irvine R.I., Hauser M., Widerer P.A.: Composition and Distribution of Extracellular Polymeric Substances in Aerobic Flocs and Granular Sludge. *Appl. Environ. Microbiol*. **71**, 1051–1057 (2005)
24. Mosquera A., Figueroa M., Morales N., Val Á., Campos J.L., Méndez Pampín, R.J.: Chapter II: Aerobic granulation (w) Innovative Technologies for Urban Wastewater Treatment Plants, red. Lema J.M., Uniwersytet Santiago de Compostela, 2010, s. 35–38
25. Rao M.V.R., Atreyi M., Rajeswari M.R.: Fluorecscence studies on concanavalin-A. *J. Biosci.* **6**, 823–828 (2007)
26. Raszka A., Ziembinska A., Wiechetek A.: Metody i techniki biologii molekularnej w biotechnologii środowiskowej. *Czasopismo Techniczne*, **2**, 101–114 (2009)
27. Sheng G.P., Yu H.Q., Li X.Y.: Stability of sludge flocs under shear conditions: roles of extracellular polymeric substances (EPS). *Biotechnol. Bioeng*. **93**, 1095–1102 (2006)
28. Song Z., Zhang K., Tong L.: Influence of temperature on the characteristics of aerobic granulation in sequencing batch airlift reactors. *J. Environment. Sci.* **21**, 273–278 (2009)
29. Song Z., Pana Y., Zhang K., Ren N., Wang A.: Effect of seed sludge on characteristics and microbial community of aerobic granular sludge. *J. Environment. Sci.* **22**, 1312–1318 (2010)
30. Stewart P., Murga R., Srinivasan R., de Beer D.: Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Wat. Res*. **29**, 2006–2009 (1995)
31. Tay J.H., Ivanov V., Pan S., Tay S.T.L.: Specific layers in aerobically grown microbial granules. *Lett. Appl. Microbiol*. **34**, 254–257 (2002)
32. Wang F., Xia S.Q., Liu Y., Chen X.S., Zhang J.: Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers in start-up of aerobic granular sludge. *J. Environment. Sci.* **19**, 996–1002 (2007)
33. Wang Z-W., Liu Y., Tay J-H.: Biodegradability of extracellular polymeric substances produced by aerobic granules. *Microbiol. Biotechnol*. **74**, 462–466 (2007)
34. Weber S.D., Ludwig W., Schliefer K-H., Fried J.: Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms, *Appl. Environ. Biotechnol*. **73**, 6233–6240 (2007)
35. Wingerder J., Neu T.R., Flemming H.C. Microbial extracellular polymeric substances, red. Flemming H.C., Springer, Berlin, 1999, s. 3–9
36. Woźnica A., Karcz J., Nowaka A., Gmur A., Bernas T.: Spatial architecture of nitrifying bacteria biofilm immobilized on polyurethane foam in an automatic biodetector for water toxicity. *Microscopy and Microanalysis,* **16**, 550–560 (2010)
37. Zheng Y.-M., Yu H.-Q., Sheng G.-P.: Physical and chemical characteristic of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor. *Process Biochemistry*, **40**, 645–650 (2005)
38. Zheng YM, Yu HQ.: Determination of the pore size distribution and porosity of aerobic granules using size-exclusion chromatography. *Wat. Res*. **41**, 39–46 (2007)
39. www.http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Zawadzki03; Zawadzki M., 14 wrzesień 2005 (on-line), Skaningowa mikroskopia elektronowa – zalety, wady, zastosowania, dostępne on--line 06.05.2011

JUBILEUSZ 90-LECIA PROF. MIECZYSŁAWA JANOWCA

Tadeusz M Zielonka

Katedra i Zakład Medycyny Rodzinnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
02-097 Warszawa ul. Banacha 1a, tel./faks: 22 599 2190; e-mail: tmzielonka@wp.pl

Prof. Mieczysław Janowiec i Prof. Zofia Zwolska

W grudniu 2011 r. Polskie Towarzystwo Chorób Płuc zorganizowało sesję naukową z okazji 90. urodzin prof. Mieczysława Janowca, Honorowego Członka PTChP. Sesja odbyła się w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc, w którego Zakładzie Mikrobiologii prof. Janowiec pracował przez 36 lat. Pomimo obaw Jubilata, że nikt już nie pamięta o starym profesorze sala wykładowa nie pomieściła wszystkich przybyłych. Sesję otworzył przewodniczący Warszawsko-Otwockiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc Tadeusz M. Zielonka, który powitał dostojnego Jubilata i wszystkich przybyłych wyjaśniając dlaczego zorganizowano to spotkanie. W dobie dewaluacji autorytetów i królowania celebrytów, którzy znani są tylko z tego, że są znani, rodzi się pytanie kto tak naprawdę zasługuje na szacunek społeczny i pamięć pokoleń. Na motto konferencji wybrano znane od tysięcy lat stwierdzenie: *poznacie ich po owocach*. Nawiązując w tym kontekście do Jubilata wskazano na trzy elementy. Owocem pracy prof. Mieczysława Janowca jest z pewnością zmiana sytuacji epidemiologicznej w gruźlicy, która dokonała się w Polsce w ostatnich dekadach. Gdy w latach 50. prof. Mieczysław Janowiec rozpoczynał pracę w Instytucie Gruźlicy, zapadalność na gruźlicę w Polsce wynosiła 290/100 tys. populacji, czyli tyle ile obecnie odnotowuje się w krajach afrykańskich, w których jest najgorsza sytuacja epidemiologiczna na świecie. W 2010 roku zapadalność na gruźlicę w Polsce zmniejszyła się do 19,5/100 tys. Tak istotna poprawa sytuacji epidemiologicznej nie byłaby możliwa, gdyby nie wieloletnia wytężona praca wielu osób, w tym mikrobiologów, wśród których prof. Mieczysław Janowiec zajmuje szczególnie ważne miejsce. Drugim owocem jego działalności są liczne publikacje. W zbiorach Narodowej Biblioteki Medycznej Stanów Zjednoczonych nazwisko profesora Janowca widnieje jako autora 155 artykułów. Pierwszy z nich ukazał się w 1951 a ostatni w 2005 r. Zdecydowana większość z nich to prace doświadczalne a profesor Janowiec najczęściej był ich pierwszym autorem. Najważniejsze z nich dotyczyły badań eksperymentalnych nad lekami skutecznymi w gruźlicy oraz rozpowszechnienia prątków atypowych i diagnostyki mykobakteriozy. Artykuły widoczne w *Pubmedzie* to zaledwie część z ponad 400 publikacji jakie ma on w swoim dorobku. Trzecim ważnym owocem działań prof. Mieczysława Janowca są jego znakomici następcy w osobie prof. Zofii Zwolskiej a obecnie również prof. Ewy Augustynowicz-Kopeć. Patrząc na dokonania jego wychowanek można docenić klasę mistrza. Następnie głos zabrał prof. Marek Niemiałtowski, przewodniczący Komitetu Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk, który w imieniu środowiska mikrobiologów skupionych w PAN pogratulował Jubilatowi wielkich osiągnięć i dokonań w dziedzinie mikrobiologii prątka z uznaniem odnosząc się do szacunku jakiem obdarza go środowisko od tak wielu już lat. Prof. Zofia Zwolska, wiceprzewodnicząca Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, odczytała specjalny adres przesłany przez przewodniczącą PTM panią

prof. Walerię Hryniewicz, z serdecznymi pozdrowieniami dla dostojnego Jubilata z okazji urodzin. W kolejnym wystąpieniu dr Klimkowska-Misiak, wiceprezes Okręgowej Izby Lekarskiej w Warszawie, odczytała list Prezesa OIL w Warszawie, w którym podkreślono olbrzymi wkład Jubilata w zwalczanie gruźlicy w Polsce i zasługi jakie położył w rozwój mikrobiologii polskiej. Kolejny uroczysty adres od Izby Diagnostów przekazała wiceprzewodnicząca Izby prof. Ewa Augustynowicz-Kopeć. Serdeczne podziękowania za wiele lat współpracy zakończonej kilkoma patentami, habilitacjami, doktoratami i licznymi wspólnymi artykułami na temat nowych leków przeciwprątkowych, złożył Jubilatowi przybyły specjalnie z Gdańska prof. Henryk Foks z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Niezwykle ciepło wspominał prof. Mieczysława Janowca dr Zbigniew Jóźwik, przyrodnik, chemik, ale także artysta grafik i polarnik, zajmujący się badaniem prątków na Spitsbergenie, który podkreślił, że całą swoją wiedzę mikrobiologiczną zawdzięcza profesorowi Janowcowi. Ofiarował Jubilatowi osobiście wykonane okolicznościowe ekslibrysy i ozdobne wizytówki. Wiele dawnych wychowanków profesora, zarówno lekarzy jak i mikrobiologów, niezwykle ciepło wspominało kontakty z profesorem Janowcem, które głęboko wryły się im w pamięć i odegrały ważną rolę w ich zawodowej karierze.

Po uroczystym otwarciu Zofia Zwolska przedstawiła sylwetkę profesora Mieczysława Janowca. Był to wykład o historii mikrobiologii polskiej na tle wydarzeń w Polsce XX wieku. Ojciec profesora Janowca był lekarzem w Rabce-Zdrój, uczestnikiem kampanii wrześniowej w 1939 roku, więźniem Starobielska zamordowanym w Charkowie. Dyplom lekarza Mieczysław Janowiec uzyskał po wojnie na wydziale lekarskim Uniwersytetu Jagiellońskiego. Mikrobiologia była od zawsze jego wielką pasją. Jeszcze przed ukończeniem studiów rozpoczął pracę w Zakładzie Mikrobiologii Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrzu kierowanej przez prof. Stefana Ślopka, pod jego kierunkiem rozpoczął pracę nad hodowlą prątków gruźlicy. Po uzyskaniu specjalizacji z mikrobiologii klinicznej został przeniesiony do Zakładu Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy. Równocześnie pracował także w Zakładzie Antybiotyków Państwowego Zakładu Higieny i w Instytucie Leków. Jego kolejnymi nauczycielami byli prof. Wł. Kuryłowicz i prof. E. Mikulaszek. Doktoryzował się dysertacją na temat hodowli prątków gruźlicy metodą szkiełkową a habilitował z badań nad odczynem hemaglutynacji w diagnostyce gruźlicy i w badaniach odporności. Współpracował z wieloma sławami polskiej nauki w osobach profesorów Venuleta, Bojarskiej-Dahling i Woźnickiej. Przez 18 lat kierował Zakładem Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy, był zastępcą dyrektora ds. nauki Instytutu Gruźlicy i zastępcą specjalisty krajowego ds. ftyzjopneumonologii. Otrzymał wiele nagród Ministra Zdrowia. Ważnym tematem jego zainteresowań były prątki atypowe – poszukiwał ich w środowisku człowieka i określił algorytm ich typowania. Wielką jego pasją była chemioterapia doświadczalna, badał skuteczność leków przeciwprątkowych u różnych zwierząt, zajmował się lekooopornością, stworzył różne modele zakażania zwierząt gruźlicą. Prof. Zofia Zwolska podkreśliła, że uczył swoich współpracowników humanitarnego obchodzenia się ze zwierzętami doświadczalnymi. Osobiście skonstruował wiele aparatów, które wykorzystywał w badaniach naukowych. Przed wielu już laty prowadził hodowlę tkankową prątków gruźlicy. Niezwykle nowatorskim działaniem było zorganizowanie i nadzór nad ponad 200 laboratoriami prątka w całym kraju. Wprowadził kontrolę jakości i wiarygodności pracy laboratoriów prątka i coroczne sprawozdania z ich działalności. Odegrało to znaczącą rolę w zwalczaniu gruźlicy w naszym kraju. Hobby profesora Mieczysława Janowca była fotografia, fotografował prątki na pożywkach, pod mikroskopem, ale także ważne wydarzenia w zakładzie. Niektóre zdjęcia prezentujące znane postacie polskiej mikrobiologii i pneumonologii zostały zademonstrowane w trakcie tego wystąpienia.

W następnym wykładzie prof. Ewa Augustynowicz-Kopeć przedstawiła niezwykle interesujące zagadnienie prątka trądu. Jest to jedna z najciekawszych bakterii, charakteryzująca się bardzo powolnym cyklem rozwoju. Trąd uważany jest za jedną z najstarszych chorób świata, ale choć opisywana była przed wiekami to dopiero w 1873 roku norweski lekarz A. Hansen odkrył bakterię wywołującą tą intrygującą wielu badaczy chorobę skóry i nerwów obwodowych. W Norwegii stwierdzano w przeszłości wiele zachorowań, gdyż wbrew obiegowej opinii bakterie te preferują zimne środowisko. Obecnie choroba dominuje w Afryce i południowo-wschodniej Azji. Trąd wywarł wielki wpływ na dzieje świata, wywołując strach powodujący wykluczenie ze społeczności osób chorych. Szpecące zmiany skórne, szczególnie widoczne na twarzy oraz na dłoniach stygmatyzowały chorych i już w IV wieku powstawały leprozoria, w których izolowano chorych od reszty społeczeństwa. Chorzy ci byli całkowicie wykluczeni, a na świecie i nawet w Europie (Rumunia) wciąż istnieją takie miejsca. Postęp badań nad trądem nastąpił, gdy wykryto, że oprócz ludzi chorują na tę chorobę również amerykańskie pancerniki. Umożliwiło to stworzenie modeli eksperymentalnych badań nad patogenezą choroby i jej leczeniem. Dzięki wprowadzeniu dapsonu a następnie rifampicyny i klofazyminy udało się w ostatnim czasie skutecznie wyleczyć kilkanaście milionów chorych. Każdego roku stwierdza się jednak 250 tysięcy nowych zachorowań. Kolejnym kamieniem milowym w rozwoju badań nad trądem były osiągnięcia w dziedzinie genetyki. Określenie pełnego genomu *Mycobacterium leprae* pozwoliło określić historię rozprzestrzenienia się choroby w przeszłości. Interesujące było stwierdzenie, że prątek trądu pozbawił się wszystkich genów determinujących funkcje, które nie były niezbędne. W dyskusji prof. Urszula Demkow, przewodnicząca Warszawskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej, podkreśliła, że bakteria ta jest intrygująca nie tylko dla mikrobiologów, ale też dla immunologów, gdyż wywołuje całkowicie odmienne reakcje immunologiczne, w porównaniu z innymi bakteriami, w tym również prątkami gruźlicy. Dr Jerzy Walczak podzielił się swoimi wspomnieniami z pracy w Afryce, gdzie niejednokrotnie leczył chorych na trąd i gruźlicę.

Na zakończenie głos zabrał Jubilat, który podziękował wszystkim za przybycie, tak wiele ciepłych słów wypowiedzianych pod jego adresem oraz kwiaty i upominki jakimi został obdarowany. Był zaskoczony, że tak wiele osób serdecznie go wspomina. Przypomniał o bardzo bliskich kontaktach z naukowcami z innych krajów pracujących w Budapeszcie, Pradze, Paryżu, Rosji, Włoszech itp. Wyraził ubolewanie, że tak wiele przyjaźni i owocnej współpracy nie jest kontynuowanych. Po sesji profesor Janowiec był dosłownie oblegany w kuluarach, wielu przybyłych ustawiło się w długiej kolejce by móc zamienić z nim choć kilka słów. Wszyscy zebrani wyrażali nadzieję, że za 10 lat będziemy mogli się spotkać z okazji kolejnego jubileuszu.

Warszawa 21 01 2012

„REKOMENDACJE DIAGNOSTYCZNO-TERAPEUTYCZNO-PROFILAKTYCZNE NARODOWEGO PROGRAMU OCHRONY ANTYBIOTYKÓW"

W ramach realizacji programu zdrowotnego „Narodowy Program Ochrony Antybiotyków na lata 2011–2015" oraz programu zdrowotnego „Narodowy Program Ochrony Antybiotyków" Moduł I „Monitorowanie zakażeń szpitalnych oraz inwazyjnych zakażeń bakteryjnych dla celów epidemiologicznych, terapeutycznych i profilaktycznych na lata 2009–2013" ukazały się Rekomendacje diagnostyczno-terapeutyczno-profilaktyczne, sfinansowane ze środków będących w dyspozycji Ministra Zdrowia w ramach w/w programów zdrowotnych.

Rekomendacje dostępne są na stronie internetowej Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków **www.antybiotyki.edu.pl**

1. **„Szpitalna lista antybiotyków", Warszawa 2011.**

   autorzy:
   prof. dr hab. med. Waleria Hryniewicz
   Narodowy Instytut Leków, Warszawa
   Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej, Warszawa

   dr n. med. Tomasz Ozorowski
   Szpital Kliniczny Przemienienia Pańskiego UM, Poznań
   Szpital Kliniczny im. Karola Jonschera UM, Poznań
   Szpital Wojewódzki w Poznaniu

   zagadnienia: „Szpitalna lista antybiotyków" stanowi wsparcie szpitali w procesie tworzenia receptariusza lekowego w zakresie antybiotyków i stanowi część receptariusza szpitalnego, który jest zbiorem zasad będących podstawą stosowania leków w szpitalu.

2. **„Szpitalna polityka antybiotykowa", Warszawa 2011.**

   autorzy:
   prof. dr hab. med. Waleria Hryniewicz
   Narodowy Instytut Leków, Warszawa
   Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej, Warszawa

   dr n. med. Tomasz Ozorowski
   Szpital Kliniczny Przemienienia Pańskiego UM, Poznań
   Szpital Kliniczny im. Karola Jonschera UM, Poznań
   Szpital Wojewódzki w Poznaniu

   zagadnienia: „Szpitalna polityka antybiotykowa" skierowana jest przede wszystkim do: zespołu ds. antybiotykoterapii, zastępcy dyrektora ds. medycznych, przewodniczącego i członków komitetu terapeutycznego, przewodniczącego i członków komitetu ds. kontroli zakażeń szpitalnych, przewodniczącego i członków zespołu ds. zakażeń szpitalnych, farmaceuty szpitalnego, mikrobiologa szpitalnego.

3. **„Zakażenia *Clostridium difficile*. Diagnostyka, terapia, profilaktyka", Warszawa 2011.**

   autorzy:
   prof. dr hab. med. Waleria Hryniewicz
   Narodowy Instytut Leków, Warszawa
   Centralny Ośrodek Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej, Warszawa

   prof. dr hab. med. Gayane Martirosian
   Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
   Warszawski Uniwersytet Medyczny

   dr n. med. Tomasz Ozorowski
   Szpital Kliniczny Przemienienia Pańskiego, Poznań
   Szpital Kliniczny im. Karola Jonschera UM, Poznań
   Szpital Wojewódzki w Poznaniu

   zagadnienia: Rekomendacje zawierają definicje wprowadzone przez Centrum Kontroli Chorób w Atlancie w 2007 roku w celu ujednolicenia monitorowania chorób spowodowanych przez *Clostridium difficile* i są tożsame ze stanowiskiem europejskiej grupy badawczej – European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Przedstawiają diagnostykę, terapię i profilaktykę zakażeń *Clostridium difficile.*

4. **„Stosowanie antybiotyków w profilaktyce okołooperacyjnej", Warszawa 2011.**

   autorzy:
   prof. dr hab. med. Waleria Hryniewicz
   Narodowy Instytut Leków, Warszawa

   prof. dr hab. med. Jan Kulig
   Uniwersytet Jagielloński CM, Kraków

   dr n. med. Tomasz Ozorowski
   Szpital Kliniczny Przemienienia Pańskiego, Poznań

   dr n. med. Piotr Kulig
   Uniwersytet Jagielloński CM, Kraków

   dr n. med. Dariusz Wąchol
   Uniwersytet Jagielloński CM, Kraków

   zagadnienia: Rekomendacje obejmują zagadnienia dotyczące rodzajów ran operacyjnych i ryzyka powikłań infekcyjnych, zasad ogólnych profilaktyki okołooperacyjnej, rekomendacji podawania antybiotyku wg rodzaju zakażenia. Rekomendacje są zalecane przez Konsultanta Krajowego w dziedzinie chirurgii ogólnej oraz Konsultanta Krajowego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej.

5. **„Rekomendacje postępowania w zakażeniach bakteryjnych ośrodkowego układu nerwowego" Warszawa 2011.**

   autorzy:
   dr hab. n. med. Piotr Albrecht
   Klinika Gastroenterologii i Żywienia Dzieci,
   Warszawski Uniwersytet Medyczny

   prof. dr hab. n. med. Waleria Hryniewicz
   Narodowy Instytut Leków, Warszawa

   dr n. med. Alicja Kuch
   Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń OUN,
   Narodowy Instytut leków, Warszawa

   dr n. med. Witold Przyjałkowski
   Klinika Chorób Zakaźnych dla Dorosłych,
   Warszawski Uniwersytet Medyczny,
   Wojewódzki Szpital Zakaźny, Warszawa

dr hab. n. med. Anna Skoczyńska
Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń OUN,
Narodowy Instytut leków, Warszawa

dr hab. n. med. Leszek Szenborn
Katedra i Klinika Pediatrii i Chorób Infekcyjnych
Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich, Wrocław

zagadnienia: Rekomendacje są zalecane przez Konsultanta Krajowego w dziedzinie chorób zakaźnych oraz Konsultanta Krajowego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej.
Przedstawiają diagnostykę, terapię i profilaktykę zakażeń bakteryjnych ośrodkowego układu nerwowego.
Rekomendacje skierowane są do lekarzy podstawowej opieki zdrowotnej i lecznictwa zamkniętego, epidemiologów, mikrobiologów.

6. „Rekomendacje postępowania w pozaszpitalnych zakażeniach układu oddechowego", Warszawa 2010.

autorzy:
prof. dr hab. n. med. Waleria Hryniewicz
Narodowy Instytut Leków, Warszawa

dr n. med. Tomasz Ozorowski
Szpital Kliniczny Przemienienia Pańskiego, Poznań

prof. dr hab. n. med. Andrzej Radzikowski
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

dr n. med. Tadeusz M. Zielonka
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

dr n. med. Piotr Albrecht
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

dr hab. n. med. Witold Lukas
Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

prof. dr hab. n. med. Ewa Niżankowska-Mogilnicka
Uniwersytet Jagielloński CM, Kraków

prof. dr hab. n. med. Jerzy Kozielski
Śląski Uniwersytet Medyczny, Zabrze

dr n. med. Paweł Grzesiowski
Narodowy Instytut Leków, Warszawa

dr n. med. Józef Meszaros
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

prof. dr hab. n. med. Elżbieta Hassmann-Poznańska
Uniwersytet Medyczny, Białystok

prof. dr hab. n. med. Antoni Krzeski
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

prof. dr hab. n. med. Jan Kuś
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

prof. dr hab. n. med. Michał Pirożyński
CMKP, Warszawa

prof. dr hab. n. med. Tadeusz Płusa
Wojskowy Instytut Medyczny, Warszawa

zagadnienia: Rekomendacje stanowią zbiór wskazówek ułatwiających lekarzowi podjęcie właściwych decyzji diagnostycznych i terapeutycznych w szeroko pojętych zakażeniach dróg oddechowych. W Rekomendacjach opartych na EBM uwzględniono wyłącznie antybiotyki i chemioterapeutyki zarejestrowane w Polsce w odpowiednich wskazaniach oraz aktualną sytuację epidemiologiczną w naszym kraju dotyczącą najczęściej występujących czynników etiologicznych i ich lekowrażliwości.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
Uchwałą z dnia 21 lutego 2012 roku

ogłasza

kolejną edycję Konkursu o Nagrodę Naukową im. prof. E. Mikulaszka

Przewidziane są nagrody pieniężne:

I stopnia w wysokości 5.000,– zł
II stopnia w wysokości 3.000,– zł
III stopnia w wysokości 2.000,– zł

Nagroda Naukowa im. prof. E. Mikulaszka będzie wręczana na
XXVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów w Lublinie

Laureat Nagrody Naukowej im. prof. E. Mikulaszka zobowiązany jest do prezentacji nagrodzonej pracy na XXVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

Szczegółowe informacje dotyczące zasad konkursu przedstawia Regulamin Konkursu zamieszczony na stronie internetowej Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

www.microbiology.pl

Prace należy zgłaszać **w terminie do dn. 31.05.2012 r.** na adres:

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
ul. Chełmska 30/34
00-725 Warszawa
z dopiskiem: „Nagroda Naukowa im. prof. E. Mikulaszka”

BIOMÉRIEUX

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

ogłasza

II edycję Konkursu o Nagrodę bioMérieux/PTM
za wybitne osiągnięcia w dziedzinie mikrobiologii klinicznej

Szczegółowe informacje dotyczące zasad konkursu
przedstawia Regulamin Konkursu dostępny na stronie internetowej PTM

www.microbiology.pl

Wniosek o przyznanie nagrody należy przesłać
w terminie do dn. 15.06.2012 r.

na adres:

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów
ul. Chełmska 30/34
00-725 Warszawa

z dopiskiem: „Nagroda bioMérieux/PTM”

INFORMACJA DLA AUTORÓW

Postępy Mikrobiologii zamieszczają artykuły przeglądowe ze wszystkich dziedzin mikrobiologii nie drukowane w innych czasopismach oraz w dziale Nowości Wydawniczych recenzje nowych książek z zakresu mikrobiologii i nauk pokrewnych, które ukazują się w Polsce. Artykuły drukowane w *Postępach Mikrobiologii* nie mogą być bez zgody Redakcji publikowane w innych periodykach.

1. Sposób przygotowania manuskryptu

1.1. Tekst

Prace należy przysyłać do Sekretariatu Redakcji w postaci elektronicznego zapisu tekstu w edytorze Microsoft Word dowolnej edycji w wersji PL na dyskietkach komputerowych (3,5" 1,44 MB), na płytach CD lub DVD. Do dyskietki powinny być dołączone 2 egz. tekstu artykułu całkowicie zgodnego z zapisem elektronicznym. Objętość pracy nie powinna przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 30 stron maszynopisu. Maszynopis powinien być jednostronny (wielkość czcionki 12, odstęp pomiędzy wierszami 1,5), z numeracją stron. Po tytułach wydzielonych nie należy stawiać kropek. Na oddzielnej stronie (strona tytułowa) należy podać tytuł pracy, pod nim w pełnym brzmieniu imiona i nazwiska autorów, adresy autorów i afiliacje, telefony oraz e-mail z zaznaczeniem autora korespondencyjnego, spis treści (tytuły poszczególnych rozdziałów) oraz kilka (nie więcej jak pięć) słów kluczowych (keywords). Tytuł pracy, spis treści i słowa kluczowe należy powtórzyć w języku angielskim. Słowa kluczowe mogą bądź nie pojawiać się w tytule pracy – należy je podać w porządku alfabetycznym. W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy" prace przygotowane wg. wyżej wymienionych wytycznych należy przesłać na adres Redaktora Działu. Praca powinna kończyć się krótkim podsumowaniem, zawierającym najistotniejsze elementy treści. Na oddzielnej stronie należy dołączyć krótkie streszczenie pracy w języku angielskim (maksymalnie 250 słów). Tekst pracy powinien być zgodny z zaleceniami szczegółowymi Redakcji.

Przesłane do redakcji prace winny być napisane poprawną polszczyzną. Redakcja rekomenduje P.T. Autorom **Słownik Poprawnej Polszczyzny** (red. Witold Doroszewski, Halina Kurkowska, Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, 1998) jako pomoc w redagowaniu tekstu. Jakkolwiek *Postępy Mikrobiologii* są polskojęzyczne, nie wyklucza się druku prac, napisanych w języku angielskim.

1.2. Ilustracje

Tabele i rysunki powinny być dostarczone w wersji elektronicznej oraz w formie wydruku z drukarki laserowej lub atramentowej. Maksymalne rozmiary rysunków planowanych w artykule w jednej szpalcie nie powinny przekraczać 7,5 cm × 16 cm (szer./wys.), a zaplanowanych w obszarze dwóch szpalt 11 cm × 21 cm (szer./wys.). Szerokość planowanych tabel nie powinna przekraczać rozmiarów rysunków (odpowiednio 7,5 cm lub 11 cm), a ich wysokość nie powinna być większa od 10 cm, niezależnie od zaplanowanej szerokości tabeli. **Podane wymiary rysunków obowiązują zarówno ilustracje wykonane i załączone w wersji elektronicznej i w papierowej.**

W maszynopisach nie należy pozostawiać wolnych miejsc na rysunki i zdjęcia, a tylko na kopii zaznaczyć miejsce, w którym powinny być umieszczone, np. tab. 1, rys. 1. Liczbę rysunków i tabel należy ograniczyć do istotnie niezbędnej ilości. Te same wskazówki odnoszą się do pojedynczych wzorów chemicznych. Każda tabela powinna być oznaczona kolejnym numerem rzymskim oraz mieć nagłówek opisujący jej treść. Na osobnej kartce należy załączyć spis z objaśnieniami jakie powinny się znaleźć pod rysunkami lub z uwagą „objaśnienia w tekście". Podpisy pod wykresami, rysunkami, zdjęciami należy umieścić na osobnej stronie.

1.2.1. Elektroniczne wersje ilustracji

Pliki cyfrowe zawierające ilustracje akceptowane do druku należy przygotować zgodnie z zaleceniami Redakcji. Ilustracje we wstępnej wersji artykułu przeznaczonej dla recenzentów mogą być dostarczone jako pliki PDF, ale w wersji ostatecznej do druku muszą być dostarczone jako pliki TIFF albo EPS. Pliki pochodzące z programu Power Point akceptowane są jedynie w wersji ilustracji czarno białej. Wszystkie rysunki (oprócz czarno białych z programu Power Point) wyeksportowane do formatu bitmapy muszą być zachowane w skali szarości albo w systemie CMYK (ang. Cyan, Magenta, Yellow, blacK). Nie należy stosować zapisu w systemie RGB (ang. Red, Green, Blue). Obrazy stonowane (zróżnicowanie gęstości lub cienie) muszą być sporządzone w skali szarości (nie używać bitmapy). Pliki kolorowe sporządzone w programie Power Point nie są akceptowane z powodu różnic pomiędzy RGB i CMYK podczas wydruku.

Wszystkie grafiki należy przesyłać w 100% wymiarze bez konieczności skalowania. Minimalna rozdzielczość stosowana w ilustracjach powinna wynosić 300 dpi dla zdjęć szarych i kolorowych, 600 dpi dla liter i 1200 dpi dla linii w wykresach. Kolorowe ilustracje musza pozostawać także w systemie CMYK jako obrazy CMYK TIFF o rozdzielczości 300 dpi.

Grafiki należy przesyłać w ich naturalnym planowanym formacie, aby nie istniała konieczność ich powiększania lub zmniejszania w Wydawnictwie. Wszystkie ostateczne napisy, oznaczenia czy też klucze oznaczeń muszą być wprowadzone do rysunków. Każdy rysunek musi być dołączony jako osobny plik, a rysunki wielo panelowe muszą być podane w jednym pliku. Aby uniknąć problemu z różnymi fontami Redakcja zaleca stosowanie następujących czcionek: Times New Roman, Times New Roman Pl, Arial, Arial Pl oraz Symbol. Dane są przyjmowane na standardowych mediach takich jak dyskietki (3,5 cala), płyty CD lub DVD. Przesłane dyski lub dyskietki nie będą zwracane autorom. Zalecaną przez redakcję kompresją informacji jest ZIP lub PKZIP (Windows). Redakcja nie akceptuje ilustracji wykonanych Microsoft Office, ponieważ są one zapisane w systemie RGB. Elementy rysowane, takie jak wykresy, formuły matematyczne czy diagramy nie powinny zawierać dodatkowych naniesień ręcznych i powinny być łatwo odtwarzane w dostępnych programach. W celu szczegółowej informacji proszę wysyłać zapytanie przez e-mail na adres: jbielecki@biol.uw.edu.pl.

1.3. Piśmiennictwo

Cytowaną literaturę (Piśmiennictwo) należy wpisać oddzielnie jako ostatnie strony maszynopisu, wymieniając pozycje w kolejności alfabetycznej. W wykazie powinny być podane kolejno: liczba porządkowa, nazwisko autora, pierwsze litery imion, nazwiska współautorów pracy i pierwsze litery ich imion (w kolejności podanej w cytowanej pracy), pełny tytuł cytowanej pracy, skrócony tytuł czasopisma, tom, strona, i rok wydania (w nawiasie), np.

Arendsen A.F., Solimar M.Q. i Ragsdale S.W.: Nitrate-dependent regulation of acetate biosynthesis and nitrate respiration by *Clostridium thermoaceticum. J. Bacteriol.* **181**, 1489–1495 (1999).

Dla cytowanych wydawnictw nieperiodycznych należy podać kolejno: nazwisko i pierwsze litery imion autora lub współautorów, tytuł dzieła, wydawnictwo, miejsce i rok wydania. W przypadku odwoływania się do artykułu w pracy zbiorowej należy dodatkowo podać tytuł tej pracy oraz nazwisko jej redaktora, wydawnictwo, miejsce wydania, rok, tom oraz na końcu stronę, np.:

Portnoy D.A., Sun A.N., Bielecki J.E.: Escape from the phagosome and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* (w) Microbial Adhesion and Invasion, red. M. Hook, L. Świtalski, Springer Verlag, New York, 1991, s. 86.

W przypadku gdy liczba współautorów pracy przekracza 10, należy podać nazwiska i inicjały pierwszego oraz ostatniego współautora a następnie dodać uwagę i wsp., np.:

Tomb J.F., Venter J.C. i wsp.: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori. Nature*, **338**, 539–543 (1997) (wyżej cytowana praca jest dziełem 42 autorów)

Powoływanie się w tekście na pozycje cytowanej literatury następuje przez wymienienie liczby porządkowej w nawiasach np. [10]. Liczba cytowań w piśmiennictwie nie może przekraczać 100 pozycji.

1.4. Piśmiennictwo danych cytowanych z sieci internetowej

Cytowanie danych z sieci internetowej może jedynie dotyczyć informacji pochodzących z prac oryginalnych zamieszczanych w sieci przez uznane w środowisku naukowym oraz recenzowane czasopisma. Redakcja będzie również uznawać cytacje informacji ze źródeł autoryzowanych przez uznane w środowisku autorytety z dziedziny nauk przyrodniczych. Warunkiem koniecznym przy użyciu informacji ze strony internetowej jest sprawdzenie i aktualizacja zapisu informacyjnego na stronie WEB w dniu wysyłania maszynopisu. W przypadku niewłaściwego adresu i niemożliwości odtworzenia informacji z sieci komputerowej, prace będą zwracane autorom. Cytowanie informacji publikowanej na stronach sieci internetowej powinno wyglądać następująco: 14. XYZ Website 14 listopada 2004 roku (online), nazwisko wydawcy, jeśli jest znane, http://cbx.iou.pgr. (10 Października 2004 roku, data ostatniego sprawdzenia adresu). Cytowanie książek powinno zawierać szczegółowe dane o wydawnictwie. Cytacje prac oryginalnych przesyłanych poprzez sieć komputerową powinna zawierać następujące dane: nazwisko autora, inicjały imion, data przyjęcia pracy, tytuł pracy. Nazwa czasopisma, numer: strony (jeśli są dostępne) (online), adres internetowy, data potwierdzenia ważności adresu.

2. Prawo autorskie

Autorskie prawo osobiste (Ustawa z dn. 4-tego lutego 1994 r., Dz.U. Nr 90, poz. 631 ze zm.), zwane dalej w Informacji dla Autorów prawem autorskim dotyczy niemajątkowych interesów twórcy związanych z danym utworem oraz określa zasady ochrony więzi twórcy z utworem. Do praw tych między innymi należy:

- prawo do autorstwa utworu – wyrażające m.in. zakaz „przywłaszczania" utworu przez inne niż twórca osoby (zakaz dokonywania plagiatów)
- prawo do oznaczenia utworu swoim nazwiskiem albo udostępnienia utworu anonimowo
- prawo do nienaruszalności treści i formy utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

Konieczność ochrony Autorskich praw osobistych innych Autorów przez Redakcję Postępów Mikrobiologii obliguje nas do przyjęcia następującej procedury:

(a) Reprodukcja utworów wytworzonych przez innych Autorów w pracy własnej, przesłane do opublikowania w *P.M.* tj. cudzych rysunków lub tabel – pochodzących z oryginalnej, pierwotnej pracy innego Autora/twórcy – bądź cytowanie fragmentów cudzego tekstu, wymaga od Autorów *P.M.* wcześniejszego uzyskania przez nich pisemnej zgody od Autorów pierwotnej pracy lub Wydawnictwa (z której materiały te pochodzą) na ich reprodukcję. Zgodę tę w formie oryginalnego zaświadczenia należy przysłać wraz z materiałami reprodukowanymi do Redakcji *P.M.*

- Pod cytowanym rysunkiem należy w opisie podać nazwisko pierwotnego Autora, pełną bibliografię pracy z której pochodzi rysunek oraz informację o zgodzie Wydawnictwa lub Autora na jego reprodukcję.
- Cytowany tekst powinien być wyraźnie oznaczony w odpowiednim miejscu manuskryptu, zaś u dołu strony powinna być zamieszczona informacja dotycząca pochodzenia cytatu oraz uzyskanej zgody na przedruk.

(b) Dozwolone jest wprowadzanie zmian w cytowanych rysunkach innych Autorów/twórców pod warunkiem każdorazowego uzyskania ich zgody (lub osób upoważnionych przez nich) na dokonanie takich zmian. Zmiany w oryginalnych rysunkach mogą wynikać z chęci Autorów *P.M.* do dokonania nowego opracowania lub nowego przedstawienia omawianego przez siebie zagadnienia. W tych przypadkach wskazane jest, aby zgoda twórcy wskazywała na zakres dokonywanych zmian, gdyż pozwoli to uniknąć wątpliwości odnośnie zakresu wyrażonej tak zgody. Wreszcie konieczność uzyskania zgody pierwotnego Autora/twórcy na dokonanie zmian w reprodukowanym rysunku wynika z możliwości ingerencji Autorów *P.M.* w autorskie prawo osobiste w postaci nienaruszalności formy i treści utworu oraz jego rzetelnego wykorzystania.

(c) Warunkiem przyjęcia przez Redakcję *P.M.* manuskryptu pracy oraz poddania jej dalszej procedurze wydawniczej jest złożenie wraz z manuskryptem Oświadczenia o oryginalności pracy, Oświadczenia dotyczącego praw autorskich oraz w przypadku prac metodycznych Oświadczenia dotyczącego „konfliktu interesów".

3. Zalecenia szczegółowe*

3.1. Nazewnictwo drobnoustrojów

Należy stosować dwuczłonowe nazwy zawierające nazwę rodzajową oraz gatunkową (np. *Escherichia coli*). Nazwy rodzajowe mogą być użyte same tj. bez nazwy gatunkowej, natomiast nie można użyć samych tylko nazw gatunkowych. Gdy w pracy podaje się pierwszy raz nazwę gatunku, musi ona składać się z pełnych wyrazów, przy ponownym użyciu tej nazwy, podaje się tylko pierwszą literę nazwy rodzajowej (zawsze dużą) oraz nazwę gatunkową w pełnym brzmieniu np. *E. coli.* Nazwy gatunku, rodziny, rzędu, klasy, działu oraz królestwa należy pisać kursywą. Informacje szczegółowe dotyczące pisowni oraz prawidłowego nazewnictwa (zgodnego z wymogami współczesnej systematyki) – przyjęte przez Redakcję *Postępów Mikrobiologii*, za instrukcją **ASM** – można znaleźć w **Instructions to Authors**, *J. Bacteriol., Jan. 2007*.

Zgodnie z propozycjami WHO – Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* ("Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars" (M.Y. Popoff and L. Le Minor, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, 1997) and „Identification and Serotyping of *Salmonella* and an Update of the Kaufmann-White Scheme" (A.C. McWhorter-Murlin and F.W. Hickman-Brenner, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.) do rodzaju *Salmonella* należą tylko dwa gatunki tj. *S. enterica* i *S. bongori* – pierwszy

* Fragmenty instrukcji dla autorów czasopism wydawanych przez American Society for Microbiology – wykorzystywanie w *P.M.* za zgodą Journals Departments ASM.

z nich podzielony został na 6 podgatunków. Stosowane dotychczas zwyczajowe nazwy, nie posiadające statusu taksonomicznego, takie jak **serotyp, typ serologiczny**, zostały zastąpione nazwą **serowaru** (w oryginale **serovar**, sv.). Nazwę serowaru należy pisać dużą literą oraz prostym pismem (np. Typhi, Paratyphi B, Typhimurium itp.). Zgodnie z powyższym, nazwę pierwszego podgatunku rodzaju *Salmonella* można zapisać: *S. enterica* subsp. enterica sv. Typhimurium lub *Salmonella* subsp. I. sv. Typhimurium, bądź po prostu, *Salmonella* Typhimurium.

3.2. Nomenklatura genetyczna

Właściwości genetyczne szczepu opisywane są w terminach fenotypu oraz genotypu. Fenotyp opisuje obserwowane właściwości organizmu. Genotyp określa genetyczną strukturę organizmu, zwykle odnosi się do szczepu dzikiego. Ww. określenia są bliżej objaśnione w pracy Demerec i wsp. *Genetics* **54** 61: 76, 1966.

(a) Fenotypowe określenie właściwości organizmu stosuje się gdy zmutowane loci nie zostały zidentyfikowane oraz zmapowane. Może być także użyte w przypadku, gdy identyfikuje się produkt genu np. białko OmpA. Zapis fenotypu zasadniczo składa się z trzech liter, nie można ich pisać kursywą, pierwsza litera powinna być zawsze dużą literą. Preferuje się użycie liczb rzymskich lub arabskich dla oznaczania bliźniaczych fenotypów np. Pol1, Pol2, Pol3 itd. Typ dziki można zapisać dodatkowym oznaczeniem *plus* (Pol+); w odróżnieniu do tego oznaczenie *minus* określać będzie fenotyp mutanta (Pol–). Czasami pewne charakterystyczne właściwości organizmu można zapisać używając liter np. (StrS).

(b) Genotypowe oznaczenia są podobne do fenotypowych – w obu przypadkach stosuje się zestaw trzech liter; genotyp pisze się zawsze małymi literami oraz kursywą (np. *ara*, *his*, *rps.*). Promotor, terminator oraz operator oznacza się literami *p*, *t* oraz *o* (np. *lacZp*, *lacZt*, *lacZo*; Bachman i Low; *Microbiol. Rev.* **44**, 1–56, 1980).

(c) Typ dziki alleli można zaznaczyć wpisując dodatkowe oznaczenie *plus* nad oznaczeniem genu np. *ara*+, *his*+, nie oznacza się natomiast zmutowaych alleli znakiem *minus.*

(d) Miejsca mutacji oznacza się poprzez wstawiania liczby kolejnych izolacji (liczby alleli) po symbolu zmutowanego locus (np. *araA1*, *araA2* itp.). W przypadku, gdy tylko jedno takie locus istnieje, lub gdy nie wiadomo w którym kolejnym locus mutacja powstała – po oznaczeniu genu wstawia się myślnik w miejscu dużej litery oznaczającej locus , zaś dalej podaje się liczbę izolacji (np. *ara*-23).

(e) Zapis genotypu może być wzbogacony innymi oznaczeniami jak *plus*, dla typu dzikiego czy *minus* dla mutanta – można wprowadzić oznaczenia określające mutacje jak np. mutacja Amber (Am), mutant termowrażliwy (Ts), mutant konstytutywny (Con), mutant wrażliwy na niskie temperatury (Cs), białko hybrydowe (Hyb) np. *araA230*(Am), *his D21*(Ts). Wprowadzanie innych wzbogaceń powinno być poprzedzone w tekście odpowiednim wyjaśnieniem.

(f) Dodatkowe oznaczenia mogą też być użyte w przypadku konieczności rozróżnienia tego samego genu znajdującego się w różnych organizmach lub szczepach tego samego gatunku np. $his_{E.coli}$ lub his_{K-12}. Dodatkowe oznaczenia stosuje się również dla rozróżnienia pomiędzy genetycznymi elementami o tej samej nazwie np. promotory operonu *gln*; *glnA1* i *glnA2*.

(g) Delecję oznacza się symbolem, D usytuowanym przed zdelecjonowanym genem lub regionem np. D *trpA432*, *D(aroP--aceE)419*, lub D*his(dhuA hisJ hisQ)1256.* Fuzję genów *ara* i *lac* można przedstawić w ten sam sposób – F (ara-lac)1256. Podobnie F (*araB*'-lacZ+)(Hyb) oznacza, że fuzja nastąpiła pomiędzy genami *araB* a *lacZ*. Inwersja jest oznaczana następująco IN (*rrnD-rrnE*)*1*. Insercję genu his E. coli do plazmidu pSC101 w pozycji 0 zasad (0 kb) zapisuje się następująco pSC101 W (Okb::K-12*hisB*)4.

Oznaczenie obecności episomu polega na podaniu jego symboli w nawiasie po nazwie szczepu rodzicielskiego np. W3110/F' 8(*gal*+).

3.3. Skróty nazw chemicznych

Nie wymagają dodatkowych wyjaśnień skróty nazw, takich jak:
- nazwy miar i wag regulowanych przez *Systeme International dc Unites* (SI), ogólnie akcetowane jednostki takie jak bp, kb, Da, masa cząst., m. cząst.
- skróty nazw chemicznych takich jak: DNA, cDNA, RNA, cRNA, RNaza, DNaza, rRNA, mRNA, tRNA; AMP, ADP, ATP, dATP, ddATP, GTP itp.,
- ATPaza, dGTPaza itp. NAD+, NADH, NADPH, NADP+, poly(A), poly(dT) itp.,
- nazwy powszechnie stosowanych technik biologii molekularnej np. PCR, SDS-PAGE, nazwy ogólnie znanych linii komórkowych np. HeLa, J774
- nazwy jednostek biologicznych; PFU (jednostka formowania łysinek), CFU (jednostka formowania kolonii), MIC (minimalne stężenia hamujące wzrost), itp.

Zasady kształtowania nomenklatury endonukleaz restrykcyjnych oraz metylotransferaz zostały opublikowane w *Nucleic Acids Research* 2003, **31**: 1805–1812. Przy pisaniu prac prosimy o korzystanie z zawartych tam informacji.

3.4. Pisownia danych numerycznych

Standardowe jednostki metryczne są stosowane dla określania długości, wagi i objętości. W przypadku przedstawiania tych wartości oraz molarności należy stosować przedrostki m, μ, n oraz p dla wartości 10–3, 10–6, 10–9 oraz 10–12. Temperaturę należy przedstawiać tylko w stopniach Celsjusza np. 37°C.

3.5. Pisownia substancji znakowanych izotopami

Jeśli wyznakowana jest pojedyncza cząsteczka w związku chemicznym należy nazwę tego związku zapisać w następujący sposób 14CO2 , 3H2O, H235SO4. Taki sam sposób zapisu stosuje się gdy radioaktywna cząsteczka nie występuje w naturalnej formie wyznakowanego związku np. 32S-ATP lub gdy symbol izotopu związany jest z niespecyficzną nazwą związku np. 14C aminokwasy, 3H-liganty itp. W przypadku niektórych specyficznych związków chemicznych można stosować nawiasy kwadratowe obejmujące symbole radioaktywnej cząsteczki przed nazwą chemiczną związku np. [14C] mocznik, L-[*metylo*-14C] metionina, [g –32P] ATP.

4. Procedura recenzowania i przyjęcia prac

Prace przysyłane do Redakcji w celu ich opublikowania w *Postępach Mikrobiologii* podlegają podwójnej ocenie tj. ich wartości merytorycznej (Recenzje) oraz poprawności pod względem redakcyjnym (układ pracy, język, załączniki ilustrujące tekst, oświadczenia autorów).
- Każda praca przesłana do Redakcji jest oceniana przez dwóch stałych Recenzentów *P.M.* (lista Recenzentów, patrz Rada Redakcyjna jest również publikowana w każdym zeszycie *P.M.* oraz na stronie internetowej http:www.pm. microbiology.pl). W przypadku braku w Radzie Redakcyjnej *P.M.* Recenzenta o odpowiedniej specjalności lub jego braku z innych ważnych przyczyn, Redaktor naczelny powołuje Recenzenta spoza Rady Redakcyjnej.
- Recenzje są anonimowe oraz dokonywane na specjalnie do tego przygotowanych arkuszach

- Recenzenci nie otrzymują zapłaty od PTM za wykonaną pracę.
- Nazwiska Recenzentów z poza Rady Redakcyjnej są wraz z podziękowaniami publikowane w każdym 4-tym zeszycie *P.M.* odpowiedniego roku.
- W przypadku negatywnej oceny pracy przez Recenzenta oraz jego sugestii skierowanej do Redaktora naczelnego odrzucenia recenzowanej pracy, bądź jej znacznego przeredagowania, Autor *P.M.* ma prawo odwołania się od tej sugestii do Redaktora naczelnego. W opisywanym przypadku decyzją Redaktora powoływany jest dodatkowy Recenzent z poza Rady Redakcyjnej *P.M.*

5. Uwagi dodatkowe

Redakcja zastrzega sobie możliwość dokonywania skrótów i poprawek nie wpływających na treść pracy. W przypadku konieczności wprowadzenia zmian w treści odsyła się autorowi jeden egzemplarz pracy oraz dyskietkę w celu dokonania poprawek. Adresy instytucji, w których pracują autorzy (adres pocztowy oraz e-mail) należy podawać w maszynopisie pracy po piśmiennictwie. Prace nie odpowiadające wymaganiom Redakcji będą odsyłane autorom bez rozpatrzenia merytorycznego. W razie nie przyjęcia pracy do druku Redakcja zwraca dyskietkę oraz jeden egzemplarz wydruku, drugi zatrzymuje u siebie. Za datę wpływu przyjmuje się dzień otrzymania pracy w formie zgodnej z instrukcją dla autorów. Autorzy otrzymują bezpłatnie 15 odbitek pracy. Za prace opublikowane w Postępach Mikrobiologii nie przewiduje się honorariów autorskich. Prace należy nadsyłać na adres sekretarza naukowego redakcji:

Dr Bohdan Jerzy Starościak
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa
tel. (22) 628-08-22 lub 621-13-51
e-mail: zmf@wum.edu.pl

W przypadku prac kierowanych do działu „Publikacje metodyczne i standardy" prace przeglądowe przygotowane zgodnie z wyżej wymienionymi zasadami należy przesłać na adres Redaktora Działu.

KOMUNIKAT

Redakcja *Postępów Mikrobiologii* uprzejmie informuje, iż zeszyt nr 3, tom 51 *PM* zawierać będzie materiały przygotowane na XVII Zjazd PTM w Lublinie (skrócone referaty do prezentacji na sesjach plenarnych oraz inaugurujące obrady w sekcjach), stąd przewidujemy opóźnienia w druku standardowych prac przeglądowych przesyłanych przez PT. Autorów do Redakcji. Za opóźnienia z góry przepraszamy.

Jerzy Hrebenda

INFORMACJE DOTYCZĄCE PRAC DRUKOWANYCH W DZIALE PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

W dziale zatytułowanym **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY** publikowane są artykuły przeglądowe o charakterze metodycznym, reprezentujące dowolną dziedzinę mikrobiologii. Redakcja Postępów Mikrobiologii (PM), w porozumieniu z Zarządem Głównym PTM ustaliła, iż drukowanych będzie rocznie nie więcej niż cztery artykuły tej kategorii.

Redaktorem odpowiedzialnym za wartość merytoryczną, redakcję tekstu oraz ostateczne przyjęcie pracy do druku jest prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba (**adres: prof. dr hab. Stefania Giedrys-Kalemba – Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Pomorskiej Akademii Medycznej. Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, tel/fax (091) 46 616 51, 52, fax (091)46 616 59, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@sci. pam.szczecin.pl**)

Prace metodyczne przeznaczone do druku podlegają ocenie dokonywanej przez stałych Recenzentów lub Ekspertów powoływanych każdorazowo przez Redaktora działu.

Lista stałych Recenzentów, patrz Zalecenia dla Autorów, pkt. 5.

Strona tytułowa każdego artykułu zaopatrzona będzie w informacje, iż praca należy do **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW** oraz każdorazowo podana będzie data otrzymania od Autorów manuskryptu jak i data zaakceptowania go do druku.

Zalecenia dla Autorów:

1. **Przesyłanie publikacji:**
   - Manuskrypt (w dwu egzemplarzach w formie papierowej oraz jednym egzemplarzu na nośniku elektronicznym wraz z rysunkami, tabelami itp.) proszę przesyłać bezpośrednio do Redaktora **PUBLIKACJI METODYCZNYCH I STANDARDÓW**.
   - Podając adres/y Autorów publikacji należy zaznaczyć Autora korespondencyjnego – prócz adresu pocztowego, numeru telefonu i ew. faxu należy obligatoryjnie podać adres e-mail Autora korespondencyjnego.

2. Sposób przygotowania manuskryptu – Pracę należy opracować zgodnie z ogólnymi zaleceniami zawartymi w **INFORMACJI DLA AUTORÓW *Postępów Mikrobiologii*** (POST. MIKROB. 2009, **48**, 1, Zeszyt 1) z uwzględnieniem następujących zmian:
   - Objętość pracy nie może przekraczać wraz z piśmiennictwem i ilustracjami 20 stron maszynopisu.
   - Ilość cytowań w rozdziale **Piśmiennictwo** nie powinna przekraczać 50 pozycji.
   - W spisie cytowanego piśmiennictwa należy umieszczać wyłącznie prace drukowane w czasopismach naukowych, niedopuszczalne jest zamieszczanie danych bibliograficznych prospektów reklamowych lub promocyjnych firm farmaceutycznych.

3. **Prawa autorskie** – do każdej przygotowanej do druku publikacji załączyć **Oświadczenie dotyczące praw autorskich.** Wzór oświadczenia można pobrać ze strony internetowej *P.M.*

4. **Zalecenia i uwagi dodatkowe:**
   W celu uniknięcia kryptoreklamy, proszę o zwrócenie szczególnej uwagi na sposób przedstawienia czytelnikom produktów komercyjnych lub metod opracowanych przez producentów. Autorzy są również zobowiązani do ujawnienia (jeżeli takie istnieją) wszelkich powiązań (honoraria, granty, płatne ekspertyzy lub inne formy uzyskiwania korzyści osobistych) między Autorami a firmą, której produkt ma istotne znaczenie w nadesłanej pracy. W tym celu każdy z Autorów proszony jest o złożenie Oświadczenia o oryginalności pracy, Oświadczenia dotyczącego praw autorskich oraz Oświadczenia dotyczącego „konfliktu interesów". Konflikt interesów występuje, kiedy Autor lub zakład pracy Autora ma finansowe lub osobiste związki z innymi osobami lub instytucjami, które mogą wpływać na jego działania i decyzje. Wzór deklaracji można pobrać ze strony internetowej *PM*.
   - Redakcja *PM* zastrzega sobie prawo ostatecznej decyzji o akceptacji pracy przeznaczonej do druku w dziale **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY.**
   - Wszelkie proponowane zmiany w **INFORMACJI DLA AUTORÓW *P.M.*** zostaną przedstawione PT Czytelnikom *Postępów Mikrobiologii* przed ich wprowadzeniem.

5. Stali recenzenci działu **PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY:**

   Jerzy Długoński (Uniwersytet Łódzki)
   Waleria Hryniewicz
   (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego)
   Józef Kur (Politechnika Gdańska)
   Anna Przondo-Mordarska
   (Akademia Medyczna we Wrocławiu)

[Wzór]

Oświadczenie o oryginalności pracy

. . . . . .
Nazwisko i imię autora (korespondencyjnego)

. . . . . .

. . . . . .
Tytuł pracy

. . . . . .
Data złożenia pracy w Redakcji *Postępów Mikrobiologii*

Oświadczam, że złożona przeze mnie praca, zatytułowana jak wyżej, jest moim oryginalnym utworem i stanowi przedmiot prawa autorskiego w myśl Ustawy o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dn. 4 lutego 1994 r.

Oświadczam również, że praca ta ani w całości, ani we fragmentach nie została opublikowana wcześniej w żadnym innym czasopiśmie lub wydawnictwie naukowym. Dodatkowo stwierdzam, iż w/w pracy nie wysłano równolegle do opublikowania w innym czasopiśmie naukowym lub wydawnictwie.

Warszawa, dnia . . . . . .

. . . . . .
– podpis Autora korespondencyjnego –

– – – –

[Wzór]

Oświadczenie dotyczące „konfliktu interesów”[1]

1. Nazwisko i imię autora: .....

2. Tytuł pracy: .....

.....

.....

3. Oświadczenie (proszę wypełnić a lub b, niepotrzebne skreślić)

(a) Oświadczam, że „konflikt interesów” nie występuje

(b) Oświadczam, że występuje „konflikt interesów”, który polega na: .....

.....

..... (miejsce, data)

..... (podpis korespondencyjnego autora)

[1] Konflikt interesów występuje, kiedy autor lub zakład pracy autora ma finansowe lub osobiste związki z innymi osobami lub instytucjami, które mogą wpływać na jego działania i decyzje.

Od Redakcji

Uprzejmie proszę PT. autorów o możliwie szybkie uregulowanie zaległych opłat za publikowanie artykułów w *Postępach Mikrobiologii.*
Z góry dziękujemy za pozytywny odzew na naszą prośbę.

Za Redakcję *PM.*
Jerzy Hrebenda

INFORMACJA DLA AUTORÓW
o opłatach za prace publikowane w Postępach Mikrobiologii

Uprzejmie informujemy PT Autorów PM, że zgodnie z decyzją Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów z dnia 6 lutego 2007 roku oraz z dnia 2 marca 2011 r. wprowadzono zasady płatności za prace przyjmowane do druku w naszym piśmie. Autorzy manuskryptów proszeni są o wnoszenie opłat w wysokości 250 PLN + VAT 23% – razem 307,50 PLN za każdy artykuł na **konto Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów:**

Bank Pekao S.A. 18 1240 5992 1111 0000 4774 7434.

Opłatę można wnosić indywidualnie. W tym przypadku dowód wpłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej. W imieniu Autorów opłatę może wnosić sponsorująca instytucja, fundacja itp. Wtedy Autorzy zobowiązani są do złożenia w Redakcji wraz z manuskryptem pisemnego zobowiązania się do bezzwłocznej opłaty za publikację po otrzymaniu faktury VAT. Należy dodatkowo:

- **Przesyłać zgłoszenia** proponowanych do publikacji artykułów wraz z danymi do wystawienia faktury VAT (NIP, nazwa i adres instytucji lub osoby fizycznej) na nr faksem (022) 841-29 49, lub drogą pocztową na adres siedziby Zarządu PTM: 00-725 Warszawa, ul. Chełmska 30/34.
- Do dowodu wpłaty lub zobowiązania zapłaty **dołączać informacje zawierające tytuł pracy i nazwisko autora korespondencyjnego.**

Otrzymanie przez Redakcję pracy wraz z kopią potwierdzenia wpłaty lub zobowiązaniem zapłaty jest warunkiem uruchomienia procedury wydawniczej.
W przypadku nie przyjęcia przez Redakcję do druku pracy zwrot opłaty wraz z korektą faktury dokonany będzie przez księgowość PTM.

INSTRUKCJA DLA AUTORÓW PRAC PUBLIKOWANYCH W SUPLEMENTACH DO KWARTALNIKA POSTĘPY MIKROBIOLOGII

W celu ułatwienia publikowania w jednym miejscu artykułów o podobnej problematyce, *Postępy Mikrobiologii* wydawać będą w formie suplementów, następujące prace naukowe:

1. Referaty z sesji plenarnych Zjazdów naukowych, Konferencji naukowych oraz Sympozjów organizowanych staraniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów oraz Komitetu Mikrobiologii Polskiej Akademii Nauk. Manuskrypt pojedynczego referatu nie powinien przekraczać 25-ciu stron i powinien być przygotowany wg Informacji dla Autorów *Postępów Mikrobiologii*. Całość materiałów przygotowanych do jednego suplementu nie może przekraczać 150 stron maszynopisu.
2. Streszczenia przyjętych przez organizatorów referatów oraz doniesień prezentowanych na ww. Zjazdach naukowych, Konferencjach oraz Sympozjach. Streszczenie nie powinno przekraczać jednej strony maszynopisu i kończyć się nie więcej jak trzema pozycjami cytowanego piśmiennictwa.

W suplemencie nie będą publikowane oryginalne prace doświadczalne prezentowane na ww. Zjazdach naukowych. Prace te po odpowiednim przygotowaniu, zgodnie z instrukcją dla autorów, można przesyłać do Redakcji *Polish Journal of Microbiology* (*Acta Microbiologica Polonica*) lub innego czsopisma naukowego.

Autorzy lub zamawiający suplement ponoszą pełny koszt jego opracowania oraz wydania. Możliwy jest druk czterech suplementów rocznie. Ponieważ materiały przeznaczone do suplementu nie są opracowywane oraz nie podlegają ocenie Zespołu Redakcyjnego *Postępów Mikrobiologii*, zamawiający suplement, tj. osoba upoważniona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub Komitet Mikrobiologii PAN, bierze całkowitą odpowiedzialność za redakcję oraz wartość merytoryczną suplementu. Wydanie suplementu powinno być poprzedzone jego akceptacją przez Zespół Redakcyjny *Postępów Mikrobiologii*.

Oferta Reklamy

Postępy Mikrobiologii udostępnią w każdym numerze kilka stron (łącznie z wewnętrznymi stronami okładek) **reklamie**.

Pismo nasze dociera co kwartał do kilku tysięcy odbiorców. Są wśród nich specjaliści różnych dziedzin mikrobiologii, pracujący jako nauczyciele wyższych uczelni, szkół średnich oraz pracownicy naukowi instytutów badawczych, biotechnolodzy oraz lekarze. Dużą grupę naszego pisma stanowią studenci.

Cena ogłoszenia czarno-białego wewnątrz numeru wynosi:
1/2 strony 250,– zł
cała strona 500,– zł
Proponujemy również ogłoszenia kolorowe – cena do uzgodnienia.

Teksty opracowanych graficznie reklam proszę składać na adres Redakcji Postępów Mikrobiologii, 02-007 Warszawa, ul. Oczki 3, tel. 628 08 22.

Redakcja nie ponosi odpowiedzialności za treść reklam i ogłoszeń

Uprzejmie informujemy PT Czytelników, że od września 2008 roku na stronie internetowej *Postępów Mikrobiologii* działa wyszukiwarka. Umożliwia ona odnajdywanie informacji zarówno w bieżących jak i archiwalnych zeszytach naszego pisma.

Redakcja i Administrator Strony Internetowej

SPIS TREŚCI

K. Szczypa, J. Wilemska, W. Hryniewicz, I. Sitkiewicz – Mechanizmy wirulencji *Streptococcus pyogenes* 3
J. Kądzielska, P. Obuch-Woszczatyński, H. Pituch, G. Młynarczyk – *Clostridium perfringens* jako czynnik etiologiczny biegunki poantybiotykowej 17
M. Binek – Mikrobiom człowieka – zdrowie i choroba 27
I. Mączka, S. Tylewska-Wierzbanowska – Choroby serca jako późne powikłania zakażeń odzwierzęcych przenoszonych przez kleszcze 37
B. Fiecek, T. Chmielewski, S. Tylewska-Wierzbanowska – Zakażenia *Bartonella* spp. ze szczególnym uwzględnieniem chorób oczu 47
J. Gajewska, M. K. Błaszczyk – Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB) 55

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY
B. Kończak, J. Karcz, K. Miksch – Nowoczesne techniki mikroskopowe i biologii molekularnej w ocenie granulowanej biomasy 67

INFORMACJE, KOMUNIKATY, RECENZJE 75

CONTENTS

K. Szczypa, J. Wilemska, W. Hryniewicz, I. Sitkiewicz – Patogenicity mechanisms of *Streptococcus pyogenes* 3
J. Kądzielska, P. Obuch-Woszczatyński, H. Pituch, G. Młynarczyk – *Clostridium perfringens* as the etiological agent of antibiotic associated diarrhoea 17
M. Binek – Human microbiome – health and disease 27
I. Mączka, S. Tylewska-Wierzbanowska – Heart disease as a late complications of zoonosis transmitted by a ticks 37
B. Fiecek, T. Chmielewski, S. Tylewska-Wierzbanowska – *Bartonella* sp. infections with particular emphasis on eye diseases 47
J. Gajewska, M. K. Błaszczyk – Probiotic lactic acid bacteria (LAB) 55

METHODS AND STANDARDS
B. Kończak, J. Karcz, K. Miksch – New microscopic and molecular biology techniques in the evaluation of granular biomass 67

INFORMATION, NEW REPORTS, BOOKS REVIEWS 75