

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Kwartalnik

Tom 51

Zeszyt 2•2012

KWIECIEŃ – CZERWIEC

CODEN:

PMKMAV 51 (2)

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 RÓŻAŁSKI (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)

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

Nakład 1150, Objętość 8 arkuszy wyd., Papier offset 90 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

Wanda Małek^{1*}, Sylwia Wdowiak-Wróbel¹, Małgorzata Targońska¹, Michał Kalita¹, Sebastian Gnat¹

¹ Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej,
ul Akademicka 19, 20-033 Lublin

Wpłynęło w marcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Systemy transportu K⁺ do komórki bakteryjnej. 2.1. System Trk. 2.2. System Ktr. 2.3. System Kdp. 2.4. System Kup. 3. Systemy wypływu K⁺ z komórki bakteryjnej. 4. Regulacja systemów transportu K⁺ do komórki bakteryjnej. 4.1. Kontrola systemów transportu K⁺ na poziomie ich aktywności. 4.2. Osmotyczna regulacja transportera Kdp na poziomie transkrypcji. 5. Podsumowanie

Osmoadaptation and potassium transport systems in Gram-negative bacteria

Abstract: Potassium (K⁺) is the major intracellular cation in bacterial cells. It plays a key role in maintaining the cell turgor, pH, adaptation to osmotic conditions, enzyme activation, and gene expression. The intracellular concentration of K⁺ is generally much higher than that in a growth medium and bacteria use a number of transporters and efflux pumps to maintain respective K⁺ concentration in cytoplasm. The best characterized K⁺ uptake systems in Gram-negative bacteria are: Trk, Kup, Ktr, and Kdp. Under hyperosmotic stress, in potassium-replete media at neutral and alkaline pH, the Trk system is the main K⁺ importer. It is a low – affinity, multiunit protein complex encoded by constitutively expressed genes that are. Under acidic conditions, when the activity of Trk is insufficient, a single component, i.e. the constitutive Kup transporter, with the affinity for K⁺ similar to that of the Trk system, is thought to be important. The Ktr transporter, resembling that of the Trk system, is composed of a membrane-spanning protein and a peripheral membrane-associated nucleotide – binding subunit. The Kdp-ATPase is a high affinity K⁺ uptake system that is expressed at very low potassium concentrations in the environment and in response to a decrease in cell turgor. Turgor, which is a signal and end the result of K⁺ import, is involved not only in the regulation of the Kdp transporter expression but also in the control of the activity of potassium uptake systems.

1. Introduction. 2. K⁺ uptake systems in bacterial cells. 2.1. Trk system. 2.2. Ktr system. 2.3. Kdp system. 2.4. Kup system. 3. K⁺ efflux systems in bacterial cells. 4. Regulation of K⁺ uptake systems. 4.1. Control of K⁺ uptake system activities. 4.2. Osmotic regulation of Kdp expression. 5. Summary

Słowa kluczowe: bakterie Gram-ujemne, osmoadaptacja, systemy importu K⁺: Trk, Kup, Ktr, Kdp

Key words: Gram-negative bacteria, K⁺ uptake systems: Trk, Kup, Ktr, Kdp, osmoadaptation

1. Wstęp

Bakterie należą do najbardziej zróżnicowanych pod względem zamieszkiwanych środowisk organizmów [36, 37]. Występują nawet w tych niszach środowiskowych, które ze względu na niekorzystne warunki nie są zasiedlane przez inne formy żywe. Jednym z czynników środowiskowych wpływających na wzrost organizmów jest jego osmolarność. Wyższe ciśnienie osmotyczne wewnątrz komórki niż podłoża umożliwia komórce utrzymanie turgoru niezbędnego do jej wzrostu i podziału [8, 12]. Zdolność adaptacji bakterii do zmian osmolarności środowiska zewnętrznego wiąże się z rozwojem szeregu strategii, które pozwalają im przeżyć w hiper- i hipoosmotycznych warunkach.

Wśród bakterii występują dwa mechanizmy odpowiedzi na wzrost osmolarności podłoża [37]. Wiele halofilnych bakterii i archeonów stosuje K⁺ jako główny, cytoplazmatyczny czynnik osmotycznie czynny. Organizmy te rosną tylko w podłożach o wysokim stężeniu NaCl, a równowagę osmotyczną zapewnia im wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie KCl. W cytoplazmie

Halobacterium sp. stężenie KCl dochodzi do 7 M. Adaptacja do tak wysokiego stężenia soli wiąże się z obecnością w białkach tych organizmów dużej liczby reszt aspartylowych i glutamylowych oraz reszt o słabej hydrofobowości [20, 37].

Większość organizmów prokariotycznych wykorzystuje K⁺ jako czynnik osmotycznie czynny tylko podczas wzrostu przy niskiej osmolarności. Przy wyższej osmolarności podłoża zachodzi dramatyczny wzrost stężenia związków zgodnych w cytoplazmie [7, 8, 22, 26, 31, 36, 37]. Związki zgodne są to małe, wysoce rozpuszczalne cząsteczki, bez ładunku w pH fizjologicznym, które nie wchodzą w reakcje z białkami i nie zaburzają metabolizmu komórki. Poza rolą w równoważeniu ciśnienia osmotycznego związki te funkcjonują jako efektywne stabilizatory enzymów, DNA, błon komórkowych, chronią przed zasoleniem, wysoką temperaturą, a nawet wysuszeniem. W tym przypadku, K⁺ działa jako wtórny przekaznik i stymuluje gromadzenie związków zgodnych.

Potas (K⁺) jest głównym wewnątrzkomórkowym kationem jednowartościowym u wszystkich organizmów żywych [7, 18]. U bakterii, pełni kluczową rolę

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej, ul Akademicka 19, 20-033 Lublin; tel.: (81) 537 59 76; e-mail: wanda.malek@poczta.umcs.lublin.pl

w adaptacji do zmieniających się warunków osmotycznych środowiska [12], bierze udział w utrzymaniu komórkowego turgoru [12] i cytoplazmatycznego pH [5, 26], reguluje aktywność i ekspresję wielu enzymów [12, 32]. Mimo, że w większości środowisk K^+ występuje w niewielkich ilościach (0.1–10 mM) to w cytoplazmie komórek bakteryjnych jego stężenie jest wysokie (300–500 mM) [3]. Aby utrzymać określone wewnętrzne stężenie K^+ , bakterie wykształciły kilka systemów transportujących potas, które różnią się kinetyką, źródłem energii i regulacją. Do najlepiej scharakteryzowanych importerów K^+ u *E. coli* i innych bakterii jelitowych należą systemy: Trk, Kdp, Kup i Ktr [12, 37]. System Trk, charakteryzujący się niskim powinowactwem do K^+ , jest głównym transporterem przy pH obojętnym i alkalicznym [35]. Jest to wielopodjednostkowy kompleks białkowy utworzony przez produkty genów, które ulegają konstytutywnej ekspresji. Transporter Ktr, przypominający system Trk, zbudowany jest z transbłonowego białka spinającego błonę i peryferyjnego białka związanego z błoną wiążącego nukleotydy (ATP, NAD^+ /NADH) [23]. Głównym transporterem K^+ do komórki przy pH kwaśnym jest system Kup o podobnym powinowactwie do K^+ jak system Trk, ale transportuje go 10 razy wolniej [40, 41]. Systemem indukcyjnym, ulegającym ekspresji przy niskim stężeniu K^+ w podłożu, jest transporter Kdp o wysokim powinowactwie do potasu [3, 12]. Aktywność transporterów potasu jest ściśle regulowana przez wewnętrz- i zewnątrzkomórkowe stężenie K^+ oraz turgor [12]. Jedynie w przypadku systemu Kdp ekspresja wiąże się ściśle ze wzrostem osmolarności podłoża [12]. Spadek ciśnienia turgorowego i/lub redukcja zewnątrzkomórkowego stężenia K^+ powoduje szybki wzrost ekspresji systemu Kdp. Ma to związek z transmisją sygnału przez sensorową kinazę KdpD do regulatora odpowiedzi KdpE, który stymuluje transkrypcję genów *kdp* [3].

2. Systemy transportu K^+ do komórki bakteryjnej

2.1. System Trk

Transporter Trk to wielokomponentowy kompleks zidentyfikowany u bardzo wielu bakterii i kilku gatunków archeonów. Jest to system o umiarkowanym powinowactwie do K^+ tj. ~1 mM, wysokiej specyficzności do tego kationu i bardzo wysokim V_{max} co pozwala odtworzyć pulę K^+ w minutę lub dwie [12, 37]. System Trk wyraża się konstytutywnie i w podłożu o stężeniu K^+ większym niż 1 mM jest dominującym transporterem tego kationu. Pobieranie K^+ zachodzi drogą symportu z protonem co energizuje ten proces.

Funkcjonowanie systemu Trk u *E. coli* i innych bakterii jelitowych determinują trzy różne, rozrzucone na chromosomie geny tj. *trkA*, *trkE* i *trkH* (u *Salmonella*

enterica sv. Typhimurium są to odpowiednio geny *sapG*, *sapD* i *sapJ*) [2, 7, 9, 12, 37]. Gen *trkA* koduje peryferyjne białko błonowe zbudowane z 458 aminokwasów, które wiąże NAD i z wyższą aktywnością NADH. Produktem genu *trkE* jest jeden z dwóch wiążących ATP komponentów transportera ABC zwanego Sap, który jako transporter toksycznych peptydów został po raz pierwszy zidentyfikowany u *S. enterica* sv. Typhimurium [28]. Dalsze badania wykazały, że oporność komórek na toksyczne peptydy wiąże się z określonym poziomem K^+ w cytoplazmie determinowanym przez system Trk.

Produktem genu *trkH* jest białko zbudowane z 483 aminokwasów, które spina błonę 10 razy i tworzy transbłonowy kanał translokujący K^+ do komórki [12].

Jonem preferowanym do transportu przez system Trk jest K^+ . System ten nie transportuje jonów Cs^+ , a stopień translokacji Rb^+ jest dziesięciokrotnie niższy niż K^+ [12]. Translokator Trk wymaga do aktywności zarówno siły protonomotorycznej (PMF) jak i ATP [33]. Siłą napędową tego transportera jest PMF, a wejściu jednego jonu K^+ towarzyszy wejście jednego protonu. W systemie Trk ATP nie służy jako źródło energii lecz pełni funkcję regulatorową. Stwierdzono bowiem, że produkt zmutowanego genu *trkE* (*sapD*) jest funkcjonalny i prawdopodobnie wiąże ATP, ale go nie hydrolizuje [12].

W niektórych szczepach *E. coli* K-12, które niosą defektywnego faga *rac*, w systemie Trk zamiast transbłonowego białka TrkH występuje białko TrkG [35]. Sekwencja aminokwasowa TrkG i TrkH jest w 41% identyczna, a niska zawartość GC (37%) w genie *trkG* sugeruje, że został on nabyty drogą horyzontalnego transferu z innego filogenetycznie odległego gatunku bakterii. Każdy z tych dwóch transbłonowych komponentów zapewnia pełną aktywność systemu Trk, ale specyficzność transportera zależy od rodzaju białka transbłonowego. Kiedy TrkG jest obecny, aktywność Trk tylko częściowo zależy od TrkE, jakkolwiek ATP jest niezbędny [14]. Wskazuje to, że komponenty wiążące ATP innych ABC transporterów mogą zastąpić TrkE kiedy TrkG jest obecny.

Systemy Trk, podobne do tych występujących w rodzinie *Enterobacteriaceae*, stwierdzono również u innych bakterii [12, 17]. U halofilnych archeonów zidentyfikowano geny homologiczne do bakteryjnych genów *trk* [23]. Ich produkty umożliwiają utrzymywanie wysokiego stężenia K^+ w cytoplazmie komórki, które równoważy wysoką osmolarność podłoża.

2.2. System Ktr

System Ktr, zidentyfikowany u wielu bakterii, zbudowany jest z dwóch komponentów tj. KtrA i KtrB [25]. KtrA wykazuje niski stopień pokrewieństwa z TrkA, a KtrB z TrkH. Transporter Ktr posiada region homologiczny do domeny wiążącej NAD niektórych dehy-

drogenaz, podobnie jak TrkA. Źródłem energii dla systemu Ktr u *Vibrio alginolyticus* jest symport K^+/Na^+ , a nie jak w przypadku transportera Trk symport K^+/H^+ [39]. Niezbędne są jednak dalsze badania mające na celu wyjaśnienie czy u wszystkich organizmów system Ktr energizowany jest symportem K^+/Na^+ czy tylko u mikroorganizmów morskich. System Ktr wykazuje również zdolność transportu Rb^+ i to z taką samą maksymalną szybkością jak K^+ , jakkolwiek powinowactwo do Rb^+ jest 5-krotnie niższe.

U *Bacillus subtilis* zidentyfikowano dwa systemy Ktr [15]. Jeden z nich, KtrAB ma niskie powinowactwo do K^+ w zakresie 1 mM, podczas gdy powinowactwo systemu KtrCD wynosi około 10 mM. Kiedy oba systemy są zmutowane, bakterie wymagają do wzrostu przynajmniej 25 mM K^+ w środowisku zewnętrznym. Ekspresja systemów Ktr nie zależy od stężenia K^+ w podłożu, ale transkrypcja ich genów jest większa kiedy inne systemy, w wyniku mutacji, nie funkcjonują. Transportery Ktr pełnią istotną rolę w adaptacji bakterii do podwyższonej osmolarności środowiska zewnętrznego zawierającego 2–4 mM K^+ . Adaptacja do wysokiej osmolarności podłoża wymaga obecności w nim odpowiednio zwiększonego stężenia K^+ [12].

2.3. System Kdp

Trzeci system transportu K^+ , zidentyfikowany u *E. coli* i innych bakterii, to Kdp [1, 3, 12, 22, 31]. Jest to system indukcyjny o wysokim powinowactwie ($\sim 2 \mu M$) i specyficzności do K^+ . Kdp jest ATPazą typu P zbudowaną z czterech podjednostek: KdpFABC, które związane są z błoną komórkową [1, 3, 12]. KdpF jest małym 29 aminokwasowym peptydem hydrofobowym prawdopodobnie istotnym dla stabilności i być może składania transportera Kdp, ale nie dla jego funkcjonowania. KdpA to transbłonowy, 557 aminokwasowy peptyd spinający błonę w formie 12 α -helikalnych segmentów i uczestniczący w wiązaniu K^+ (peryplazmatyczne pętle między transbłonowymi helisami 2–3, 4–5 i 10–11) i jego translokacji przez błonę wewnętrzną (helisy 5, 6, 7 i 8). Podjednostką katalityczną, homologiczną z dużą podjednostką innych ATPaz typu P, jest podjednostka KdpB, która składa się z 682 aminokwasów i zawiera wysoce konserwatywne miejsce fosforylacji. Jest to integralne białko błonowe z sześcioma α -helisami spinającymi błonę, z dwiema cytoplazmatycznymi domenami i małym peryplazmatycznym regionem. Na podstawie podobieństwa sekwencji KdpB i innych ATPaz typu P można wnioskować, że: miejsce fosforylacji zaczyna się od asparaginy w pozycji 307, a w pętli wiążącej ATP mieszczą się trzy reszty asparaginianowe: Asp447, Asp473 i Asp522. KdpC to 190 aminokwasowe białko, które jedną helisą położoną blisko końca NH_2 , spina błonę komórkową. Pozostała część tego białka znajduje

się wewnątrz komórki w formie dwóch antyrównoległych β -kartek i jednej amfipatycznej α -helisy przy końcu COOH. Funkcją KdpC jest składanie kompleksu Kdp.

2.4. System Kup

Jest to system konstytutywny (wcześniej znany jako TrkD) o niskim powinowactwie i szybkości transportu K^+ do komórki ($K_m \sim 0.5 \text{ mM}$, $V_{max} 0.1 \mu\text{mol } K^+/\text{min}/\text{mg}$ białka), który kodowany jest przez gen *trkD* [40]. System ten tworzy pojedyncze, 622 aminokwasowe białko zbudowane z dwóch domen tj. transbłonowej, która spina błonę komórkową 12 razy i C-terminalnej, 182 aminokwasowej, ulokowanej na cytoplazmatycznej stronie błony [41]. System Kup działa dzięki sile protonomotorycznej i przy niskim pH, kiedy aktywność transportera Trk jest niewystarczająca, a system Kdp, o wysokim powinowactwie do K^+ , nie jest indukowany [41].

3. Systemy wpływu K^+ z komórki bakteryjnej

Jednym z argumentów przemawiających za istnieniem systemów eksportu K^+ z komórki bakteryjnej jest konieczność redukcji stężenia tego jonu kiedy turgor w szoku hipoosmotycznym staje się niebezpiecznie wysoki [23]. Ponadto, stopniowy wpływ K^+ zachodzi również przy wysokiej osmolarności podłoża zawierającego tzw. związki zgodne (betaina glicynowa, ektoina), które transportowane są do komórki i działają osmoprotekcyjnie. Aby zapobiec nadmiernemu wzrostowi turgoru, wynikającego z obecności związków zgodnych w cytoplazmie, K^+ eksportowany jest z komórki.

U *E. coli* i innych bakterii Gram-ujemnych dokładnie scharakteryzowano dwa systemy eksportu K^+ : KefB i KefC [13]. Każdy z nich jest dużym białkiem, z N-terminalnym transbłonowym regionem i dużą C-terminalną domeną, prawdopodobnie cytoplazmatyczną, która wiąże nukleotydy. Oba transportery mają ponadto mniejsze rozpuszczalne białko, YheR i YabF. Ich brak wiąże się z bardzo niską aktywnością systemów KefB i KefC.

W wpływie K^+ bardzo ważną rolę pełnią antyporterzy K^+/H^+ obecne u większości bakterii [6]. Mają one umiarkowane powinowactwo do K^+ ($K_m \sim 2.5 \text{ mM}$) i niską specyficzność substratów, a z eksportem K^+ konkurują jony Na^+ , Rb^+ i Li^+ . Mutanty, które nie mają aktywności antyporterowej K^+/H^+ są niezdolne do wzrostu przy wysokiej osmolarności i wysokim pH podłoża [29].

W eksporcie K^+ z komórki bakteryjnej uczestniczą również specjalne kanały homologiczne z kanałami eukariotycznymi. Są to między innymi: kanał KcsA *Streptomyces lividans* bramkowany protonami i MthK *Methanobacterium thermoautotrophicum* bramkowany Ca^{2+} [10, 16]. Kanał KcsA wykazuje najwyższą przewodność dla K^+ , nieco niższą dla Rb^+ , Tl^+ oraz NH_4^+

i ponad 1000 razy niższą przewodność dla Na^+ , Li^+ i Cs^+ [21]. Kanał MthK bardziej preferuje jony K^+ niż Na^+ [16]. Fizjologiczna funkcja tych kanałów nie jest dotychczas poznana.

Innym rodzajem bakteryjnych kanałów jonowych są mechanoczułe kanały reagujące na naprężenia błony komórkowej, które chronią bakterie przed nagłym spadkiem ciśnienia osmotycznego w środowisku [4, 12, 19]. U *E. coli* zidentyfikowano trzy typy tych kanałów tj. MscL, MscS i MscM, odpowiednio o dużej (3 nS-nano-siemens), średniej (1 nS) i małej (0.3 nS) przewodności, z których MscL i MscS należą do najlepiej poznanych kanałów mechanoczułych [38]. Struktura krystaliczna kanału MscL *Mycobacterium tuberculosis* pokazała, że jest to homopentamer, a każda podjednostka zbudowana jest z dwóch helis transbłonowych TM1 i TM2 [4]. Przejście ze stanu zamkniętego do otwartego wiąże się ze zmianą kąta nachylenia helisy TM1 do osi kanału z 32 do 71°. W otwartej konformacji kanał ten ma por o średnicy 30–40 Å. Z kolei analiza struktury krystalicznej kanału MscS *E. coli* wykazała, że jest to heptamer z trzema transbłonowymi helisami: TM1, TM2 i TM3 w każdej monomerycznej podjednostce z silnie rozbudowanymi cytoplazmatycznymi regionami, których funkcja nie jest znana [19]. Por kanału MscS i jego bramkę tworzą helisy TM3. Ochronną funkcję kanałów mechanoczułych potwierdza fakt, że szok hipoosmotyczny przeżywa tylko 10% mutantów, które nie syntetyzują MscL i MscS i aż 90% komórek dzikiego typu oraz komórek, które nie syntetyzują MscL lub MscS.

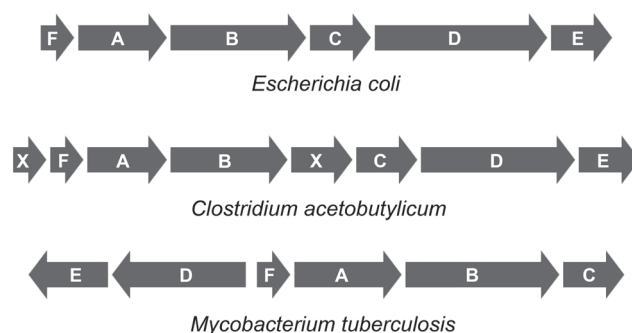
4. Regulacja systemów transportu K^+ do komórki bakteryjnej

4.1. Kontrola systemów transportu K^+ na poziomie ich aktywności

Ponad pół wieku temu stwierdzono, że u *E. coli* wraz ze wzrostem osmolarności podłoża wzrasta transport K^+ do komórki zachodzący w stopniu odwrotnie proporcjonalnym do stężenia tych jonów w cytoplazmie [27]. Fakt ten potwierdzono także u innych gatunków bakterii [12]. Dokładny mechanizm regulacji tego procesu nie jest znany, ale przyjmuje się, że spadek turgoru, w odpowiedzi na wzrost ciśnienia osmotycznego podłoża, powoduje aktywację białek transportujących K^+ do komórki. Model ten wyjaśnia przejściowy wzrost pobierania potasu tj. do momentu przywrócenia w komórce turgoru. Zgodnie z tym modelem, podczas normalnego wzrostu, turgor w komórce jest nieco poniżej optymalnego co zapewnia stałą stymulację transportu K^+ na poziomie odpowiednim do potrzeb komórki. Kiedy wzrost bakterii zostaje zahamowany, turgor komórki zwiększa się w niewielkim stopniu i import K^+ ustaje [11].

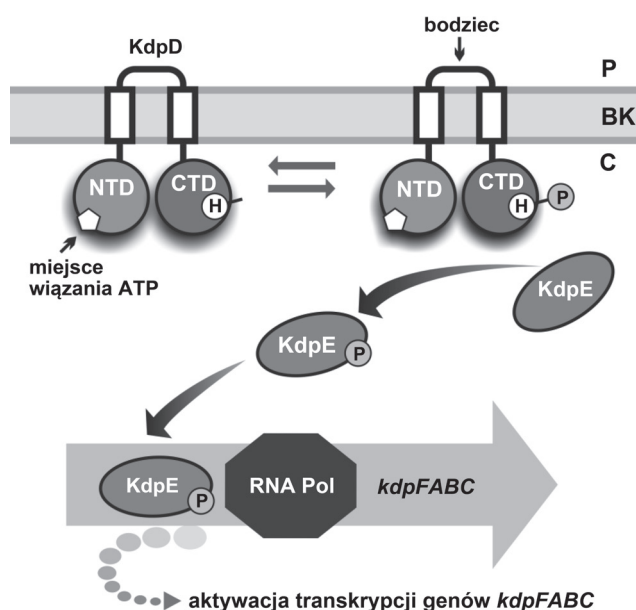
4.2. Osmotyczna regulacja transportera Kdp na poziomie transkrypcji

Wśród bakteryjnych transporterów K^+ jedynie ekspresja systemu Kdp regulowana jest na poziomie transkrypcji genów [3, 12]. Indukcja strukturalnych genów tego translokatora zachodzi przy udziale dwóch białek, KdpD i KdpE, które tworzą dwuskładnikowy system transdukcji sygnału. Wszystkie bakteryjne operony *kdp* są represowane podczas wzrostu w podłożu o wysokim stężeniu K^+ ($[\text{K}^+]_e$), a u *E. coli*, ekspresja genów *kdp* zachodzi przy zewnątrzkomórkowym stężeniu K^+ poniżej 2 mM [3]. Regulatorowe białka KdpD/E *E. coli* kodowane są przez operon, który zachodzi na operon genów kodujących funkcjonalne komponenty transportera Kdp, tj. *kdpF*, *kdpA*, *kdpB* i *kdpC* [1, 3]. W genie *kdpC* mieści się względnie słaby promotor i miejsce startu transkrypcji operonu *kdpD/E*, z tym że większość transkrypcji rozpoczynających się w promotorze operonu *kdpFABC* kończy się w genie *kdpD*, ale niektóre obejmują również gen *kdpE*. Ułożenie genów strukturalnych *kdpABC* w operonie jest generalnie podobne u wielu bakterii w przeciwieństwie do różnej lokalizacji genów regulatorowych *kdpD/E* (Rys. 1). Geny operonu regulatorowego kodują parę białek tj. duże białko sensorowe KdpD, związane z błoną komórkową o aktywności autokinazy, fosfotransferazy i fosfatazy oraz mniejsze cytoplazmatyczne białko efektorowe KdpE, zwane „regulatorem odpowiedzi”, które jest fosforylowane na reszcie aspartylowej przez białko sensorowe [30]. Ufosforylowane białko KdpE (KdpE~P) staje się transkrypcyjnym aktywatorem, wiąże się do sekwencji leżącej powyżej promotora operonu *kdpABC* i indukuje jego transkrypcję (Rys. 2). Sensorowe białko KdpD działa również jako fosfataza i usuwając resztę fosforanową z KdpE~P znosi jego aktywność transkrypcyjną. W sekwencji aminokwasowej 98.5-kD białka KdpD *E. coli* można wyróżnić duże cytoplazmatyczne terminalne regiony COOH i NH_2 przedzielone czterema transbłonowymi domenami. W domenie N-terminalnej



Rys. 1. Organizacja operonu *kdp* u bakterii

Strzałki wskazują kierunek transkrypcji określony na podstawie sekwencji nukleotydowej (Rysunek pochodzi z pracy: Ballal A., Basu B., Apte S.K., *J. Biosci.* 32, 559–568 (2007) za zgodą redakcji czasopisma)



Rys. 2. Aktywacja operonu *kdpFABC* przez dwuskładnikowy system transdukcji sygnału KdpD/KdpE

P – peryplazma, BK – błona komórkowa, C – cytoplazma, NTD – domena N'-terminalna, CTD – domena C'-terminalna, H – konserwatywna histydyna, P – fosforylacja, RNA Pol – polimeraza RNA (Rysunek pochodzi z pracy: Ballal A, Basu B., Apte S.K., *J. Biosci.* 32, 559–568 (2007) za zgodą redakcji czasopisma)

stwierdzono dwa motywy bardzo podobne do motywów „Walker A” i „Walker B”, które wiążą ATP i prawdopodobnie pełną ważną rolę w dostosowywaniu aktywności KdpD do aktualnych potrzeb komórki bakteryjnej. W domenie C-terminalnej występuje konserwatywna reszta histydynowa, która ulega fosforylacji. Przyjmuje się, że ułożone w błonie komórkowej białko KdpD jest sensorem napięcia błonowego, które odzwierciedla wielkość ciśnienia turgorowego. Konformacyjne zmiany błony komórkowej, związane ze spadkiem ciśnienia turgorowego, indukują autofosforylację białka sensorowego KdpD. Wykazana *in vitro* autofosforylacja KdpD i transfer reszty fosforanowej na białko KdpE, które wiąże się z DNA [1], potwierdza ideę, że ciśnienie turgorowe poprzez fosforylację dwukomponentowego systemu KdpD/E jest sygnałem do ekspresji genów *kdp*. Model ten nie może być jednak precyzyjnie badany z powodu trudności mierzenia turgoru w komórkach bakteryjnych.

5. Podsumowanie

Jon potasu jest jednym z najważniejszych, jednowartościowych kationów występujących w cytoplazmie komórki, który służy jako wewnątrzkomórkowy osmolit utrzymujący turgor komórki [12]. U bardzo wielu gatunków bakterii, wewnątrzkomórkowe stężenie K^+ jest proporcjonalne do osmolarności podłoża i wykazuje

pozytywną korelację ze stopniem osmotolerancji mikroorganizmu [8, 12, 37]. U *E. coli*, będącej w logarytmicznej fazie wzrostu, stężenie K^+ w cytoplazmie zwiększa się z 0.15 do 0.55 M przy wzroście osmolarności podłoża z 0.1 do 1.2 osm. Korelacja ta ma miejsce jedynie w przypadku związków osmotycznie czynnych, które nie przenikają przez błonę komórkową (NaCl, sacharoza, glukoza), nie występuje zaś w przypadku związków, które swobodnie dyfundują przez błonę komórkową (glicerol) [8]. Wskazuje to, że sygnałem do akumulacji K^+ nie jest spadek aktywności wodnej cytoplazmy, a utrata turgoru. U większości bakterii, gromadzenie K^+ po szoku hiperosmotycznym jest tylko przejściowe i po 30 minutach od jego wystąpienia rozpoczyna się usuwanie K^+ z komórki, a funkcję ochronną przejmują tzw. związki zgodne [8].

W celu utrzymania odpowiedniego wewnątrzkomórkowego stężenia potasu, bakterie wykształciły wiele różnych systemów transportujących ten kation do i z komórki [12, 37]. Do najlepiej poznanych importerów K^+ u bakterii Gram-ujemnych należą transportery: Trk, Kdp, Ktr i Kup. System Trk, o niskim powinowactwie do K^+ , jest głównym importerem tego jonu do komórek rosnących w podłożu o pH obojętnym i zasadowym oraz wysokim stężeniu K^+ . Jest to wielopodjednostkowy kompleks białkowy wyrażany konstytutywnie. Podobne powinowactwo do K^+ , jak system Trk ma transporter Kup zbudowany z pojedynczego białka, który jest głównym importerem potasu w podłożu o pH kwaśnym. U wielu bakterii, u których nie stwierdzono transportera Trk, jak np. *Mycoplasma pneumoniae*, *Deinococcus radiodurans*, jak i tych posiadających ten transporter funkcjonuje Na^+/K^+ syporter Ktr. Importer ten zbudowany jest z transbłonowego białka KtrB i peryferyjnego białka KtrA związanego z błoną wiążącego nukleotydy. Kiedy aktywność opisanych transporterów potasu jest niewystarczająca, z powodu niskiego stężenia K^+ , indukcji ulega system Kdp o wysokim powinowactwie do substratu, który należy do ATPaz typu P. Jest to kompleks czterech białek błonowych: KdpF, KdpA, KdpB i KdpC kodowanych przez operon *kdpFABC*, który ulega ekspresji w odpowiedzi na spadek ciśnienia turgorowego. Niski turgor jest sygnałem aktywującym dwukomponentowy system transdukcji sygnału, zbudowany z sensorowej kinazy KdpD i regulatora odpowiedzi KdpE kontrolującego ekspresję operonu *kdpFABC*.

Związek między transportem K^+ u bakterii, a turgorem wskazuje, że homeostatyczny mechanizm przywracania turgoru przy wzroście osmolarności podłoża wiąże się ze zwiększonym importem potasu. Osmotycznie indukowana akumulacja K^+ , będąca główną lub pierwszą fazą osmoadaptacji, zachodzi poprzez szybką aktywację systemów transportu o niskim i wysokim powinowactwie do K^+ , a w przypadku transportera Kdp także na poziomie transkrypcji kodujących go genów.

Piśmiennictwo

- Altendorf K., Siebers A., Epstein W.: The KDP ATPase of *Escherichia coli*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **671**, 228–243 (1992)
- Bakker E.P.: Low-affinity K⁺ uptake systems (w) Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes, red. E.P. Bakker, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1993, s. 253
- Ballal A., Basu B., Apte S.K.: The KDP-ATPase system and its regulation. *J. Biosci.* **32**, 559–568 (2007)
- Blount P., Moe P.C.: Bacterial mechanosensitive channels: integrating psychology, structure and function. *Trends Microbiol.* **10**, 420–424 (1999)
- Booth I.R.: Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**, 359–378 (1985)
- Brey R.N., Ronsen B.P., Sorensen E.N.: Cation/proton antiport systems in *Escherichia coli*: absence of potassium/proton antiporter. *J. Biol. Chem.* **255**, 39–44 (1980)
- Corratgé-Faillie C., Jabnoute M., Zimmermann S., Véry A.-A., Fizames C., Sentenac H.: Potassium and sodium transport in non-animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 2511–2532 (2010)
- Csonka L.N.: Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53**, 121–147 (1989)
- Dosch D.C., Helmer G.L., Sutton S.H., Salvacion F.F., Epstein W.: Genetic analysis of potassium transport loci in *Escherichia coli*: evidence for three constitutive systems mediating uptake of potassium. *J. Bacteriol.* **173**, 687–696 (1991)
- Doyle D.A., Cabral J.M., Pfuetzner R.A., Kuo A.L., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R.: The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **280**, 69–77 (1998)
- Epstein W.: Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS*, **39**, 73–78 (1986)
- Epstein W.: The roles and regulation of potassium in bacteria. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **75**, 293–320 (2003)
- Ferguson G.P.: Protective mechanisms against toxic electrophiles in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* **7**, 242–247 (1999)
- Harms C., Domoto Y., Celik C., Rahe E., Stumpe S., Schmidt R., Nakamura T., Bakker E.P.: Identification of the ABC protein SapD as the subunit that confers ATP dependence to the K⁺-uptake systems Trk^H and Trk^G from *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, **147**, 2991–3003 (2001)
- Haltmann G., Bakker E.P., Uozumi N., Bremer E.: KtrAB and KtrCD: two K⁺-uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J. Bacteriol.* **185**, 1289–1298 (2003)
- Jiang Y., Lee A., Chen J., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R.: Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature*, **417**, 515–522 (2002)
- Johnson H.A., Hampton E., Lesley S.A.: The *Thermotoga maritima* Trk potassium transporter- from frameshift to function. *J. Bacteriol.* **191**, 2276–2284 (2009)
- Kem D.C., Trachewsky D.: Potassium metabolism (w) Potassium: its biologic significance, red. R. Wang, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1983, s. 23
- Koprowski P., Grajkowski W., Kubalski A.: Bakteryjne kanały jonowe jako struktury modelowe. *Kosmos*, **54**, 373–37 (2005)
- Lanyi J.K.: Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **38**, 272–290 (1974)
- LeMasurier M., Heginbotham L., Miller C.: KcsA: it's a potassium channel. *J. Gen. Physiol.* **118**, 303–313 (2001)
- Luttman D., Heermann R., Zimmer B., Hillmann A., Rampp I.S., Jung K., Gorke B.: Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA^{Ntr} in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **72**, 978–994 (2009)
- Meury J., Kohiyama M.: ATP is required for K⁺ active transport in the archaeobacterium *Haloferax volcanii*. *Arch. Microbiol.* **151**, 530–536 (1989)
- Meury J., Robin A., Monnier-Champeix P.: Turgor-controlled K⁺ fluxes and their pathways in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **151**, 613–619 (1985)
- Nakamura T., Yuda R., Unemoto T., Bakker E.P.: KtrAB, a new type of bacterial K⁺-uptake system from *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* **180**, 3491–3494 (1998)
- Ochrombel I., Ott L., Krämer R., Burkovski A., Marin K.: Impact of improved potassium accumulation on pH homeostasis, membrane potential adjustment and survival of *Corynebacterium glutamicum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 444–450 (2011)
- Ørskov S.L.: Experiments in active and passive permeability of *Bacillus coli* communis. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **25**, 277–283 (1948)
- Parra-Lopez C., Lin R., Aspedon A., Groisman E.A.: A *Salmonella* protein that is required for resistance to antimicrobial peptides and transport of potassium. *EMBO J.* **13**, 3964–3972 (1994)
- Plack R.H., Rosen B.P.: Cation/proton antiport systems in *Escherichia coli*: absence of potassium/proton antiporter activity in a pH-sensitive mutant. *J. Biol. Chem.* **225**, 3824–825 (1980)
- Polarek J.W., Williams G., Epstein W.: The products of the *kdpDE* operon are required for expression of the KDP ATPase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 2145–2151 (1992)
- Prell J., Mulley G., Haufe F., White J.P., Williams A., Karunakaran R., Downie J.A., Poole P.S.: The PTS^{Ntr} system globally regulates ATP-dependent transporters in *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* **84**, 117–129 (2012)
- Prince W.S., Villarejo M.R.: Osmotic control of *proU* transcription is mediated through direct action of potassium glutamate on the transcription complex. *J. Biol. Chem.* **265**, 17673–17679 (1990)
- Rhoads D.B., Epstein W.: Energy coupling to net K⁺-transport in *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **252**, 1394–1401 (1977)
- Schleyer M., Bakker E.: Nucleotide sequence and 3'-end deletion studies indicate that K⁺ uptake protein Kup from *Escherichia coli* is composed of a hydrophobic core linked to a large and partially essential hydrophilic C terminus. *J. Bacteriol.* **175**, 6925–6931 (1993)
- Schlösser A., Meldorf W., Stumpe S., Bakker E.P., Epstein W.: TrkH and its homolog, TrkG, determine the specificity and kinetics of cation transport by the Trk system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 1908–1910 (1995)
- Shabala L., Bowman J., Brown J., Ross T., McMeekin T., Shabala S.: Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmotica. *Environ. Microbiol.* **11**, 137–148 (2009)
- Sleator R.D., Hill C.: Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 49–71 (2001)
- Sukharev S.I., Martinac B., Arshavsky V.Y., Kung Ch.: Two types of mechanosensitive channels in the *Escherichia coli* cell envelope: solubilization and functional reconstitution. *Biophys. J.* **65**, 177–183 (1993)
- Tholema N., Bakker E.P., Suzuki A., Nakamura T.: Change to alanine of one out of four selectivity filter glycines in KtrB causes a two order of magnitude decrease in the affinities for both K⁺ and Na⁺ of the Na⁺-dependent K⁺ uptake system KtrAB from *Vibrio alginolyticus*. *FEMS Lett.* **450**, 2170220 (1999)
- Trchounian A., Kobayashi H.: Kup is the major K⁺ uptake system in *Escherichia coli* upon hyperosmotic stress at low pH. *FEMS Lett.* **447**, 144–148 (1999)
- Zakharyan E., Trchounian A.: K⁺ influx by Kup in *Escherichia coli* is accompanied by a decrease in H⁺ efflux. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 61–64 (2001)

Ilona Stefańska^{1,2}, Tomasz Dzieciatkowski^{3*}, Grażyna Młynarczyk³

¹Zakład Technologii Fermentacji, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

²Zakład Badania Wirusów Grypy. Krajowy Ośrodek ds. Grypy, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
– Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

³Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

Wpłynęło w lutym 2012 r.

1. Wstęp. 2. Ogólna budowa wirusów grypy 3. Zakażenia wirusami grypy u pacjentów z niedoborami immunologicznymi 4. Powikłania pogrypowe u osób z upośledzoną odpornością 5. Profilaktyka zakażeń wirusami grypy 6. Metody diagnostyczne stosowane w badaniu zakażeń wirusami grypy 7. Terapia zakażeń powodowanych przez ortomyksowirusy 8. Podsumowanie

Infections with orthomyxoviruses in patients with immunological disorders

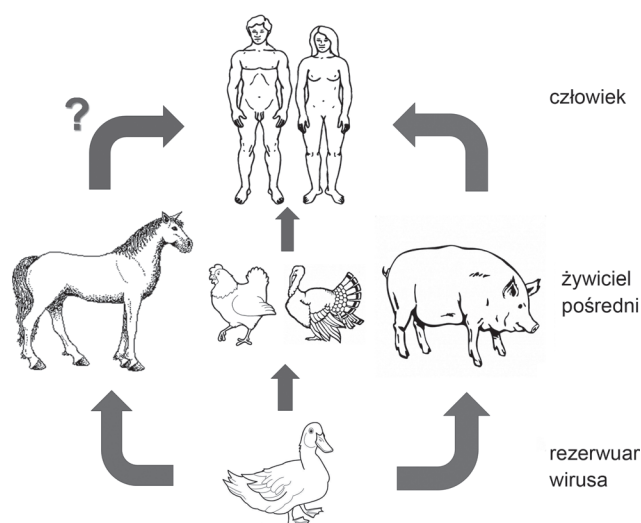
Abstract: *Orthomyxoviridae* is a family of enveloped viruses which contain a segmented negative strand RNA genome. They cause recurrent, seasonal epidemics and occasional global pandemics with different levels of morbidity and mortality, especially in transplant recipients. Infections with influenza A and/or B viruses may lead to complications including viral pneumonia, secondary bacterial infections and graft dysfunction. The ability of influenza viruses to undergo reassortment events ensures constant generation of new strains with unpredictable degrees of pathogenicity and transmissibility. Molecular diagnostics are preferred over other diagnostic methods, if available. Influenza vaccination is well tolerated and provides protective benefit in most immunocompromised hosts; in those with contraindications to vaccination or in whom responses are predicted to be poor, antivirals may be considered. Antiviral therapy is associated with improved outcomes in transplant patients and treatment should be continued until clinical and virologic response have been documented. Resistance, particularly in patients infected with the pandemic influenza A/H1N1, should be considered and treated with an antiviral with predictable activity.

1. Introduction. 2. Morphology of orthomyxoviruses. 3. Influenza virus infections in immunocompromised hosts. 4. Post-influenza infectious complications. 5. Prophylaxis of influenza. 6. Diagnostics in influenza infections. 7. Treatment of infection caused by orthomyxoviruses. 8. Summary

Słowa kluczowe: wirus grypy, reasortacja antygenowa, szczepienia, immunosupresja
Key words: orthomyxoviruses, antigenic shift, vaccination, immunosuppression

1. Wstęp

Ortomyksowirusy stanowią niewielką, ale ważną rodzinę, do której należą wirusy grypy, powszechnie wywołujące zakażenia układu oddechowego u zwierząt i ludzi (Rys. 1). Grypa jest ostrą chorobą zakaźną charakteryzującą się sezonowością oraz wysoką zachorowalnością i śmiertelnością na całym świecie [3, 66]. W rodzinie *Orthomyxoviridae* wyróżnia się trzy rodzaje wirusa grypy: A, B i C, różnicowane na podstawie budowy antygenowej białka błonowego (M) oraz nukleoproteiny (NP). Wirusy grypy typu A krążą wśród ludzi i wielu innych gatunków ssaków oraz ptaków, podczas gdy zakażenia wirusem typu B występują wyłącznie u ludzi, a typu C u ludzi i świń. Wirusy grypy typu A i B wywołują podobne objawy chorobowe, jednak zakażenia typem B mają zwykle łagodniejszy charakter i prowadzą do mniejszej liczby hospitalizacji. Wirus typu C różni się budową od pozostałych typów a w zakażeniach u ludzi odgrywa znacznie mniej istotną rolę, wywołując najczęściej zakażenia bezobjawowe [10].



Rys. 1. Schemat krążenia wirusów grypy w środowisku
[wg 3, 66; zmienione]

W omówione zostaną więc wyłącznie wirusy grypy typu A i B oraz wywoływane przez nie zakażenia u osób z niedoborami odporności.

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel: 022 599 17 74; e-mail: dzieciatkowski@wp.pl

2. Budowa wirusów grypy

Wiriony wirusów grypy mają najczęściej kształt sferyczny i średnicę między 80 a 120 nm, choć szczepy laboratoryjne może charakteryzować duży polimorfizm (formy wydłużone, nitkowate) [22]. Otoczone są one podwójną osłonką lipidową, w której umieszczone jest białko błonowe M2 oraz dwie glikoproteiny, hemaglutynina (HA) i neuraminidaza (NA), tworzące na powierzchni charakterystyczne wypustki i stanowiące główne antygeny powierzchniowe. Pod osłonką znajduje się warstwa białka błonowego M1 otaczająca nukleokapsyd, rdzeń wirionu, w skład którego wchodzi genomowe RNA połączone z białkami strukturalnymi NP oraz kompleksem polimeraz PA, PB1 i PB2 [66].

Genom ortomyksowirusów zawiera od 6 do 8 segmentów, zbudowanych z jednoniciowego RNA o polaryzacji ujemnej – ss(–)RNA, które liczy około 12–15 tys. zasad [22]. Na obu krańcach genomu występują sekwencje powtarzalne, o długości 12–13 nukleotydów na końcu 5' oraz 9–11 nukleotydów na końcu 3'. Taka budowa genomu wirusów grypy powoduje ich znaczny stopień zmienności i różnorodności antygenowej w obrębie szczepów. Mechanizmy ciągłej ewolucji ortomyksowirusów spowodowane są głównie poprzez gromadzenie w wirusowym genomie mutacji punktowych wynikających z błędów zachodzących podczas replikacji (brak zdolności naprawczej polimerazy RNA) (zmiany określane jako tzw. przesunięcie antygenowe, ang. *drift*) oraz zjawisko reasortacji (tzw. skok antygenowy, ang. *shift*), czyli wymiana całych segmentów RNA pomiędzy różnymi wariantami wirusów zakażających tą samą komórkę [10, 22].

Ewolucja wirusa grypy dotyczy wszystkich ośmiu segmentów, jednakże najbardziej znaczące zmiany zachodzą w przypadku segmentu kodującego HA i NA, białka pełniące istotne funkcje zarówno w procesie zakażenia komórek, rozprzestrzeniania wirusa, jak i indukowania odpowiedzi immunologicznej gospodarza (produkcja przeciwciał neutralizujących). Na podstawie budowy antygenowej HA i NA wśród wirusów grypy typu A jak dotąd zidentyfikowano 16 odmiennych podtypów (serotypów) hemaglutyniny (H1-H16) oraz 9 podtypów neuraminidazy (N1-N9). U ludzi stwierdzono powszechne występowanie tylko trzech podtypów H1N1, H3N2 i H2N2. Sporadycznie opisywane są także przypadki zakażenia podtypami H5N1, H9N2, H1N2, H7N2 i H7N7 [3, 10].

Obecność lipoproteinowej otoczki powoduje stosunkowo niską odporność ortomyksowirusów na inaktywację za pomocą czynników fizycznych i chemicznych. W temperaturze 20°C wirusy grypy mogą przetrwać w środowisku do ośmiu godzin, jednak powyżej tej temperatury ich stabilność wyraźnie ulega zmniejszeniu: temperatura 56°C inaktywuje je w ciągu 180 minut, zaś

60°C w czasie 30 minut [51]. Wiriony grypy są natomiast słabo wrażliwe na zamrożenie, bowiem ich otoczka lipidowa w tych warunkach ulega stabilizacji, a sam wirus dłużej pozostaje wirulentny.

3. Zakażenia wirusami grypy u pacjentów z niedoborami immunologicznymi

U osób z osłabionymi mechanizmami obrony immunologicznej, podobnie jak w przypadku pozostałej części populacji, występowanie infekcji grypowych charakteryzuje się zazwyczaj sezonowością. Jednakże ryzyko zakażenia wirusem grypy może być znacznie większe i nieść ze sobą szczególne zagrożenie życia [12, 50]. Ponadto z uwagi na często wydłużony pobyt w szpitalu osoby takie bardziej narażone są na zakażenia szpitalne wirusami atakującymi drogi oddechowe. Couch wykazał, że infekcje szpitalne wywołane wirusem grypy mogą stanowić nawet między 63 a 83% wszystkich infekcji grypowych występujących u pacjentów z niedoborem odporności [17]. Źródłem zakażeń mogą być osoby odwiedzające, jak i inni pacjenci oraz personel medyczny.

Od statusu immunologicznego gospodarza zależy szybkość ustąpienia objawów choroby. Przebieg grypy u osób z niedoborem odporności różni się od zakażeń u osób immunokompetentnych często dłuższym czasem trwania infekcji i wydłużonym okresem wydalania wirionów potomnych, cięższym przebiegiem, zwiększonym ryzykiem wystąpienia poważnych powikłań pogrypowych nie tylko ze strony układu oddechowego oraz wyższą śmiertelnością [31, 46, 57]. Jednocześnie często wydłużony okres wydalania wirionów potomnych i związana z tym konieczność długoterminowej terapii zwiększa ryzyko nabycia oporności wirusa na stosowane leki antygrypowe [12, 24, 29]. Niektóre dane literaturowe wskazują na ekstremalnie długie wydalanie wirusa grypy, w tym szczepów opornych, przez pacjentów z upośledzoną odpornością. Boivin opisał przypadek wydalania wirionów potomnych grypy typu A przez okres 3 miesięcy (w tym wirusa opornego na amantydynę od około 30 dnia) [6], a Weinstock przez okres 18 miesięcy (w tym prawdopodobnie przez ponad rok wirusów opornych na rymantadynę i oseltamiwir) [67]. Dla porównania średni okres wydalania wirusa podczas eksperymentalnej infekcji u dorosłych pacjentów z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym i nieleczonych wynosił 107 godzin, natomiast u osób leczonych oseltamiwirem zaledwie 56 godzin [23].

W przebiegu grypy u osób z niedoborem odporności często dochodzi do poważnych powikłań pogrypowych, które niejednokrotnie kończą się śmiercią [30]. Liczne dane literaturowe wskazują, że śmiertelność w następ-

stwie grypy w tej grupie pacjentów waha się przeważnie między 10 a 33% [17, 19, 35, 45, 57, 68, 70]. Do najczęstszych powikłań pogrypowych należą komplikacje ze strony układu oddechowego, takie jak pierwotne wirusowe oraz wtórne zapalenie płuc i zapalenie oskrzeli. Do zapalenia płuc dochodzi nawet u 53–80% pacjentów [17, 19, 57, 68, 70]. Ponadto jest ono stwierdzane w większości śmiertelnych przypadków.

Pierwotne grypowe zapalenie płuc, które wiąże się z rozwojem rozległego śródmiąższowego zapalenia i zwłóknienia płuc, charakteryzuje szczególnie wysoka śmiertelność [27]. Wtórne zapalenia płuc mogą być wywołane przez wiele czynników, zarówno bakteryjnych (np. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacteriaceae*), grzybiczych (np. *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Candida* spp., *Pneumocystis jirovecii*), jak i wirusowych (np. wirus RS) [57, 69, 70]. Możliwe są także wtórne zakażenia mieszane, wywołane więcej niż jednym czynnikiem etiologicznym. Jednakże w wielu przypadkach patogeny odpowiedzialne za zakażenia wtórne i komplikacje w postaci zapalenia płuc są trudne do zdiagnozowania [57].

Czynniki sprzyjające rozprzestrzenieniu infekcji z górnych do dolnych dróg oddechowych są wciąż słabo poznane. W badaniach przeprowadzonych w grupie 100 pacjentów z niedoborem odporności o różnym podłożu (m.in. nowotwory, zakażenie HIV, terapia immunosupresyjna i kortykosteroidowa, przeszczepy) i potwierdzonym zakażeniem wirusem grypy, nie zaobserwowano występowania zależności pomiędzy zgonem a typem choroby podstawowej, statusem biorcy przeszczepu komórek hematopoetycznych, czy typem wirusa grypy jaki wywołał zakażenie [57]. Zaobserwowano natomiast istotnie statystycznie wyższą śmiertelność u mężczyzn, pacjentów z zakażeniem szpitalnym wirusem grypy oraz z infekcjami wtórnymi. Natomiast wśród czynników istotnie związanych z wystąpieniem zapalenia płuc był wiek pacjentów (osoby starsze), typ wirusa jaki wywołał chorobę (typ A) oraz wtórne infekcje. Z kolei Nichols stwierdził brak istotnego związku pomiędzy typem wirusa a progresją zakażenia z górnych do dolnych dróg oddechowych [45]. Wykazano znacząco większe prawdopodobieństwo rozwoju zapalenia płuc u pacjentów z limfopenią (<100 limfocytów/ μ l) i po autologicznym przeszczepie komórek hematopoetycznych oraz nie przyjmujących kortykosteroidów. Zwiększone ryzyko zgonu występowało u pacjentów z zapaleniem płuc a zwiększone ryzyko zakażenia wirusem grypy u pacjentów z przeszczepem w okresie sezonu grypowego, u kobiet, a także wiązało się ze stopniem zaawansowania choroby [26]. W innych badaniach wykazano, że wiek poniżej roku, wystąpienie infekcji w ciągu pierwszych 3 miesięcy po transplantacji oraz zakażenie podczas intensywnej terapii immunosu-

presyjnej wiążą się z poważnym przebiegiem infekcji, podczas gdy rodzaj przeszczepionego narządu mięszo-wego nie wpływa na ciężkość zakażenia [2].

4. Powikłania pogrypowe u osób z upośledzoną odpornością

W przebiegu grypy u pacjentów z upośledzoną odpornością mogą wystąpić także powikłania nie związane z układem oddechowym, takie jak zapalenie mięśnia sercowego, osierdza, mięśni, powikłania neurologiczne [33, 57, 69]. Ponadto zakażenie wirusem grypy u biorców przeszczepu grozi ostrym lub przewlekłym odrzuceniem przeszczepionego narządu [26, 29]. Zwiększone ryzyko odrzucenia przeszczepu występuje szczególnie u pacjentów po przeszczepie płuc, rzadziej innych narządów [25]. W badaniach Vilch z biopsja przeszczepionego narządu u 18 biorców płuc, 2 biorców nerki i 1 biorcy wątroby, wykonana w czasie trwania infekcji grypowej, wykazała w 13 przypadkach (płuca (11) i nerki (2) różny stopień ostrego odrzucenia allogenicznego przeszczepu [69]. Według innych badań u 3 z 12 pediatrycznych biorców narządów mięszo-wych zakażonych wirusem grypy typu B wystąpił odrzut allogenicznego przeszczepu [40]. Mechanizm odrzutu przeszczepu nie jest do końca wyjaśniony. Wirus grypy wydaje się być zdolny aktywować mechanizmy immunologiczne w przeszczepionym organie co prowadzi do odrzucenia przeszczepów u takich pacjentów i ma związek z produkcją podczas wirusowej replikacji takich cytokin, jak IL-1, TNF, IL-6 i IL-8 [69].

5. Profilaktyka zakażeń wirusami grypy

Ze względu na zwiększone ryzyko wystąpienia ciężkich powikłań pogrypowych, niejednokrotnie prowadzących do zgonu, profilaktyka przeciwgrypowa u pacjentów z upośledzoną odpornością jest niezwykle ważna. Najskuteczniejszą jej formą są coroczne szczepienia przeciwko grypie sezonowej, szeroko zalecane dla tej grupy pacjentów zarówno przez Komitet Doradczy ds. Szczepień CDC (ACIP – The Advisory Committee on Immunization Practices) [20], jak i przez wiele zespołów badawczych [10, 34, 47, 59]. Jednakże efekt szczepienia w dużej mierze zależy od sprawności układu immunologicznego, od jego zdolności do produkcji przeciwciał i odpowiedzi na antygen [30]. Niektóre dysfunkcje układu immunologicznego zwiększające ryzyko wystąpienia zakażenia i powikłań pogrypowych mogą jednocześnie upośledzać odpowiedź szczepionkową i obniżać efektywność szczepień u takich pacjentów. Po-szczepienne miano przeciwciał antyhemaglutyninowych $\geq 1:40$ lub czterokrotny wzrost miana w porównaniu

z mianem przed szczepieniem uznaje się za poziom ochronny, zabezpieczający przed zachorowaniem co najmniej 50% zaszczepionych pacjentów [5]. Należy podkreślić, że miana przeciwciał uznawane za ochronne u zdrowych osób mogą nie zabezpieczać przed zachorowaniem pacjentów z niedoborem odporności. W literaturze brak jest danych dotyczących poziomu zapewniającego ochronę przed zakażeniem klinicznym u takich osób [55, 58].

Skuteczność szczepionki przeciwko grypie zależy nie tylko od statusu immunologicznego czy wieku osoby szczepionej, ale w dużej mierze także od stopnia podobieństwa antygenowego pomiędzy wirusami szczepionkowymi na dany sezon epidemiczny a szczepami krążącymi w tym czasie w populacji. Odpowiedź na poszczególne antygeny wirusa zawarte w szczepionce może różnić się znacznie, a tylko indukcja wzrostu mian przeciwciał do poziomów uznawanych za ochronne dla wszystkich 3 antygenów może dać pełną ochronę przed zachorowaniem na grypę [20].

U osób z upośledzoną odpornością nie zaleca się stosowania szczepionek żywych atenuowanych ze względu na bardzo wysokie ryzyko rozwoju choroby zakaźnej wywołanej wirusem pochodzenia szczepionkowego. Ponadto zarówno bezpieczeństwo, jak i efektywność żywych, atenuowanych szczepionek przeciwko grypie nie została przebadana na osobach należących do grupy zwiększonego ryzyka wystąpienia powikłań [20]. Natomiast inaktywowane szczepionki przeciwko grypie mogą być bezpiecznie stosowane u pacjentów z niedoborem odporności. Jeżeli wirus szczepionkowy i krążące wirusy są pokrewne antygenowo szczepionki inaktywowane zapobiegają zachorowaniu na grypę u około 70–90% zdrowych dorosłych poniżej 65 roku życia i dzieci [20]. Natomiast wyniki badań dotyczących odpowiedzi na szczepienie przeciwko grypie u osób z niedoborem odporności są różne, niejednokrotnie nawet sprzeczne. Może to wiązać się z często niewielką liczbą przebadanych pacjentów, jak i znaczną niejednorodnością badanej grupy (pacjenci różniący się stanem zdrowia, typem i stadiem choroby, wiekiem, leczeniem – zarówno rodzajem terapii, jak i dawką, historią szczepień, przedszczepiennym mianem przeciwciał) oraz różnicami w składzie szczepionki rekomendowanej na poszczególne sezony [55]. Utrudnia to porównanie tych badań i wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Niemniej istnieje wiele danych literaturowych wskazujących na istotny wzrost po szczepieniu u pacjentów z upośledzoną odpornością poziomu przeciwciał do wartości ochronnych, choć poziom ten niejednokrotnie był mniejszy niż w grupie kontrolnej, zdrowych osób.

Okres pierwszych 6 miesięcy po przeszczepie wiąże się z największym ryzykiem odrzucenia przeszczepionego narządu oraz najsłabszą odpowiedzią immunologiczną ze względu na stosowane wówczas bardzo

wysokie dawki leków immunosupresyjnych [37]. Dlatego szczepienia przeciwko grypie u takich osób zalecane są przed wykonaniem przeszczepu a następnie w każdym sezonie po upływie 6 miesięcy od transplantacji. W badaniach przeprowadzonych u pacjentów po transplantacji wątroby udział osób z ochronnymi mianami przeciwciał anty-HA, w zależności od antygeny, wynosił 14–43% w grupie poniżej 4 miesięcy po transplantacji, 56–89% u pacjentów między 4 a 12 miesiącem po transplantacji oraz 46–86% w przypadku co najmniej 12 miesięcy po transplantacji [33]. Według innych badań efektywność szczepień przeciwko grypie u pacjentów powyżej 6 miesięcy po przeszczepie szpiku kostnego wynosiła 80% [37], a u pacjentów co najmniej rok po transplantacji nerek współczynnik ochronny osiągnął wartość 79–93% w zależności od antygeny i nie różnił się istotnie statystycznie od wartości uzyskanej dla grupy kontrolnej [58]. Ponadto większą odpowiedź wykazywali pacjenci wcześniej szczepieni co podkreśla potrzebę corocznych szczepień. Dane literaturowe dotyczące szczepień przeciwko grypie u pacjentów po przeszczepie bywają niekiedy sprzeczne. Jedne badania obejmujące osoby po transplantacji wątroby wskazują na wysoki współczynnik ochronny w tej grupie pacjentów: 92–95% wg B u r b a c h [11], a >75% wg M a d a n [38], podczas gdy w innych badaniach wskaźnik serokonwersji wynosił zaledwie 15–30% ([18]. F r a u n d i wsp. uzyskali ochronne miano przeciwciał u 32–100% pacjentów po transplantacji serca [21], zaś B l u m b e r g i wsp. u 68 pacjentów po przeszczepieniu serca, płuc, nerek lub wątroby wykazali istotnie statystycznie mniejsze miano niż w grupie kontrolnej, a wartości współczynnika ochronnego i odpowiedzi kształtowały się na poziomie odpowiednio 50–71% oraz 16–26% [4].

M o r e l o n wykazał u pacjentów po transplantacji nerek, że śródskórne podanie inaktywowanej szczepionki może wzmacniać jej immunogenność [43]. Natomiast S o e s m a n u pacjentów po przeszczepieniu wątroby stwierdził istotne zwiększenie współczynnika ochrony z 68 na 80% po drugiej dawce szczepionki [60], jednakże w wielu innych badaniach nie potwierdzono istotnego wzrostu wartości przeciwciał anty-HA u pacjentów zaszczepionych dwiema dawkami [4, 38, 58]. W licznych badaniach nie potwierdzono także, że stosowanie szczepionki przeciwko grypie u pacjentów po transplantacji może stymulować odpowiedź immunologiczną prowadzącą w konsekwencji do odrzutu przeszczepionego narządu [21, 33, 58].

Liczne dane literaturowe dotyczące szczepień przeciwko grypie u pacjentów z nowotworami wskazują, że odpowiedź immunologiczna na antygeny szczepionkowe jest dobra, choć zazwyczaj słabsza niż u zdrowych osób. Szczepienie w trakcie przyjmowania chemioterapii może jednak obniżyć jego efektywność [39, 49, 55, 59]. O r t b a l s wykazał, że wskaźnik serokonwersji

u pacjentów szczepionych i przyjmujących chemioterapię wynosił 50% i był znacznie niższy w porównaniu z pacjentami zaszczepionymi pomiędzy kolejnymi cyklami chemioterapii (93%) [49]. Z kolei w badaniach Portera u co najmniej 60% dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną w trakcie chemioterapii obserwowano czterokrotny lub większy wzrost przeciwciał dla wszystkich antygenów i tylko w przypadku jednego szczepu wyniki uzyskane dla grupy dzieci chorych i zdrowych różniły się istotnie statystycznie [52]. W badaniach prowadzonych przez Nordøy 72% pacjentów z guzem litym lub chłoniakiem złośliwym poddanych chemioterapii łagodnej lub umiarkowanej wykazywało ochronne miano przeciwko co najmniej dwóm z 3 antygenów zawartych w szczepionce [47]. Natomiast u 78% pacjentów z rakiem płuc co najmniej 4 tygodnie po zakończeniu chemioterapii uzyskano miano uznawane za ochronne na wszystkie antygeny zawarte w szczepionce [1]. W innych badaniach obserwowano znamienne wyższe miano przeciwciał po szczepieniu oraz wartości współczynnika ochronnego i współczynnika odpowiedzi od określonego minimum wskazującego na immunogenność szczepionki przeciwko grypie u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną [7], rakiem piersi [8] oraz chłoniakiem nieziarniczym (NHL – non-Hodgkin lymphoma) [14], niezależnie od wcześniejszego przyjmowania przez pacjentów chemioterapii.

U pacjentów z zaawansowanym stadium zakażenia HIV i niskim poziomem limfocytów krążących $CD4^+$ ($< 200 \times 10^6$ komórek/L) odpowiedź na szczepienie przeciwko grypie może być bardzo słaba, a druga dawka szczepionki nie zwiększa istotnie poziomu odporności. Osoby z wyższą liczbą limfocytów $CD4^+$ wykazują przeważnie dobrą odpowiedź na szczepienie, choć niejednokrotnie poszczepienne miano są znacząco mniejsze niż w kontroli [28, 61]. Wśród pacjentów zakażonych HIV z liczbą limfocytów $CD4^+ < 200 \times 10^6/L$ uzyskano miano ochronne u 29% badanych, przy $CD4^+ 200-500 \times 10^6/L$ u 64%, a przy $CD4^+ > 500 \times 10^6/L$ u 100% pacjentów [61]. Wśród dzieci zakażonych HIV-1 poddanych wysoce aktywnej terapii antyretrowirusowej (HAART – highly active antiretroviral therapy) w zależności od antygeny ochronny poziom przeciwciał anty-HA $\geq 1:40$ lub co najmniej czterokrotny wzrost miana uzyskano u 57–83% [71], 50–70% [42], 40–100% badanych [63]. W badaniach Taser obejmujących pacjentów zakażonych HIV w przypadku 29% osób zaszczepionych przeciwko grypie oraz 49% osób po iniekcji placebo (roztwór soli fizjologicznej) wystąpiły objawy infekcji ze strony układu oddechowego, z czego u 10% osób z grupy kontrolnej potwierdzono laboratoryjnie zakażenie wirusem grypy (zarówno w hodowli, jaki i badaniu serologicznym), natomiast nie stwierdzono wirusa u żadnej z zaszczepionych osób [64]. W niektórych pracach wykazano, że szczepionki przeciwko grypie mogą

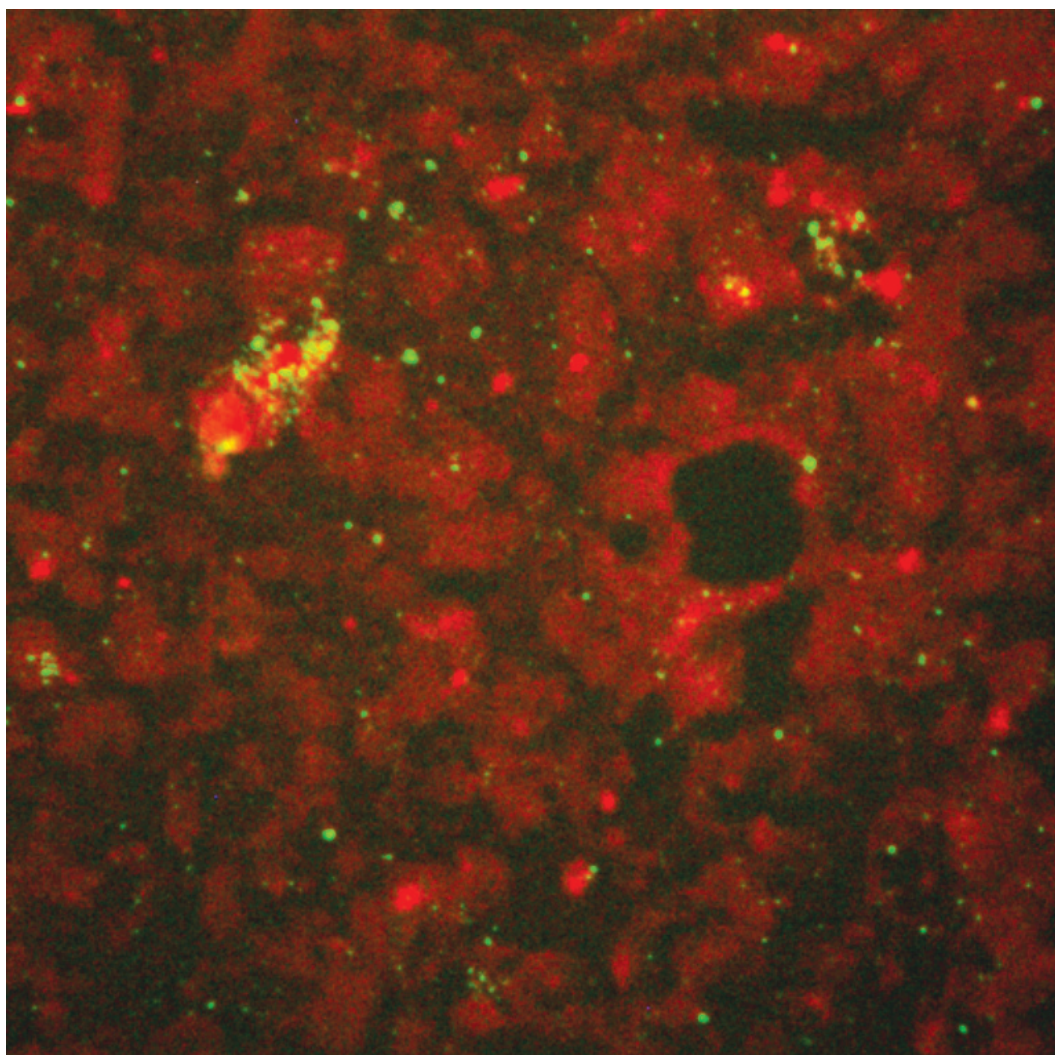
indukować spadek liczby limfocytów krążących $CD4^+$ oraz replikację HIV w surowicy lub komórkach jednójądrowych krwi obwodowej (wzrost RNA oraz prowirusowego DNA), jednak efekt ten w większości przypadków był przejściowy [53, 64]. W późniejszych latach pojawiło się wiele prac świadczących o tym, że stosowanie szczepionki przeciwko grypie u pacjentów zakażonych HIV jest bezpieczne [42, 63, 64, 71]. Sullivan i wsp. wykazali, że szczepionki przeciwko grypie u pacjentów HIV-serododatnich z poziomem limfocytów $CD4^+$ zarówno $< 200 \times 10^6/L$, jak i $\geq 200 \times 10^6/L$, nie tylko nie mają długo-terminowego (między 3 a 12 miesiącem od szczepienia) wpływu na liczbę limfocytów $CD4^+$ i wzrost replikacji wirusa HIV, ale także nie zwiększają ryzyka progresji zakażenia i wystąpienia choroby wskazującej na AIDS oraz śmierci [62].

W badaniach Brydak [9] nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w mianach przeciwciał anty-HA pomiędzy pacjentami poddanymi splenektomii a osobami zdrowymi (współczynnik ochronny i współczynnik odpowiedzi wynosiły odpowiednio 62,9–90,5% i 50–75,8% dla pacjentów po usunięciu śledziony oraz 81,8–94,5% i 60–70,9% dla grupy kontrolnej). Ponadto wysoki poziom przeciwciał występował niezależnie od czasu jaki upłynął pomiędzy operacją usunięcia śledziony a szczepieniem [9]. Wyniki innych badań wykazują na dobrą odpowiedź humoralną na szczepienie przeciwko grypie u dzieci i młodych osób z nieswoistym zapaleniem jelit, choć odpowiedź ta nie była jednakowa dla wszystkich 3 antygenów szczepionkowych [36, 56]. Ponadto wyższy współczynnik ochronny i współczynnik odpowiedzi uzyskano w 6 miesiącu po szczepieniu w porównaniu z pierwszym miesiącem co może sugerować, że pacjenci powinni być szczepieni tak szybko jak tylko dostępne są szczepionki na nowy sezon [56].

Należy pokreślić, że szczepienia przeciwko grypie zalecane są nie tylko dla pacjentów z niedoborem odporności, ale także i członków rodziny, osób z najbliższego otoczenia oraz personelu medycznego, które mogą stanowić bezpośrednie źródło zakażenia [20]. Ponadto szczepienia dawców szpiku kostnego wykazały możliwość przeniesienia limfocytów B pamięci do biorców wraz z przeszczepieniem szpiku [17].

6. Metody diagnostyczne stosowane w badaniu zakażeń wirusami grypy

Ze względu na dobre namnażanie się ortomyksowirusów w hodowlach komórkowych *in vitro* przez długie lata stanowiły one „złoty standard” w diagnostyce zakażeń wirusami grypy. Do ich namnażania używa się głównie kurzych zarodków w wieku 7–14 dni lub też ustalonych linii MDCK oraz RhMK, gdzie w ciągu 10–14 dni pojawia się specyficzny efekt cytopatyczny,



Rys. 2. Immunofluorescencja antygenów wirusa grypy typu A w preparacie bezpośrednim z zakażonego płuca ludzkiego (FITC – kolor zielony). Powiększenie mikroskopu 300x (badania własne).

potwierdzany często testami hemaglutynacji i immunofluorescencji. Efektywność hodowli komórkowych zależy w dużej mierze od ilości cząstek zakaźnych wirusa w wyjściowym materiale klinicznym oraz od sposobu jego przechowywania i transportu. Zamrażanie i rozmrażanie próbek prowadzić może do spadku miana zakaźnego, a w konsekwencji do wyników fałszywie ujemnych [32].

Z metod serologicznych w diagnostyce ortomykso-wirusów najpowszechniej stosowane są szybkie testy przeglądowe, oparte na zasadzie immunochromatografii oraz metody immunofluorescencji bezpośredniej (DFA). Testy należące do pierwszej grupy, zarówno w wariancie paskowym, jak i kasetkowym, ze względu na prostotę oraz krótki czas wykonania (10–30 min) są jednymi z najpowszechniej wykorzystywanych w diagnostyce zakażeń wirusami grypy A i B. Wykazują one wysoką swoistość, wymagają jednak stosunkowo wysokich ilości zakaźnego wirusa (10^4 – 10^6 cząstek) w materiale badanym. Metody immunofluorescencyjne z wykorzystaniem

znakowanych przeciwciał monoklonalnych pozwalają na wykrycie antygenów wirusa zarówno w preparatach bezpośrednich (Rys. 2), jak i w materiale namnożonym w hodowlach *in vitro*. Czas oczekiwania na wynik wynosi do 4 godz., przy czułości 85–95%, która może zostać zwiększona poprzez zastosowanie do badań preparatów cytospinowych. Do najpoważniejszych wad tej metody należy jej subiektywność, wynikająca z manualnego odczytu preparatów oraz wymagane doświadczenie personelu. Z tego też powodu wyniki otrzymane z użyciem DFA często różnią się pomiędzy laboratoriami [32].

Do diagnostyki molekularnej zakażeń wirusami grypy stosuje się powszechnie technikę PCR połączoną z reakcją odwrotnej transkrypcji (RT-PCR), lub też jej wariant real-time PCR (RT-qPCR). Metody real-time PCR pozwalają na skrócenie czasu detekcji, ograniczają ryzyko kontaminacji oraz umożliwiają badania ilościowe poziomu wirusa w materiale wyjściowym [32, 50]. Testy diagnostyczne z tej grupy mają bardzo wysoką czułość (ok. 97–99%), jednak nie eliminują całkowicie

występowania wyników fałszywie ujemnych, zwłaszcza wśród pacjentów oddziałów intensywnej terapii z objawami ze strony górnych dróg oddechowych [32, 54].

7. Terapia zakażeń powodowanych przez ortomyksowirusy

Skuteczną formą kontroli zakażeń wywoływanych przez wirusy grypy jest także terapia antywirusowa, która może być brana pod uwagę jako wspomaganie dla szczepienia, a w sytuacjach słabej odpowiedzi na szczepienie jako alternatywa. Leczenie infekcji grypowych wiąże się ze zmniejszeniem ryzyka wystąpienia powikłań związanych z zakażeniem dolnych dróg oddechowych (zapalenie płuc, zapalenie oskrzeli), skróceniem czasu występowania objawów chorobowych oraz zmniejszoną śmiertelnością [13, 41].

Dostępne są dwie grupy leków antygrypowych. Do pierwszej należą blokery kanału jonowego, tj. amantadyna i jej metylowa pochodna – rymantadyna. Są one skuteczne w leczeniu zakażeń wywołanych przez wirus grypy typu A, jako że celem ich działania jest białko matriksowe M2, obecne jedynie u tego typu wirusa. Druga grupa to inhibitory neuraminidazy (NAI), zanamiwir i oseltamiwir, stosowane w leczeniu i profilaktyce infekcji grypowych wywołanych zarówno wirusem grypy typu A, jak i B. Wiele badań retrospektywnych sugeruje, że leczenie oraz profilaktyka oseltamiwirem przynoszą wymierne korzyści w zapobieganiu i kontroli zakażeń grypowych u pacjentów z niedoborami odporności, zmniejszając ryzyko pojawienia się powikłań oraz śmiertelność [37]. Badania przeprowadzone na grupie pacjentów z białaczką oraz po przeszczepie komórek krwiotwórczych wykazały istotny statystycznie spadek częstości występowania zapalenia płuc u osób zakażonych wirusem grypy i leczonych oseltamiwirem (10%) w porównaniu z chorymi nie poddanymi leczeniu (42%) [15]. Natomiast pomimo wystąpienia zapalenia płuc u 12 spośród 25 pacjentów z białaczką chorych na grype i leczonych NAI, u żadnego nie odnotowano zgonu, natomiast w grupie 8 chorych nie poddanych leczeniu wystąpiły 3 zgony w wyniku zapalenia płuc [16].

W przypadku zdrowych pacjentów, z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym wdrożenie leczenia oseltamiwirem po 48 godzinach od wystąpienia objawów infekcji przynosi niewiele korzyści. U osób z obniżoną odpornością szczyt wirusowej replikacji i zakończenie wydalania wirusa grypy występuje znacznie później, dlatego rozpoczęcie terapii po 48 godzinach może przynieść znaczącą poprawę, w tym zabezpieczyć organizm przed rozprzestrzenieniem choroby do dolnych dróg oddechowych oraz zmniejszyć śmiertelność [13, 31]. Podczas trwania antygrypowej terapii powinna być stale prowadzona diagnostyka, oparta na metodach

hodowli i biologii molekularnej (PCR, sekwencjonowanie), w celu kontroli wydalania wirusa oraz monitorowania lekooporności szczepów. Wydłużona transmisja wirusa i długi okres trwania terapii znacznie zwiększają prawdopodobieństwo nabycia przez szczepy oporności na stosowane leki antywirusowe. I s o n i wsp. badając oporność szczepów wirusa grypy izolowanych w kolejnych okresach trwania antywirusowej terapii wykazali pomiędzy pierwszym a ostatnim izolatem ponad 100-krotny wzrost wartości IC_{50} dla oseltamiwiru oraz 3-krotny dla zanamiwiru [24]. W innych badaniach u 4 z 7 hospitalizowanych i leczonych oseltamiwirem pacjentów stwierdzono oporność na ten lek w 4 lub późniejszym dniu od rozpoczęcia terapii [65].

Oporność wirusów grypy na leki przeciwgrypowe może występować już przed rozpoczęciem terapii antywirusowej i jest zjawiskiem coraz bardziej powszechnym i niepokojącym. Podczas sezonu epidemicznego 2003/2004 znacznie wzrosła oporność na inhibitory białka M2. Z uwagi na to, iż obecnie wiele szczepów grypy sezonowej podtypu A/H3N2 oraz krążące od 2009 roku szczepy wirusa A(H1N1)/2009 odporne są na amantadynę i rymantadynę, nie zaleca się stosowania tej klasy leków samodzielnie zarówno w leczeniu, jak i profilaktyce grypy [20]. Większość aktualnie krążących szczepów wirusa grypy typu A i B pozostaje wrażliwa na inhibitory neuraminidazy. Niemniej podczas sezonu epidemicznego 2007/2008 zaobserwowano drastyczny wzrost oporności na oseltamiwir wśród szczepów grypy sezonowej podtypu A/H1N1 (mutacja H275Y w genie NA) izolowanych w wielu krajach Europy. Największy odsetek szczepów opornych stwierdzono w Norwegii (67%) i Francji (47%), a pacjenci od których zostały wyizolowane nie byli leczeni oseltamiwirem, jak i nie mieli kontaktu z osobami przyjmującymi inhibitory neuraminidazy. Wśród krążących obecnie w populacji wirusów A(H1N1)2009 stwierdzono niewielki odsetek szczepów opornych zawierających mutację H275Y (492 przypadki) [72]. Oporność wirusów grypy na zanamiwir w porównaniu z oseltamiwirem jest zjawiskiem bardzo rzadkim, na co mogą wpływać częściowo różnice w budowie i wiązaniu obu leków do miejsca aktywnego NA oraz ograniczone stosowanie zanamiwiru [48]. W związku z coraz większym wzrostem oporności zaleca się stosowanie wyższych dawek oseltamiwiru lub zastosowanie kombinacji różnych leków przeciwwirusowych, takich jak oseltamiwir, amantadyna i rybawirina [13, 44].

8. Podsumowanie

Zakażenia spowodowane przez przedstawicieli *Orthomyxoviridae* mogą przebiegać z różną manifestacją kliniczną i nasileniem [50]. Rozpowszechnienie zabiegów transplantacyjnych oraz upośledzenia odporności

wywołane AIDS spowodowały, iż w związku z wytworzoną głęboką immunosupresją infekcje wirusami grypy mogą przebiegać częściej i ze zwiększonymi objawami. Dodatkowo w grupie pacjentów z obniżoną wydolnością układu immunologicznego poważnym problemem stają się zakażenia mieszane, spowodowane przez nadkażenia bakteryjne [41].

Choć w większości przypadków zakażeń u osób z prawidłową czynnością układu odpornościowego zakażenia wirusami grypy nie wymagają leczenia, sytuacja ta nie dotyczy pacjentów poddanych immunosupresji. W tej grupie chorych wskazane jest rozpoczęcie terapii z wykorzystaniem NAI, nawet po upływie zalecanych 48 godzin od wystąpienia pierwszych objawów klinicznych, co może znacząco zwiększyć przeżywalność [31]. Jednocześnie osoby takie mają predyspozycje do wydłużenia czasu trwania zakażenia, co wraz z przewlekłą terapią przeciwwirusową, znacząco podwyższa ryzyko nabycia przez szczepy oporności na rutynowo stosowane preparaty przeciw grypowe. Możliwe jest także narażenie pacjentów z tej grupy na potencjalne efekty uboczne, które jak wiadomo w mniejszym lub większym stopniu, posiadają wszystkie chemioterapeutyki.

Piśmiennictwo:

- Anderson H., Petrie K., Berrisford C., Charlett A., Thatcher N., Zambon M.: Seroconversion after influenza vaccination in patients with lung cancer. *Br. J. Cancer*, **80**, 219–220 (1999)
- Apalsch A.M., Green M., Ledesma-Medina J., Nour B., Wald E.R.: Parainfluenza and influenza virus infections in pediatric organ transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **20**, 394–399 (1995)
- Bañbura M.W., Dzieciatkowski T.: Ptasia grypa – krążące zagrożenie. *Życie Wet.* **80**, 683–685 (2005)
- Blumberg E.A., Albano C., Pruett T., Isaacs R., Fitzpatrick J., Bergin J., Crump C., Hayden F.G.: The immunogenicity of influenza virus vaccine in solid organ transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* **22**, 295–302 (1996)
- Boehmer L.M., Waqar S.N., Govindan R.: Influenza vaccination in patients with cancer: an overview. *Oncology*, **24**, 1167–1170 (2010).
- Boivin G., Goyette N., Bernatchez H.: Prolonged excretion of amantadine-resistant influenza A virus quasi species after cessation of antiviral therapy in an immunocompromised patient. *Clin. Infect. Dis.* **34**, 23–25 (2002)
- Brydak L.B., Rokicka-Milewska R., Machała M., Jackowska T., Sikorska-Fic B.: Immunogenicity of subunit trivalent influenza vaccine in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**, 125–129 (1998)
- Brydak L.B., Guzy J., Starzyk J., Machała M., Góźdz S.S.: Humoral immune response after vaccination against influenza in patients with breast cancer. *Support Care Cancer*, **9**, 65–68 (2001)
- Brydak L.B., Machała M., Łaguna P., Rokicka-Milewska R.: Antibody response to influenza vaccination in splenectomized patients in Poland. *J. Clin. Immunol.* **24**, 225–236 (2004)
- Brydak L.B.: Grypa. Pandemia grypy – mit czy realne zagrożenie? Oficyna Wyd. RYTM, Warszawa, 2008.
- Burbach G., Bienzle U., Stark K., Rayes N., Neuhaus R., Serke S., Engelmann H., Künzel W., Türk G., Neuhaus P.: Influenza vaccination in liver transplant recipients. *Transplantation*, **67**, 753–755 (1999)
- Carr S., Ilyushina N.A., Franks J., Adderson E.E., Caniza M., Govorkova E.A., Webster R.G.: Oseltamivir-resistant influenza A and B viruses pre- and postantiviral therapy in children and young adults with cancer. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **30**, 284–288 (2010)
- Casper C., Englund J., Boeckh M.: How I treat influenza in patients with hematologic malignancies. *Blood*, **115**, 1331–1342 (2010)
- Centkowski P., Brydak L., Machała M., Kalinka-Warzocho E., Błasińska-Morawiec M., Federowicz I., Walewski J., Węgrzyn J., Wołowicz D., Lech-Marańda E., Sawczuk-Chabin J., Biliński P., Warzocho K.: Immunogenicity of influenza vaccination in patients with non-Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Immunol.* **27**, 339–346 (2007)
- Chemaly R.F., Ghosh S., Bodey G.P., Rohatgi N., Safdar A., Keating M.J., Champlin R.E., Aguilera E.A., Tarrand J.J., Raad I.I.: Respiratory viral infections in adults with hematologic malignancies and human stem cell transplantation recipients: a retrospective study at a major cancer center. *Medicine*, **85**, 278–287 (2006)
- Chemaly R.F., Torres H.A., Aguilera E.A., Mattiuzzi G., Cabanillas M., Kantarjian H., Gonzalez V., Safdar A., Raad I.I.: Neuraminidase inhibitors improve outcome of patients with leukemia and influenza: an observational study. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 964–967 (2007)
- Couch R.B., Englund J.A., Whimbey E.: Respiratory viral infections in immunocompetent and immunocompromised persons. *Am. J. Med.* **102**, 2–9 (1997)
- Duchini A., Hendry R.M., Nyberg L.M., Viernes M.E., Pockros P.J.: Immune response to influenza vaccine in adult liver transplant recipients. *Liver Transpl.* **7**, 311–313 (2001)
- Elting L.S., Whimbey E., Lo W., Couch R., Andreeff M., Bodey G.P.: Epidemiology of influenza A virus infection in patients with acute or chronic leukemia. *Support Care Cancer*, **3**, 198–202 (1995)
- Fiore A.E., Uyeki T.M., Broder K., Finelli L., Euler G.L., Singleton J.A., Iskander J.K., Wortley P.M., Shay D.K., Bresee J.S., Cox N.J.: Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Recomm. Rep.* **59**, 1–62 (2010)
- Fraund S., Wagner D., Pethig K., Drescher J., Girgsdies O.E., Haverich A.: Influenza vaccination in heart transplant recipients. *J. Heart Lung Transplant.* **18**, 220–225 (1999)
- Gulyaev A.P., Fouchier R.A., Olsthoorn R.C.: Influenza virus RNA structure: unique and common features. *Int. Rev. Immunol.* **29**, 533–556 (2010)
- Hayden F.G., Treanor J.J., Fritz R.S., Lobo M., Betts R.F., Miller M., Kinnersley N., Mills R.G., Ward P., Straus S.E.: Use of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in experimental human influenza: randomized controlled trials for prevention and treatment. *J. Am. Med. Ass.* **282**, 1240–1246 (1999)
- Ison M.G., Gubareva L.V., Atmar R.L., Treanor J., Hayden F.G.: Recovery of drug-resistant influenza virus from immunocompromised patients: a case series. *J. Infect. Dis.* **193**, 760–764 (2006)
- Ison M.G., Michaels M.G.: AST Infectious Diseases Community of Practice. RNA respiratory viral infections in solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **9**, S166–172 (2009)
- Ison M.G.: Influenza, including the novel H1N1, in organ transplant patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **23**, 365–373 (2010)

27. Khater F., Moorman J.P.: Complications of influenza. *South Med. J.* **96**, 740–743 (2003)
28. Kroon F.P., van Dissel J.T., de Jong J.C., van Furth R.: Antibody response to influenza, tetanus and pneumococcal vaccines in HIV-seropositive individuals in relation to the number of CD4+ lymphocytes. *AIDS*, **8**, 469–476 (1994)
29. Kumar D., Humar A.: Pandemic influenza and its implications for transplantation. *Am. J. Transplant.* **6**, 1512–1517 (2006)
30. Kunisaki K.M., Janoff E.N.: Influenza in immunosuppressed populations: a review of infection frequency, morbidity, mortality, and vaccine responses. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 493–504 (2009)
31. Lapinsky S.E.: H1N1 novel influenza A in pregnant and immunocompromised patients. *Crit. Care Med.* **38**, 52–57 (2010)
32. Landry M.L.: Diagnostic tests for influenza infection. *Curr. Opin. Pediatr.* **23**, 91–97 (2011)
33. Lawal A., Basler C., Branch A., Gutierrez J., Schwartz M., Schiano T.D.: Influenza vaccination in orthotopic liver transplant recipients: absence of post administration ALT elevation. *Am. J. Transplant.* **4**, 1805–1809 (2004)
34. Ljungman P.: Immunization of transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* **23**, 635–636 (1999)
35. Ljungman P.: Respiratory virus infections in stem cell transplant patients: the European experience. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **7**, S5–7 (2001)
36. Lu Y., Jacobson D.L., Ashworth L.A., Grand R.J., Meyer A.L., McNeal M.M., Gregas M.C., Burchett S.K., Bousvaros A.: Immune response to influenza vaccine in children with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **104**, 444–453 (2009)
37. Machado C.M., Cardoso M.R., da Rocha I.F., Boas L.S., Dulle F.L., Pannuti C.S.: The benefit of influenza vaccination after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **36**, 897–900 (2005)
38. Madan R.P., Tan M., Fernandez-Sesma A., Moran T.M., Emre S., Campbell A., Herold B.C.: A prospective, comparative study of the immune response to inactivated influenza vaccine in pediatric liver transplant recipients and their healthy siblings. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 712–718 (2008)
39. Matsuzaki A., Suminoe A., Koga Y., Kinukawa N., Kusuhara K., Hara T.: Immune response after influenza vaccination in children with cancer. *Pediatr. Blood Cancer*, **45**, 831–837 (2005)
40. Mauch T.J., Bratton S., Myers T., Krane E., Gentry S.R., Kashtan C.E.: Influenza B virus infection in pediatric solid organ transplant recipients. *Pediatrics*, **94**, 225–229 (1994)
41. Minnema B.J., Patel M., Rotstein C., Mazzulli T., Hota S., Cole E.H., Renner E.L., Ross H.J., Singer L.G., Husain S.: Comparison of hospitalized solid organ transplant recipients and nonimmunocompromised patients with pandemic H1N1 infection: a retrospective cohort study. *Transplantation*, **92**, 230–234 (2011)
42. Montoya C.J., Toro M.F., Aguirre C., Bustamante A., Hernandez M., Arango L.P., Echeverry M., Arango A.E., Prada M.C., Alarcon Hdel P., Rojas M.: Abnormal humoral immune response to influenza vaccination in pediatric type-1 human immunodeficiency virus infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **102**, 501–508 (2007)
43. Morelon E., Noble C.P., Daoud S., Cahen R., Goujon-Henry C., Weber F., Laurent P.E., Kaiserlian D., Nicolas J.F.: Immunogenicity and safety of intradermal influenza vaccination in renal transplant patients who were non-responders to conventional influenza vaccination. *Vaccine*, **28**, 6885–6890 (2010)
44. Nguyen J.T., Hoopes J.D., Smee D.F., Prichard M.N., Driebe E.M., Engelthaler D.M., Le M.H., Keim P.S., Spence R.P., Went G.T.: Triple combination of oseltamivir, amantadine, and ribavirin displays synergistic activity against multiple influenza virus strains in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4115–4126 (2009)
45. Nichols W.G., Guthrie K.A., Corey L., Boeckh M.: Influenza infections after hematopoietic stem cell transplantation: Risk factors, mortality, and the effect of antiviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 1300–1306 (2004)
46. Nicolini A., Perazzo A.: Influenza A H1N1 pneumonia in a patient with hairy-cell leukemia. *Monaldi Arch. Chest Dis.* **73**, 92–94 (2010)
47. Nordøy T., Aaberge I.S., Husebekk A., Samdal H.H., Steinert S., Melby H., Kolstad A.: Cancer patients undergoing chemotherapy show adequate serological response to vaccinations against influenza virus and Streptococcus pneumoniae. *Med. Oncol.* **19**, 71–78 (2002)
48. Okomo-Adhiambo M., Demmler-Harrison G.J., Deyde V.M., Sheu T.G., Xu X., Klimov A.I., Gubareva L.V.: Detection of E119V and E119I mutations in influenza A (H3N2) viruses isolated from an immunocompromised patient: challenges in diagnosis of oseltamivir resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1834–1841 (2010)
49. Orbals D.W., Liebhaber H., Presant C.A., Van Amburg A.L. 3rd, Lee J.Y.: Influenza immunization of adult patients with malignant diseases. *Ann. Intern. Med.* **87**, 552–557 (1977)
50. Pavia A.T.: Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clin. Infect. Dis.* **52**, S284–289 (2011)
51. Polozov I.V., Bezrukov V., Gawrisch K., Zimmerberg J.: Progressive ordering with decreasing temperature of the phospholipids of influenza virus. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 248–255 (2008)
52. Porter C.C., Edwards K.M., Zhu Y., Frangoul H.: Immune response to influenza immunization in children receiving maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Blood Cancer*, **42**, 36–40 (2004)
53. Ramilo O., Hicks P.J., Borvak J., Gross L.M., Zhong D., Squires J.E., Vitetta E.S.: T cell activation and human immunodeficiency virus replication after influenza immunization of infected children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **15**, 197–203 (1996)
54. Rello J., Rodríguez A., Ibañez P., Socías L., Cebrian J., Marques A., Guerrero J., Ruiz-Santana S., Marquez E., Del Nogal-Saez F., Alvarez-Lerma F., Martínez S., Ferrer M., Avellanas M., Granada R., Maraví-Poma E., Albert P., Sierra R., Vidaur L., Ortiz P., Prieto del Portillo I., Galván B., León-Gil C.: Intensive care adult patients with severe respiratory failure caused by Influenza A (H1N1) in Spain. *Crit. Care*, **13**, 148–157 (2009)
55. Ring A., Marx G., Steer C., Harper P.: Influenza vaccination and chemotherapy: a shot in the dark? *Support Care Cancer*, **10**, 462–465 (2002)
56. Romanowska M., Banaszkiewicz A., Nowak I., Radzikowski A., Brydak L.B.: Immunization against influenza during the 2005/2006 epidemic season and the humoral response in children with diagnosed inflammatory bowel disease (IBD). *Med. Sci. Monit.* **16**, 433–439 (2010)
57. Schnell D., Mayaux J., de Bazelaire C., Legoff J., Feuillet S., Scieux C., Andreu-Gallien J., Darmon M., Baruchel A., Schlemmer B., Azoulay E. Risk factor for pneumonia in immunocompromised patients with influenza. *Res. Med.* **104**, 1050–1056 (2010)
58. Scharpé J., Evenepoel P., Maes B., Bammens B., Claes K., Osterhaus A.D., Vanrenterghem Y., Peetermans W.E.: Influenza vaccination is efficacious and safe in renal transplant recipients. *Am. J. Kidney Dis.* **54**, 77–85 (2009)
59. Shahgholi E., Ehsani M.A., Salamati P., Maysamie A., Sotoudeh K., Mokhtariazad T.: Immunogenicity of trivalent influenza

- vaccine in children with acute lymphoblastic leukemia during maintenance therapy. *Pediatr. Blood Cancer*, **54**, 716–720 (2010)
60. Soesman N.M., Rimmelzwaan G.F., Nieuwkoop N.J., Beyer W.E., Tilanus H.W., Kemmeren M.H., Metselaar H.J., de Man R.A., Osterhaus A.D.: Efficacy of influenza vaccination in adult liver transplant recipient. *J. Med. Virol.* **61**, 85–93 (2000)
 61. Staprans S.I., Hamilton B.L., Follansbee S.E., Elbeik T., Barbosa P., Grant R.M., Feinberg M.B.: Activation of virus replication after vaccination of HIV-1-infected individuals. *J. Exp. Med.* **182**, 1727–1737 (1995)
 62. Sullivan P.S., Hanson D.L., Dworkin M.S., Jones J.L., Ward J.W.: Adult and adolescent spectrum of HIV disease investigators. Effect of influenza vaccination on disease progression among HIV-infected persons. *AIDS*, **14**, 2781–2785 (2000)
 63. Tanzi E., Esposito S., Bojanin J., Amendola A., Trabattini D., Pariani E., Pinzani R., Zanetti A., Principi N.: Immunogenicity and effect of a virosomal influenza vaccine on viral replication and T-cell activation in HIV-infected children receiving highly active antiretroviral therapy. *J. Med. Virol.* **78**, 440–445 (2006)
 64. Tasker S.A., Treanor J.J., Paxton W.B., Wallace M.R.: Efficacy of influenza vaccination in HIV-infected persons. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **131**, 430–433 (1999)
 65. Tramontana A.R., George B., Hurt A.C., Doyle J.S., Langan K., Reid A.B., Harper J.M., Thursky K., Worth L.J., Dwyer D.E., Morrissey C.O., Johnson P.D., Buising K.L., Harrison S.J., Seymour J.F., Ferguson P.E., Wang B., Denholm J.T., Cheng A.C., Slavin M.: Oseltamivir resistance in adult oncology and hematology patients infected with pandemic (H1N1) 2009 virus, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1068–1075 (2010)
 66. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y.: Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* **56**, 152–179 (1992)
 67. Weinstock D.M., Gubareva L.V., Zuccotti G.: Prolonged shedding of multidrug-resistant influenza A virus in an immunocompromised patient. *N. Engl. J. Med.* **348**, 867–868 (2003)
 68. Whimbey E., Elting L.S., Couch R.B., Lo W., Williams L., Champlin R.E., Bodey G.P.: Influenza A virus infections among hospitalized adult bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* **13**, 437–440 (1994)
 69. Vilchez R.A., McCurry K., Dauber J., Lacono A., Griffith B., Fung J., Kusne S.: Influenza virus infection in adult solid organ transplant recipients. *Am. J. Transplant.* **2**, 287–291 (2002)
 70. Yousuf H.M., Englund J., Couch R., Rolston K., Luna M., Goodrich J., Lewis V., Mirza N.Q., Andreeff M., Koller C., Elting L., Bodey G.P., Whimbey E.: Influenza among hospitalized adults with leukemia. *Clin. Infect. Dis.* **24**, 1095–1099 (1997)
 71. Zuccotti G.V., Zenga A., Durando P., Massone L., Bruzzone B., Sala D., Riva E.: Immunogenicity and tolerability of a trivalent virosomal influenza vaccine in a cohort of HIV-infected children. *J. Int. Med. Res.* **32**, 492–499 (2004)
 72. World Health Organisation 18.05.2011 (online): http://www.who.int/csr/disease/influenza/2011_05_20_weekly_web_update_oseltamivir_resistance.pdf

Małgorzata Piotrowska*

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź

Wpłynęło w lipcu 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mikotoksyny – produkcja, zagrożenia zdrowotne. 3. Działania prewencyjne i usuwanie mikotoksyn z surowców. 4. Wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania mikotoksyn. 5. Bakterie fermentacji mlekowej. 6. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. 7. Podsumowanie

Using of microorganisms for mycotoxin removal from food and feed

Abstract: Contamination of food and feeds with mycotoxins is a serious economic problem and primarily a phenomenon threatening human and animal health due to their carcinogenic, nephrotoxic, genotoxic and teratogenic properties. In order to prevent mycotoxin production by fungi, special precautions should be applied, such as good agriculture practice, storing raw products under proper humidity and temperature conditions. Such actions are not always effective. Therefore, several possibilities are available for the decontamination of raw materials, including physical and chemical methods. Few of these have practical application. Biological decontamination to using microorganisms and enzymes has created new opportunities. This review discusses the available literature on the mycotoxins removal by microorganisms. Special attention was paid to *Saccharomyces cerevisiae* yeast and lactic acid bacteria. It seems that the application of selected strains of lactic acid bacteria and yeast in the production of fermented food and probiotic products may reduce the health risk related to human exposure to fungal toxins.

Introduction. 2. Mycotoxins – production, health risks. 3. Prevention and mycotoxin removal from raw materials. 4. Using of microorganisms for mycotoxins removal. 5. Lactic acid bacteria. 6. *Saccharomyces cerevisiae*. 7. Conclusions

Słowa kluczowe: bakterie fermentacji mlekowej, dekontaminacja, drożdże, mikotoksyny, żywność

Key words: decontamination, food, lactic acid bacteria, mycotoxins, yeasts

1. Wprowadzenie

W środowisku naturalnym występuje wiele toksyn pochodzenia biologicznego, które stanowią zanieczyszczenie surowców, zarówno pochodzenia roślinnego jak i zwierzęcego. Jedną z grup o największym znaczeniu są toksyczne metabolity grzybów pleśniowych. Obecnie poznano ponad 400 związków, które zdefiniowano jako mikotoksyny. Mogą być one magazynowane jako endotoksyny w grzybnii i konidiach lub też wydzielane do środowiska jako egzotoksyny. Toksyny pleśniowe stanowią zanieczyszczenia surowców i produktów przemysłu spożywczego, pasz oraz żywności pochodzenia zwierzęcego. Wytwarzane są na różnych etapach produkcji żywności, w trakcie wegetacji na polu i podczas zbioru przez tzw. „grzyby polowe” – patogeny roślin, oraz przez saprofity w trakcie przechowywania, transportu i przetwarzania [6, 28]. Skażenie surowców i produktów przemysłu spożywczego oraz pasz przez mikotoksyny stanowi poważny problem ekonomiczny, ale przede wszystkim zdrowotny. Prowadzone obecnie badania nad mikotoksynami mają na celu nie tylko ustalenie stopnia ich toksyczności, ale także wpływu na zdrowie człowieka, oraz zmięrkają w kierunku opracowania skutecznych metod detoksykacji tych związków.

W artykule przedstawiono aktualny przegląd piśmiennictwa dotyczący metod usuwania mikotoksyn z różnych środowisk przy wykorzystaniu mikroorganizmów, ze szczególnym uwzględnieniem tych o znaczeniu biotechnologicznym, tj. bakterii fermentacji mlekowej i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Mikotoksyny – produkcja, zagrożenia zdrowotne

Synteza mikotoksyn przez grzyby jest uwarunkowana genetycznie i związana z pierwszorzędowymi szlakami metabolicznymi, takimi jak metabolizm aminokwasów czy kwasów tłuszczowych, ale fenotypowo determinowana czynnikami środowiskowymi, do których należą: skład chemiczny substratu, jego konsystencja, obecność mikroelementów, wilgotność, temperatura oraz obecność mikroflory konkurencyjnej. Wilgotność produktu i otaczającej atmosfery oraz temperatura, wydają się jednak być najważniejszymi czynnikami określającymi podatność surowców i produktów spożywczych na rozwój pleśni i wytwarzanie mikotoksyn. Wilgotność względna powietrza (WWP) powyżej 70%, zaś surowca roślinnego powyżej 15% stymuluje tworzenie mikotoksyn. Temperatura i aktywność wody środowiska, przy których szczepy wytwarzają mikotoksyny często

* Autor korespondencyjny: Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź; e-mail: malgorzata.piotrowska@p.lodz.pl

Tabela I

Mikotoksyny i grzyby toksynotwórcze

Mikotoksyna	Surowiec	Gatunek
Aflatoksyny	Zboża, orzechy, przyprawy, suszone owoce	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
Ochratoksyna A	Zboża, suszone owoce, wino, kawa, przyprawy, żywność pochodzenia zwierzęcego	<i>Aspergillus alutaceus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ostianus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> , <i>P. verrucosum</i> var. <i>verrucosum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. nordicum</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. variable</i>
Fumonizyny	Zboża i produkty zbożowe	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i>
Trichoteceny	Zboża i produkty zbożowe	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>
Patulina	Owoce i przetwory owocowe	<i>Aspergillus chevalieri</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Penicillium cyclopium</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. patulum</i> , <i>Byssosclamyces fulva</i> , <i>B. nivea</i>
Zearalenon	Zboża i przetwory zbożowe	<i>Fusarium cerealis</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i>
Alternariol	Owoce, warzywa, zboża	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. brassicae</i> , <i>A. tenuissima</i> , <i>A. tomato</i>

są inne niż wartości tych parametrów optymalne dla wzrostu grzybni [67].

Uprawiane w Polsce rośliny są w większości przypadków dobrymi substratami do rozwoju grzybów i zarazem do produkcji mikotoksyn. Największa liczba znanych mikotoksyn jest produkowana przez gatunki należące do rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i *Alternaria*.

W tabeli I przedstawiono mikotoksyny najlepiej poznane i najważniejsze z ekonomicznego i toksykologicznego punktu widzenia, gatunki grzybów toksynotwórczych, wśród których są szczepy je wytwarzające oraz najbardziej zagrożone surowce [6, 28, 32, 52, 61, 64, 66].

Głównym źródłem ekspozycji człowieka na działanie mikotoksyn jest żywność. Do organizmu ludzkiego związki te przedostają się nie tylko z zanieczyszczonych produktów żywnościowych pochodzenia roślinnego (droga pierwotna), ale także wtórnie poprzez skażone tkanki zwierzęce (mięso, mleko i jaja), pochodzących od zwierząt karmionych skażoną paszą [81]. Skutki zdrowotne narażenia na mikotoksyny nazywane mikotoksykozami to zatrucia o różnicowanym przebiegu, ostre oraz przewlekłe powstające w wyniku przyjmowania małych dawek przez dłuższy czas. W naszych warunkach klimatycznych występują częściej u zwierząt niż u ludzi [32, 81]. Mikotoksyny wykazują wielokierunkowe działanie na organizm człowieka i zwierząt, powodują uszkodzenie wątroby, nerek, zakłócają funkcje przewodu pokarmowego i układu immunologicznego. Mogą wykazywać właściwości kancerogenne, mutagenne, cytotoksyczne, teratogenne, neurotoksyczne czy estrogenne. Niektóre mikotoksyny, ze względu na swe właściwości kancerogenne zostały umieszczone przez Międzynarodową Agencję Badań na Rakim w wykazie substancji rakotwórczych. W grupie 1 kancerogenów ludzkich znalazła się aflatoksyna B₁, natomiast do grupy 2A, która obejmuje substancje o potencjalnym działaniu rakotwórczym zaliczone są ochratoksyna A, sterigmatocystyna, aflatoksyna M₁, griseofulwina, fumonizyna B₁ i toksyny wytwarzane przez *Fusarium monili-*

forme. W tabeli II przedstawiono najważniejsze skutki zdrowotne mikotoksykoz [42, 81, 88, 96].

O skali problemu skażenia mikotoksynami świadczy liczba powiadomień alarmowych i informacyjnych w europejskim systemie RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), do którego docierają informacje dotyczące żywności i pasz, która stanowi zagrożenie dla konsumentów. Od stycznia 2010 roku do maja 2011 roku w systemie odnotowano 64 powiadomienia alarmowe, 48 informacyjne i aż 834 z kontroli granicznej, dotyczących skażenia żywności przez mikotoksyny. W większości przypadków produkty, głównie orzechy, zboża i przyprawy, były zanieczyszczone aflatoksynami (powyżej 75% ogólnej liczby powiadomień).

Badania prowadzone w ostatnich latach w Polsce wykazały, że zanieczyszczenie mikotoksynami żywności i pasz stanowi duży problem również i w naszym kraju, zarówno w odniesieniu do produktów krajowych jak i importowanych [35, 36, 49, 59, 72, 78].

Tabela II

Zagrożenia zdrowotne związane ze skażeniem żywności mikotoksynami

Działanie toksyny	Mikotoksyna
Rakotwórcze	Aflatoksyna B ₁ , ochratoksyna A, sterigmatocystyna, griseofulwina, fumonizyna B ₁ , toksyny <i>Fusarium moniliforme</i>
Hepatotoksyczne	Aflatoksyny, sterigmatocystyna, patulina
Neurotoksyczne	Ochratoksyna A, cytrynina
Kardiotoksyczne	Moniliformina
Neurotoksyczne	Alkaloidy sporyszu, citreowirydyna
Immunotoksyczne	Aflatoksyny, ochratoksyna A, trichoteceny
Teratogenne	Aflatoksyny, patulina, ochratoksyna A
Dermatotoksyczne	Trichoteceny, toksyna T-2
Estrogenne	Zearalenon
Wymiotne	Deoksynowalenol
Krwotoczne	Patulina, trichoteceny, toksyna T-2

Panuje zgodność, że mikotoksyny, jako substancje potencjalnie rakotwórcze dla człowieka, których nie można całkowicie wyeliminować, powinny być limitowane na możliwie najniższym poziomie. Ustalenie takich limitów wymaga uwzględnienia różnorodnych czynników, takich jak: warunki klimatyczne oraz zwyczaje żywieniowe w poszczególnych krajach, stopień dostępności danych toksykologicznych oraz danych dotyczących pobrania mikotoksyn z żywnością i oceny ryzyka, odpowiednie metody analityczne i prawidłowe procedury pobrania prób. Działania te mają służyć przede wszystkim zdrowiu konsumenta (Rozporządzenie Komisji UE 1881/2006; Dz.U. L364 z 20.12.2006, z późniejszymi zmianami – 1126/2007; Dz.U. L255 z 29.9.2007 i 165/2010; Dz.U. L50 z 27.2.2010), ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych).

2. Działania prewencyjne i usuwanie mikotoksyn z surowców

Ze względu na niekorzystny wpływ mikotoksyn na zdrowie ludzi i zwierząt, jak również straty ekonomiczne wynikające ze skażenia żywności i pasz konieczne jest zminimalizowanie ryzyka narażenia produktu na zanieczyszczenie pleśniami toksynotwórczymi. Najlepszym sposobem są działania prewencyjne polegające na odpowiednim traktowaniu surowca roślinnego podczas wegetacji, zbioru i magazynowania. Należą do nich:

- wybór odmian/hybryd odpornych na infekcje grzybowe i na szkodniki owadzie,
- minimalizowanie narażenia roślin na stres np. brak wody, zimno,
- uważne stosowanie środków ochrony roślin,
- stosowanie środków owado- i chwastobójczych,
- selekcja siedliska dla tych samych gatunków roślin, przestrzeganie odległości między rzędami roślin,
- terminowe zbiory,
- unikanie uszkodzeń mechanicznych oraz zanieczyszczenia glebę,
- dobre gospodarowanie glebą (orka) w celu usunięcia, zniszczenia lub zakopania zainfekowanych resztek pozostałych po żniwach,
- płodozmian,
- magazynowanie surowców w odpowiednich warunkach temperatury i wilgotności.

Wytyczne do stosowania właściwych działań prewencyjnych zostały przedstawione w Rozporządzeniu Komisji UE 1881/2006; Dz.U. L364 z 20.12.2006 oraz Zaleceniu Komisji UE 583/2006; Dz.U. L234 z 29.8.2006 (w sprawie zapobiegania występowaniu i ograniczania występowania toksyn *Fusarium* w zbożach i produktach zbożowych), jak również omówione w piśmiennictwie [45, 46, 53, 70, 84].

Zminimalizowanie produkcji toksyn przez grzyby pleśniowe nie zawsze jest możliwe, jeśli już dojdzie do zanieczyszczenia surowców roślinnych przez te związki, to należy przeprowadzić ich dekontaminację, ale jest to dopuszczalne tylko w odniesieniu do pasz. Nie może być stosowane do żywności oraz do surowców przeznaczonych do jej produkcji.

W zastosowanej metodzie dekontaminacji muszą być spełnione następujące kryteria według zaleceń FAO [20, 84]:

- usunięcie toksyn poprzez ich transformację do nietoksycznych związków,
- usunięcie z paszy toksyn w takiej ilości, aby nie stwierdzano ich w produktach żywnościowych pochodzących ze zwierząt karmionych tą paszą,
- zniszczenie wszystkich form morfologicznych grzybów pleśniowych,
- zachowanie wartości odżywczej, sensorycznej oraz własności fizycznych produktu,
- ekonomiczne uzasadnienie procesu dekontaminacji (koszt usuwania toksyny mniejszy niż wartość paszy).

Wyróżnia się kilka metod dekontaminacji pasz o różnym stopniu praktycznego wykorzystania [20, 84]:

- mechaniczne oddzielanie ziaren zanieczyszczonych (sortowanie),
- dodatek materiałów adsorpcyjnych do paszy,
- działanie czynnikami fizycznymi,
- działanie czynnikami chemicznymi,
- metody biologiczne.

Do metod fizycznych eliminowania mikotoksyn należą działanie wysoką temperaturą oraz promieniowaniem UV i gamma, również w połączeniu ze związkami chemicznymi. Mikotoksyny są termostabilne, jednak traktowanie podwyższoną temperaturą przez dłuższy czas prowadzi do ich częściowej degradacji. Wiele związków chemicznych, takich jak amoniak, NaOCl, H₂O₂, SO₂ może reagować z toksynami powodując ich degradację. Wymienione metody nie znajdują jednak praktycznego zastosowania głównie ze względu na niebezpieczeństwo tworzenia toksycznych pozostałości lub zmiany wartości odżywczej oraz cech organoleptycznych oczyszczanych produktów [20].

Inne podejście do problemu dekontaminacji mikotoksyn związane jest z dodatkiem do pasz obojętnych suplementów diety, które skutecznie adsorbują toksyny bezpośrednio w paszy lub w przewodzie pokarmowym zwierząt, w wyniku, czego nie następuje wchłanianie toksyn do krwioobiegu oraz uniemożliwiona jest ich resorpcja [43]. Do takich adsorbentów można zaliczyć: glinki, kaolin, zeolity, węgiel aktywny, glino-krzemiany sodu i magnezu oraz HSCAS (uwodniony glinokrzemian sodowo-wapniowy) i bentonit. W procesie adsorpcji istotne są parametry fizyczne adsorbenta np. całkowita powierzchnia działania i wielkość porów

oraz właściwości substancji adsorbowanej np. wielkość i kształt cząsteczki oraz jej rozpuszczalność i polarność [43, 46]. Wadą tych adsorbentów jest także to, że wiążą witaminy, mikro – i makroelementy oraz inne niezbędne składniki pokarmowe. Adsorbenty dodawane do pasz znane są pod różnymi nazwami handlowymi. Jednym z nich jest Mycobond – glinokrzemian sodowo-wapniowo-potasowo-magnezowy. Związek ten nie ogranicza dostępności witamin, pierwiastków śladowych i aminokwasów, przez co nie zmniejsza wartości odżywczej paszy. Produkowany jest przez firmę Optivite International z Wielkiej Brytanii. Adsorbentem uzupełnionym o dodatki enzymatyczne jest Mycofix Plus, austriackiej firmy Biomin. Aflatoksyny są specyficznie przyłączane do powierzchni adsorbenta, natomiast inne toksyny, takie jak zearalenon i trichoteceny są rozkładane enzymatycznie.

3. Wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania mikotoksyn

Wobec ograniczeń metod fizycznych i chemicznych rozważane jest stosowanie innych metod, bardziej bezpiecznych. Do takich zakwalifikowano metody biologiczne, które skupiają się głównie na poszukiwaniu drobnoustrojów, które skutecznie metabolizowałyby mikotoksyny, a zarazem nie produkowałyby żadnych toksycznych metabolitów ubocznych, stanowiących dodatkowe zagrożenie dla zdrowia człowieka i zwierząt. W tabeli III wymieniono mikroorganizmy, które według doniesień literaturowych charakteryzują się zdolnością do usuwania różnych mikotoksyn ze środowiska.

Dane przedstawione w tabeli wskazują na duże zainteresowanie naukowców problemem usuwania toksyn pleśniowych, jednak obszar badań skupia się głównie na aflatoksynie B₁ oraz ochratoksynie A, co jest uzasadnione, biorąc pod uwagę stopień skażenia pasz i żywności tymi związkami.

Już w 1966 roku Ciegler i wsp. [16] dokonał przeglądu mikroorganizmów pod kątem degradacji aflatoksyn. Stwierdził, że drożdże, promieniowce i glony nie wykazywały tej cechy, zaś niektóre pleśnie takie jak *Aspergillus niger*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *A. luchuensis*, *Penicillium reistrickii* częściowo przekształcały aflatoksynę B₁ do nowego produktu fluoryzującego. Jedynie bakterie *Flavobacterium aurantiacum* (obecnie *Nocardia corynebacterioides*) powodowały usuwanie aflatoksyn, zarówno z pożywki jak i ze środowisk naturalnych tj. mleka, oleju, masła kakaowego i zboża. W późniejszych badaniach potwierdzono przydatność tych bakterii do dekontaminacji nie tylko pożywek modelowych ale też surowców naturalnych [17, 38]. Do uzyskania widocznego ubytku toksyny konieczne było zastosowanie populacji bakterii o gęstości powyżej 10¹⁰ jtk/ml [51].

Wykazano ponadto, że po termicznej destrukcji komórek *Flavobacterium aurantiacum* aflatoksyny są uwalniane z komórek w niezmienionej formie, co świadczy o ich adsorbowaniu a nie biodegradacji do innych produktów. Jednak w pracy Smiley i Draughon [87] stwierdzono, że również pod wpływem białkowego ekstraktu komórkowego *F. aurantiacum* ilość aflatoksyny B₁ uległa obniżeniu o 75% po 24 godzinach, przy początkowej zawartości toksyny 20 µg/ml. Według autorów jest to dowód na enzymatyczny charakter procesu.

Obserwowano również, że toksynotwórcze kultury *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus* były zdolne do obniżania zawartości aflatoksyn w środowisku. Toksyny te były degradowane przez szczepy je wytwarzające, ale dopiero po fragmentacji grzybni w przedłużonej do kilku tygodni hodowli. W wyniku reakcji otrzymywano produkt podobny w swej budowie do kwasu kojowego [21]. Według Browna i wsp. [10] zjawisko usuwania aflatoksyny B₁ następowało na skutek jej absorpcji do ściany komórkowej grzybni. Im bardziej zdeintegrowana grzybnia tym degradacja zachodziła z większą wydajnością. Stwierdzono, że maksymalna degradacja aflatoksyny B₁ i G₁ przez grzyby toksynotwórcze następowała w temp. 28°C i przy wartości pH 5 do 6,5 [21]. Badania Engler i wsp. [27] potwierdziły, że cechą eliminowania aflatoksyny B₁ obdarzone są również drożdże *Kluyveromyces marxianus* i bakterie *Bacillus megaterium*. Właściwości usuwania ochratoksyny A ze środowiska wykazywały bakterie *Acinetobacter calcoaceticus* [44]. W pracy Štyriaka i wsp. [90] badano 10 szczepów drożdży z rodzajów *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* i *Rhodotorula* w kierunku, biodegradacji fumonizyny B₁, trichotecen i ochratoksyny A. Wykazano duże różnice pomiędzy szczepami, natomiast nie zaobserwowano preferencji, co do rodzaju mikotoksyny. Fumonizyny były usuwane przez większość szczepów w 100%, deoksynowalenol w zakresie od 63 do 100%, zaś ochratoksyna A od 69 do 100%.

W badaniach Mateo i wsp. [55] do usuwania ochratoksyny A wykorzystano 10 szczepów bakterii fermentacji mlekowej *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*) wyizolowanych z wina. Wykazano, że po 14 dniach inkubacji bakterii w pożywce kontaminowanej 2 µg/l ochratoksyny A, ilość tego związku uległa zmniejszeniu o 60%. Wydajność procesu zależna była od szczepu bakterii, czasu inkubacji, stężenia OTA, nie zależała zaś od żywotności komórek.

Możliwość wykorzystania pleśni do usuwania ochratoksyny A badana była przez Varga i wsp. [94, 95]. Autorzy spośród 70 izolatów pleśni rodzaju *Aspergillus*, wyselekcjonowali dwa – *Aspergillus fumigatus* i *Aspergillus niger*, które wykazywały cechę obniżania zawartości ochratoksyny A zarówno w pożywkach płynnych jak i stałych. Stwierdzono transformację ochratoksyny A do ochratoksyny α i fenyloalaniny w ciągu 7 dni inkubacji.

Tabela III

Mikroorganizmy wykazujące cechę usuwania mikotoksyn

Mikotoksyna	Mikroorganizm	Piśmiennictwo
Aflatoksyna B ₁	<i>Flavobacterium aurantiacum</i>	[16, 17, 38, 51, 87]
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>	[73]
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	[22, 23, 25, 26, 92]
	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	[9]
	<i>Lactococcus</i> sp.	[57]
	<i>Mycobacterium fluoranthenorans</i>	[91]
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	[3, 91]
	<i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. crispatus</i>	[69]
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	[63]
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Bacillus megaterium</i>	[27]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[83]
	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. luchuensis</i> , <i>Penicillium reistrickii</i>	[16]
	<i>Corynebacterium rubrum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma viride</i>	[54]
	<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>A. flavus</i>	[10, 21]
Ochratoksyna A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i>	[30]
	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	[34, 85]
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	[15, 44]
	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. acidophilus</i>	[75, 76]
	<i>Oenococcus oeni</i>	[55]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[4, 8, 11, 56, 77, 90, 93]
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Rhodotorula rubra</i>	[90]
	<i>Phaffia rhodozyna</i> , <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	[71]
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> , <i>Pichia guilliermondii</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>	[68]
	<i>Rhizopus</i> sp.	[94]
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	[19]
	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. versicolor</i>	[1, 2, 7, 95]
Fumonizyna B ₁	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	[62]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Rhodotorula rubra</i>	[90]
Trichoteceny	Bakterie żwacza	[31]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Rhodotorula rubra</i>	[90]
Zearalenon	Bakterie glebowe	[58]
	<i>Propionibacterium fraudenreichii</i>	[37]
	<i>Rhizopus</i> sp.	[94]
	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	[60]
Patulina	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i>	[30]
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	[94]

Podobna reakcja rozkładu wiązania peptydowego ochratoksyny A w sposób naturalny odbywa się u przeżuwaczy, co jest wynikiem działalności mikroorganizmów żwacza przy udziale karboksypeptydazy A (EC 3.4.17.1) [41, 48, 65]. Badane grzyby pleśniowe metabolizowały również ochratoksynę α. Jej ilość wzrastała w ciągu pierwszych 6 dni inkubacji, a następnie zaczynała maleć, by po 10 dniach dojść do śladowych ilości. Dowodzi to degradacji również ochratoksyny α do nieznanego produktu [95].

Stwierdzono w badaniach *in vitro*, że efektem działania na roztwór ochratoksyny A surowego preparatu lipazy pochodzącej od *Aspergillus niger* (handlowa nazwa Amano A) był rozkład ochratoksyny A z wydzielaniem ochratoksyny α i fenyloalaniny [89]. Podobne rezultaty uzyskał *Abrunhosa* [1, 2] w odniesieniu do degradacji ochratoksyny A przez szczepy grzybów wyizolowanych z winogron oraz przez surowe preparaty proteaz z *Aspergillus niger*, jak również

handlowe enzymy proteolityczne. Enzymatyczny rozkład ochratoksyny A w moszczach gronowych został również zaobserwowany w hodowli pleśni *Aureobasidium pullulans* [19].

W pracy Bejaoui i wsp. [7] wykazano usuwanie ochratoksyny A z moszczy gronowych przez szczepy należące do sekcji *Nigri* rodzaju *Aspergillus* przebiegało według dwóch różnych mechanizmów. Konidia żywe prowadziły biodegradację OTA do fenyloalaniny i ochratoksyny α , zaś konidia inaktywowane termicznie adsorbowały toksynę. Na naturę procesu miał wpływ charakter powierzchni komórek, a głównie hydrofobowość. Wydajność procesu była jednak taka sama niezależnie od stanu fizjologicznego pleśni. Wykorzystanie konidiów pleśni, szczególnie martwych, jako adsorbentów w praktyce enologicznej jest obiecującą metodą, jednak wymaga dopracowania w zakresie immobilizacji konidiów. Podstawową wadą jest też zmiana zabarwienia moszczy pod wpływem konidiów pleśni.

Nieliczne doniesienia naukowe skupiają się na innych mikotoksynach występujących w środowisku. W badaniach *in vitro* prowadzonych przez Younga i wsp. [99] wykazano, że na skutek aktywności mikroorganizmów wyizolowanych z przewodu pokarmowego kurcząt 12 mikotoksyn należących do grupy trichotecen uległo biodegradacji. Transformacja toksyn polegała na ich częściowej bądź całkowitej deepoksydacji lub deacylacji. Wyniki te są spójne z rezultatami badań Fuchs i wsp. [31], których przedmiotem były trichoteceny typu A. Wykazano w nich, że szczep bakterii beztlenowych, gramdodatnich wyizolowany z żwacza, wstępnie zaklasyfikowany do rodzaju *Eubacterium* prowadził transformację tych związków do nietoksycznych form nieepoksydowanych. Możliwe kierunki transformacji trichotecen pod wpływem czynników chemicznych i biologicznych zostały omówione przez He i wsp. [40].

Представione powyżej przykłady aktywności drobnoustrojów w kierunku usuwania mikotoksyn mają głównie znaczenie naukowe, pozwalające na lepsze poznanie szczepów, ich właściwości oraz mechanizmów zachodzących procesów. Ich ograniczona rola aplikacyjna sprawiła, że badania naukowe zwróciły się w stronę takich organizmów, które można zastosować w procesach biotechnologicznych podczas produkcji, np. żywności fermentowanej, gdzie surowiec może być skażony mikotoksynami. Wśród nich szczególne znaczenie mają bakterie fermentacji mlekowej i drożdże *Saccharomyces cerevisiae*.

5. Bakterie fermentacji mlekowej

Bakterie fermentacji mlekowej, w tym szczepy probiotyczne budzą szczególne zainteresowanie ze względu na ich korzystne, fizjologiczne właściwości w organizmie

człowieka i zwierząt. Ponadto bakterie te hamują wzrost pleśni oraz tworzenie przez nie mikotoksyn [18, 33].

Dane literaturowe wskazują na występowanie między typowymi bakteriami mlekowymi odmian o różnicowanych uzdolnieniach do detoksykacji środowisk z mikotoksyn, co wykazano zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*.

Badania różnych autorów dowodzą posiadania tej cechy przez szczepy probiotyczne *Lactobacillus rhamnosus* [22–25, 68, 75]. Szczepy *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC-705 zostały uznane za najbardziej skutecznie wiążące aflatoksynę B_1 w porównaniu z innymi szczepami bakterii Gram-dodatnich (*Lactobacillus casei* Shirota, *L. acidophilus*) i Gram-ujemnych (*Escherichia coli*). Brak zdolności do eliminowania aflatoksyn przez bakterie Gram-ujemne związany jest z odmienną budową ściany komórkowej tych bakterii w porównaniu ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich [23]. Wykazano, że proces ten jest bardzo szybki, już po 4 godzinach kontaktu bakterii z toksyną jej ilość uległa zmniejszeniu w zakresie od 50 do 77%, zaś przedłużenie czasu inkubacji do 24 godzin nie zwiększyło istotnie wydajności procesu, a nawet w niektórych przypadkach zaobserwowano uwalnianie się toksyny z komórek, co dowodzi nietrwałości połączenia [22]. Szczepy bakterii *Lactobacillus acidophilus* i *L. rhamnosus* charakteryzowały się również zdolnością do usuwania aflatoksyny M_1 z mleka w zależności od szczepu w zakresie od 18 do 57% [73]. W każdym przypadku zaobserwowano, że komórki inaktywowane termicznie były bardziej skuteczne od komórek żywych, co wynika ze zmiany właściwości powierzchniowych komórek, które zachodzą pod wpływem wysokiej temperatury [22, 68].

Wykazano, że szczepy *Lactobacillus acidophilus* oraz *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* i inne nie tylko zmniejszają ilość aflatoksyny B_1 w pożywce, ale też obniżają mutagenność środowiska. Cechy te były bardziej widoczne w przypadku szczepów inaktywowanych termicznie [9, 50].

Badania innych autorów skupiały się na bakteriach fermentacji mlekowej wykorzystywanych do produkcji jogurtu. Prowadzono fermentację mleka zawierającego aflatoksynę B_1 w ilości 600, 1000 i 1400 $\mu\text{g/kg}$ z wykorzystaniem bakterii jogurtowych z rodzaju *Streptococcus*. W jogurcie o $\text{pH}=4,0$ ilość toksyny została zredukowana, w zależności od jej początkowej zawartości odpowiednio w 97, 91 i 90%. W doświadczeniach tych stwierdzono zmiany morfologiczne w komórkach, natomiast cechy organoleptyczne jogurtu pozostały bez zmian [57]. Inni autorzy badając obniżanie zawartości AFB_1 w mleku w wyniku działania bakterii jogurtowych stwierdzili całkowitą transformację AFB_1 do nowego produktu fluoryzującego o $R_f=0,18$ identycznego z aflatoksyną B_{2a} [57, 79].

Wykazano, że nie tylko aflatoksyna jest skutecznie usuwana przez bakterie mlekowe. W badaniach Šk i n j a r i wsp. [85] potwierdzono zdolność do obniżania zawartości ochratoksyny A w mleku przez bakterie fermentacji mlekowej należące do gatunków *Lactococcus salivarius*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Bifidobacterium bifidum*. Ilość patuliny w pożywce zmniejszyła się w zakresie od 10 do 82% pod wpływem bakterii należących do rodzaju *Lactobacillus* oraz *Bifidobacterium*. Potwierdziły się wcześniejsze obserwacje innych autorów, że przebieg procesu zależy od gęstości inokulum, pH i stężenia toksyny. Spośród badanych szczepów *L. acidophilus*, usuwał nawet 96% toksyny dodanej do pożywki w ilości 1 µg/ml [30]. N i d e r k o r n i wsp. [62] przeprowadził skrining bakterii fermentacji mlekowej i propionowej w kierunku cechy usuwania deoksynowalenolu i fumonizyny z roztworów. Wykazano, najlepszymi predyspozycjami do usuwania tych toksyn charakteryzowały się bakterie mlekowe: *Lactobacillus rhamnosus* powodował usunięcie 55% deoksynowalenolu, *Leuconostoc mesenteroides* 82% fumonizyny B₁, zaś *Lactococcus lactis* 100% fumonizyny B₂ dodanych do pożywki.

Zainteresowanie bakteriami fermentacji mlekowej nie ogranicza się tylko do ich zdolności wiązania mikotoksyn. Obecnie, gdy zabronione jest stosowanie antybiotyków jako dodatków do pasz, z uwagi na antagonistyczne działanie w stosunku do wielu patogenów, organizmy te mogą stanowić alternatywę w ich stosowaniu. Badania *in vivo* wykazały, że bakterie *Lactobacillus rhamnosus* ograniczały w 75% adsorpcję aflatoksyny B₁ w przewodzie pokarmowym kurcząt [24]. Eksperymenty *in vivo* wskazują, że stosowanie bakterii probiotycznych jako dodatków do pasz ogranicza efekty mikotoksykozy u zwierząt, jak również zmniejsza kumulację toksyn w tkankach, obniżając w ten sposób skażenie żywności pochodzenia zwierzęcego przez toksyny [86].

Fakt usuwania toksyny również przez bakterie nieaktywne wyklucza enzymatyczny charakter procesu, a potwierdza, że jest to adsorpcja do komórki, a przede wszystkim do zewnętrznych warstw jej ściany komórkowej. Szczególną rolę w mechanizmie adsorpcji toksyn do komórek bakteryjnych, żywych i martwych mogą odgrywać peptydoglikany i egzopolisacharydy komórek, kwasy teichonowe oraz oddziaływania związane z hydrofobowością komórki i właściwościami elektrostatycznymi [100]. Wykazano, że wiązanie toksyn z komórkami bakterii fermentacji mlekowej jest powierzchniowe, a przy zastosowaniu bakterii inaktywowanych termicznie trwałe, w odróżnieniu od bakterii żywych, z których komórek można wypłukać związaną wcześniej toksynę [39, 47]. Nie są jednak znane dane literaturowe na temat stabilności wiązania w warunkach przewodu pokarmowego. Trwałość takiego połączenia, a jednocześnie brak przylegania bakterii do nabłonka jelita, co

umożliwiałoby resorpcję toksyny determinuje przyszłe zastosowanie praktyczne bakterii fermentacji mlekowej do dekontaminacji również żywności.

6. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*

Drugą grupą organizmów o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym są drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Organizmy te szeroko wykorzystywane są w wielu procesach biotechnologicznych, w piekarstwie, browarnictwie, winiarstwie, gorzelnictwie. Ze względu na częste skażenie mikotoksynami surowców używanych w tych procesach – mąki, słoju, moszczy gronowych, rozważana jest możliwość prowadzenia fermentacji przy użyciu szczepów, które obok właściwych cech technologicznych, posiadają zdolność do obniżania zawartości toksyn, dzięki czemu produkt finalny będzie bardziej bezpieczny. Większość danych literaturowych w tym obszarze dotyczy ochratoksyny A. Badania wykazały, że drożdże efektywnie usuwają ochratoksynę A z surowców pochodzenia roślinnego podczas fermentacji, jak i w warunkach modelowych z pożywek mikrobiologicznych. W badaniach S c o t t i wsp. [82] stwierdzono, że ochratoksyna A dodana do brzeczki słodowej w ilości 0,19 µg/ml, została wyeliminowana w 21% podczas fermentacji prowadzonej z udziałem drożdży browarniczych *Saccharomyces cerevisiae* var. *carlsbergensis*. Również podczas fermentacji zakwasu piekarskiego przez mieszaną kulturę starterową drożdży i bakterii mlekowej zawartość ochratoksyny A w mące ulegała znacznemu obniżeniu [76]. W badaniach interakcji między ochratoksyną A a szczepami drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i *Kloeckera apiculata* stosowanymi pojedynczo i w mieszaninie wykazano, że dodatek toksyny do medium hodowlanego nie wpływa negatywnie na przebieg fermentacji alkoholowej. Ubytek toksyny wahał się od 28 do 40% wartości początkowej w zależności od szczepu i ilości toksyny w medium. Badania potwierdziły też, że toksyna nie jest biodegradowana, a adsorbowana przez drożdże [4].

Skażenie ochratoksyną A moszczów gronowych jest poważnym problemem w winiarstwie. Niektóre szczepy enologiczne są zdolne do usuwania ochratoksyny A z soków i moszczów gronowych [8, 11, 13, 14, 56]. Doniesienia B e j a o u i i wsp. [8] wskazują, że proces usuwania ochratoksyny A z soku gronowego jest bardzo szybki, już po 5 minutach kontaktu z komórkami drożdży 90% początkowej zawartości toksyny, tj 10 µg/ml uległo związaniu. Wyniki tych badań są spójne z rezultatami uzyskanymi dla bakterii mlekowych, mimo znacznych różnic w budowie komórek. Autorzy [8] wskazywali na możliwość wykorzystania martwych drożdży odpowiednich szczepów jako adsorbentów w praktyce winiarskiej. Taki adsorbent jest tani, bezpieczny i nie

wpływa na zmiany organoleptyczne wina. Dyskusyjna jest jednak utylizacja komórek drożdży z ochratoksyną, ponadto wadą takiego sposobu dekontaminacji jest wiązanie innych korzystnych dla jakości wina składników, takich jak związki polifenolowe czy antocyjany [12].

V a r i w s p. [93] dokonali przeglądu 21 różnych szczepów drożdży wyizolowanych z winogron należących do rodzaju *Candida*, *Kloeckera* i *Cryptococcus* pod względem uzdolnień do usuwania ochratoksyny A z wina. Wykazano, że największą redukcją ilości toksyny ok. 30% charakteryzował się szczep *Candida famata*. Porównując te wyniki z rezultatami innych autorów należy stwierdzić, że wydajność tego procesu była bardzo dość niska, przy początkowym stężeniu toksyny 10 ng/ml.

Podobnie jak w przypadku bakterii fermentacji mlekowej ustalono, że mechanizmem odpowiedzialnym za usuwanie toksyn przez drożdże jest adsorpcja do powierzchni komórek. Przemawia za tym fakt, że analizy chromatograficzne nie wykazały obecności produktów metabolizmu ochratoksyny A, zaś komórki martwe i wypreparowane ściany komórkowe drożdży były równie efektywne [4, 8, 43, 68, 77, 80]. Mechanizm ten był niezależny od rodzaju toksyny, co wykazano w odniesieniu do aflatoksyny B₁, zearalenonu i toksyny T-2 i patuliny [29, 83, 98]. Składnikami ściany komórkowej, które biorą udział w wiązaniu mikotoksyn są glukany i mannoproteiny [13, 80]. Według R a j u i D e v e g o w d a [80] za wiązanie toksyn odpowiada β-D-glukan ściany komórkowej drożdży, a szczególnie efektywna jest jego forma estryfikowana. W oparciu o badania metodą NMR stwierdzono, że grupy hydroksylowe, ketonowe i laktonowe toksyn są odpowiedzialne za tworzenie zarówno wiązań wodorowych jak oddziaływań van der Waalsa między toksynami a β-D-glukanami [97]. Drożdże i składniki ich ściany komórkowej stosowane są również jako dodatki paszowe dla zwierząt, wykorzystywane też jako adsorbenty, co skutecznie ogranicza efekty mikotoksykozy u zwierząt hodowlanych [5, 81]. Komercyjnym preparatem jest dodatek paszowy o nazwie Mycorb (Alltech), który zawiera glukomamannany, wypreparowane składniki ściany komórkowej drożdży.

Potencjalna aplikacja drożdży jako adsorbentów do żywności i pasz zależy jednak od stabilności wiązania toksyny z komórkami w warunkach przewodu pokarmowego. Według Y a n i k o u r i s a i w s p. [99] adsorpcja zearalenonu jest najbardziej efektywna w pH kwaśnym i bliskim obojętnego, a więc takich, jakie panują w niektórych regionach przewodu pokarmowego, zaś warunki alkaliczne zmieniają konformację glukanu w taki sposób, że adsorpcja jest niemożliwa, a więc można przypuszczać, że wiązanie jest dość trwałe.

Efektom zastosowanie drożdży do usuwania ochratoksyny A jest też detoksykacja środowiska, co wykazano w testach cytotoksyczności i genotoksyczności z wykorzystaniem linii komórkowych nerek świńskich

[74]. Niektóre drożdże wykazują też cechy probiotyczne, co jest dodatkowym argumentem przemawiającym za stosowaniem tych organizmów.

7. Podsumowanie

W świetle narastających zagrożeń zdrowotnych wynikających z obecności toksyn pleśniowych w środkach spożywczych, a także w otoczeniu człowieka poznanie istniejącego w naturze zjawiska biologicznego usuwania mikotoksyn wydaje się słuszne. Działania prewencyjne zmierzające do ochrony surowców roślinnych przed ich pleśnieniem są często nieskuteczne. Niezwykła zdolność przystosowania się pleśni do różnych warunków środowiskowych sprawia, że prewencja nie stanowi rozwiązania skutecznego i uniwersalnego. Wykorzystanie mikroorganizmów lub składników ich komórek do dekontaminacji żywności i pasz budzi duże nadzieje, ale też kontrowersje z punktu widzenia konsumenta. Brak jest unormowań prawnych w tej kwestii, a dane dotyczące trwałości połączenia bakterie-toksyna w przewodzie pokarmowym, jak również dane toksykologiczne są wciąż niepełne. Jedyną grupą drobnoustrojów, które obok innych korzystnych cech prozdrowotnych wykazuje zdolność do usuwania toksyn są probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej. Również drożdże *Saccharomyces cerevisiae* oraz składniki ich ściany komórkowej – glukany mogą być wykorzystywane w tym celu. Czynniki te mogą być używane zarówno jako suplementy diety u ludzi i składniki paszowe w żywieniu zwierząt, jak i w trakcie procesów biotechnologicznych.

W artykule dokonano przeglądu metod, które mogą być rozważane jako czynnik dekontaminacji surowców pochodzenia roślinnego, ze szczególnym uwzględnieniem metod biologicznych.

Piśmiennictwo

1. Abrunhosa L., Santos L., Venancio A.: Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnol.* **20**, 231–242 (2006)
2. Abrunhosa L., Serra R., Venancio A.: Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 493–7496 (2002)
3. Alberts J.F., Engelbrecht Y., Steyn P.S., Holzapfel W.H., Vanzyl W.H.: Biological degradation of AFB₁ by *Rhodococcus erythropolis* cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **109**, 121–126 (2006)
4. Angioni A., Caboni P., Garau A., Harris A., Orro D., Budroni M., Cabras P.: In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *J. Agric. Chem.* **55**, 2043–2048 (2007)
5. Baptista A.S., Horii J., Calori-Domingues M.A., Micotti da Gloria E.: The capacity of manno-oligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 475–481 (2004)

6. Barkai-Golan R., Paster N.: Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1. *World Mycotox. J.* **1**, 147–159 (2008)
7. Bejaoui H., Mathieu F., Taillandier P., Lebrihi A.: Conidia of black *Aspergilli* as new biological adsorbents for ochratoxin A in grape juices and musts. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8224–8229 (2005)
8. Bejaoui H., Mathieu F., Taillandier P., Lebrihi A.: Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 1038–1044 (2004)
9. Bolognani F., Rumney J., Rowland I.R.: Influence of carcinogen binding by lactic acid-producing bacteria on tissue distribution and in vitro mutagenicity of dietary carcinogens. *Food Chem. Toxicol.* **35**, 535–545 (1997)
10. Brown R.L., Cotty P.J., Cleveland T.E.: Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *J. Food Protect.* **54**, 623–628 (1991)
11. Caridi A.: Oenological functions of parietal yeast mannoproteins. *A. Van. Leeuwonhoek*, **89**, 417–422 (2006)
12. Caridi A.: New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 167–172 (2007)
13. Caridi A., Galvano F., Tafuri A., Ritieni A.: Ochratoxin A removal during winemaking. *Enzyme Microbiol. Technol.* **40**, 122–126 (2006)
14. Cecchini F., Morassut M., Moruno E.G., Di Stefano R.: Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiol.* **23**, 411–417 (2006)
15. Cheng-An H., Draughon F.A.: Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Food Protect.* **57**, 410–414 (1994)
16. Ciegler A., Lillehoj E.B., Peterson R.E., Hall H.H.: Microbial detoxification of aflatoxin. *Appl. Microbiol.* **14**, 934–938 (1996)
17. D'Souza D.H., Brackett E.: Aflatoxin B₁ degradation by *Flavobacterium aurantiacum* in the presence of reducing conditions and seryl and sulfhydryl group inhibitors. *J. Food Protect.* **64**, 268–271 (2001)
18. Dalié D.K.D., Deschamps A.M., Richard-Forget F.: Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, **21**, 370–380 (2010)
19. De Felice D.V., Solfrizzo M., De Curtis F., Lima G., Visconti A., Castoria R.: Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology*, **98**, 1261–1270 (2008)
20. Doyle M.P., Applebaum R.S., Brackett R.E., Marth E.H.: Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *J. Food Protect.* **45**, 964–971 (1982)
21. Doyle M.P., Marth E.H.: Aflatoxin is degraded at different temperatures and pH by mycelia of *Aspergillus parasiticus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 95–100 (1978)
22. El-Nezami H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J.: Physico-chemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *J. Food Sci.* **61**, 466–468 (1998)
23. El-Nezami H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J.: Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 321–326 (1998)
24. El-Nezami H., Mykkänen H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J.: Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B₁ from chicken duodenum. *J. Food Protect.* **63**, 549–552 (2000)
25. El-Nezami H., Salminen S., Mykkänen H.: Probiotic bacteria-mycotoxins interaction: an approach to enhance food safety. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **11/52**, 39–43 (2002)
26. El-Nezami H., Kankaanpää P., Salminen S., Ahokas J.: Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B₁. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 321–326 (1998)
27. Engler K.H., Coker R. D., Evans I.H.: Uptake of aflatoxin B₁ and T-2 toxin by two mycotoxin bioassay microorganisms: *Kluyveromyces marxianus* and *Bacillus megaterium*. *Archiv. Microbiol.* **174**, 381–385 (2000)
28. Filtenborg O., Frisvad J.C., Thrane U.: Moulds in food spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* **22**, 85–102 (1996)
29. Freimund S., Sauter M., Rys P.: Efficient adsorption of the mycotoxins zearalenone and T-2 toxin on a modified yeast glucan. *J. Environ. Sci. Health B.* **38**, 243–255 (2003)
30. Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., Knasmüller S.: Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 1398–1407 (2008)
31. Fusch E., Binder E.M., Heidler D., Krška R.: Structural characterization of metabolites after the microbial degradation of type A trichothecenes by the bacterial strain BBSH 797. *Food Additiv. Contam.* **19**, 379–386 (2002)
32. Glenn A.E.: Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Anim. Feed. Sci. Tech.* **137**, 213–240 (2007)
33. Gourama H., Bullerman L. B.: Antimycotic and antiaflatoxinogenic effect of lactic acid bacteria: a review. *J. Food Protect.* **57**, 1275–1280 (1995)
34. Grajewski J.: Możliwości inaktywacji ochratoksyny A w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* u kurcząt. Wyd. Akademii Bydgoskiej, Bydgoszcz 2003.
35. Grajewski J., Błajet-Kosicka A., Twarużek M., Kosicki R., Drawe K.: Występowanie mikotoksyn w materiałach paszowych w latach 2006–2009. IX Międzynarodowa Konferencja Naukowa Mikotoksyny i grzyby pleśniowe. Bydgoszcz 2010, mat. konf. 58.
36. Grajewski J., Szczepaniak K., Mikłaszewska B.: Patogenne pleśnie i mikotoksyny w artykułach rolno-spożywczych i środowisku. VI Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Mikotoksyny w środowisku człowieka i zwierząt”, Bydgoszcz 2002, mat. konf. 127.
37. Gwiazdowska D., Czaczyk K.: Wpływ wybranych warunków środowiskowych na usuwanie zearalenonu przez bakterie fermentacji propionowej. IX Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Mikotoksyny i grzyby pleśniowe”. Bydgoszcz 2010, mat. konf. 45.
38. Hao Y.Y., Brackett R.E.: Removal of aflatoxin B₁ from peanut milk inoculated with *Flavobacterium aurantiacum*. *J. Food Sci.* **53**, 1384–1386 (1998)
39. Haskard C.A., El-Nezami H., Kankaanpää P.E., Salminen S., Ahokas J.T.: Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3086–3091 (2001)
40. He J., Zhou T., Young J.C., Boland G.J., Scott P.M.: Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **21**, 67–76 (2010)
41. Hult K., Teiling A., Gatenbeck S.: Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 443–444 (1976)
42. Hussein H.S., Brasel J.M.: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, **167**, 101–134 (2001)
43. Huwig A., Freimund S., Kappeli O., Dutler H.: Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.* **122**, 179–188 (2001)
44. Hwang C.A., Draughon F.: Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Food Protect.* **57**, 410–414 (1994)
45. Jouany J. P.: Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* **137**, 342–362 (2007)

46. Kabak B., Dobson A.: Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 593–619 (2006)
47. Kanakaana P., Tuomola E., El-Nezami H.S., Ahokas J., Salminen S.J.: Binding of aflatoxin B₁ alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in a Caco-2 model. *J. Food Protect.* **63**, 412–414 (2000)
48. Kiessling H.K., Petterson H., Sandholm K., Olsen M.: Metabolism of aflatoxin, ochratoxin A, zearalenone, and tree trichothecens by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1070–1073 (1984)
49. Koper W., Chrzanowska E., Chabowska D., Kuziemska A.: Nadzór nad żywnością importowaną – aflatoksyny. IX Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Mikotoksyny i grzyby pleśniowe. Bydgoszcz 2010, mat. konf. 22.
50. Lankaputhra W.E.V., Shah N.P.: Antimutagenic properties of probiotic bacteria and of organic acid. *Mut. Research*, **397**, 169–182 (1998)
51. Line J.E., Brackett R.E.: Factors affecting aflatoxin B₁ removal by *Flavobacterium aurantiacum*. *J. Food Protect.* **58**, 91–94 (1995)
52. Logrieco A., Moretti A., Solfrizzo M.: *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risk. *World Mycotox. J.* **2**, 129–140 (2009)
53. Magan N., Aldred D., Mylona K., Lambert R. J.W.: Limiting mycotoxins in stored wheat. *Food Additiv. Contam.* **27**, 644–650 (2010)
54. Mann R., Rehm H.J.: Degradation products from aflatoxin B₁ by *Corynebacterium rubrum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Mucor ambignus*. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **2**, 297–306 (1976)
55. Mateo E.M., Medina A., Mateo F., Valle-Algarra F.M., Pardo I.: Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. *Food Control*, **21**, 23–28 (2010)
56. Meca G., Blaiotta G., Ritieni A.: Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control*, **21**, 579–583 (2010)
57. Megalla S.M., Mohran M.A.: Fate of aflatoxin B₁ in fermented dairy products. *Mycopathologia*, **88**, 27–29 (1984)
58. Megharaj M., Garthwaite I., Thiele J.H.: Total biodegradation on the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 329–333 (1997)
59. Miklaszewska B., Kuźmińska K., Grajewski J.: Mikologiczne i mikotoksykologiczne skażenie w badanych próbkach pasz i żywności (w latach 2001–2004), VII Międzynarodowa Konferencja Naukowa: Mikotoksyny i patogenne pleśnie w środowisku, Bydgoszcz 2004, mat. konf. 221–226.
60. Molnar O., Schatzmayr G., Fuchs E., Prillinger H.: *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov. a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins, *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 661–671 (2004)
61. Moss M.O.: Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1239–1243 (2008)
62. Niderkorn V., Boudra H., Morgavi D.P.: Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria *in vitro*. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 849–856 (2006)
63. Oatley J.T., Rarick M. D., Eogij G., Lemz J.: Binding of aflatoxin B₁ to Bifidobacteria *in vitro*, *I. Assoc. Food Protect.* **63**, 1133–1136 (2000)
64. Ostry V.: *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotox. J.* **1**, 175–188 (2008)
65. Özpınar H., Augonyte G., Drochner W.: Inactivation of ochratoxin in ruminal fluid with variation of pH-value and fermentation parameters in an *in vitro* system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **7**, 1–9 (1999)
66. Paster N., Barkai-Golan R.: Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 2. *World Mycotox. J.* **1**, 385–396 (2008)
67. Paterson R. R. M., Lima N.: How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res. Int.* **43**, 1902–1914 (2010)
68. Patharajan S., Reddy K.R.N., Karthikeyan V., Spadaro D., Lore A., Gullino M.L., Garibaldi A.: Potential of yeast antagonists on *in vitro* biodegradation of ochratoxin A. *Food Control*, **22**, 290–296 (2011)
69. Peltonen K.D., El-Nezami H., Salminen S., Ahokas J.T.: Binding of aflatoxin B₁ by probiotic bacteria. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1942–1945 (2000)
70. Peraica M., Domijan A.-M., Jurjević Ž., Cvjetković B.: Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. *Arch. Hig. Rada Toksikol.* **53**, 229–237 (2002)
71. Peteri, Z., Teren, J., Vagvolgyi, C., Varga, J.: Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiol.* **24**, 205–210 (2007)
72. Pietryna M.: Zanieczyszczenie pasz ochratoksyną A, zearalenonem, deoksynivalenolem w latach 2005–2009. IX Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Mikotoksyny i grzyby pleśniowe. Bydgoszcz 2010, mat.konf. 54
73. Pierides M., El-Nezami H., Peltonen K., Salminen S., Ahokas J.P.: Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M₁ in a food model. *J. Food Protect.* **63**, 645–650 (2000)
74. Piotrowska M., Arkusz J., Stańczyk M., Palus J., Dziubałtowska E., Stępnik M.: The influence of lactic acid bacteria and yeasts on cytotoxicity and genotoxicity of ochratoxin A. 30th Mycotoxin Workshop, Utrecht, The Netherlands, 28–30 April, 2008, abstract book 146.
75. Piotrowska M., Żakowska Z.: The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria. *Pol. J. Microbiol.* **54**, 279–286 (2005)
76. Piotrowska, M., Żakowska, Z.: The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Food Biotechnol.* **17**, 307–310 (2000)
77. Piotrowska, M.: Reduction of ochratoxin A level in raw materials and model media by *Saccharomyces cerevisiae*. 28 Mycotoxin-Workshop, Bydgoszcz 2006, abstracts book, 130
78. Postupolski J., Karłowski K.: Ochratoksyna A w wybranych środkach spożywczych i w próbkach całodziennych posiłków. V Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Mikotoksyny i dioksyny a środowisko”, Bydgoszcz 2000, mat. konf. 175
79. Raić J.L., Kinjar M., Markov S.: Decrease of aflatoxin B₁ in yoghurt and acidified milks. *Mycopathologia*, **113**, 117–119 (1991)
80. Raju M.V.L.N., Devegowda G.: Influence of esterified glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). *British Poultry Sci.* **41**, 640–650 (2000)
81. Richard J.L.: Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 3–10 (2007)
82. Scott P.M., Kanhere S.R., Lawrence G.A., Daley E.F., Farber J.M.: Fermentation of wort containing ochratoxin A and fumonisin B₁ and B₂. *Food Additiv. Contamin.* **1**, 31–40 (1995)
83. Shetty P.H., Hald B., Jespersen L.: Surface binding of aflatoxin B₁ by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* **113**, 41–46 (2007)
84. Sinha K. K.: Decontamination of mycotoxins and food safety. *Toxicol. Lett.* **122**, 179–188 (2001)
85. Škinjar M., Raić J. L., Stojic V.: Lowering of ochratoxin A level in milk by yoghurt bacteria and Bifidobacteria. *Folia Microbiol.* **41**, 1, 26–28 (1996)

86. Ślizewska K., Piotrowska M., Libudzisz Z.: Influence of a probiotic preparation on the aflatoxin B₁ content in feces, blood serum, kidneys and liver of chickens fed on aflatoxin B₁ contaminated fodder (*in vivo* tests). 30th Mycotoxin Workshop, Utrecht, The Netherlands, 28–30 April, 2008, abstract book 130
87. Smiley R.D., Draughon F.A.: Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B₁ by *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic. *J. Food Protect.* **63**, 415–418 (2000)
88. Sobrova P., Adam V., Vasatkova A., Beklova M., Zeman L., Kizek R.: Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisc. Toxicol.* **3**, 94–99 (2010)
89. Stander M.A., Bornscheuer U.T., Henke E., Steyn P.S.: Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5736–5739 (2000)
90. Štyriak I., Čonková E., Kmet V., Böhm J., Razzazi E.: The use of yeast for microbial degradation of some selected mycotoxins. *Mycotoxin Res.* **17A**, 24–27 (2001)
91. Teniola O.D., Addo P.A., Brost I.M., Farber P., Jany K.D., Alberts J.F., Vanzyl W.H., Steyn P.S., Holzapfel W.H.: Degradation of AFB₁ by cell free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. *Int. J. Food Microbiol.* **105**, 111–117 (2005)
92. Turbic A., Ahokas J.T., Haskard C.A.: Selective in vitro binding of dietary mutagens, individually or in combination, by lactic acid bacteria. *Food Add. Contamin.* **19**, 144–152 (2002)
93. Var I., Ergikaya Z., Kabak B.: Reduction of ochratoxin A levels in white wine by yeast treatments. *J. Inst. Brew.* **115**, 30–34 (2009)
94. Varga J., Peteri Z., Tabori K., Teren J., Vagvolgyi C.: Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* **99**, 321–328 (2005)
95. Varga J., Rigo K., Teren J.: Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* **59**, 1–7 (2000)
96. Wild C.P., Gong Y.Y.: Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* **31**, 71–82 (2010)
97. Yiannikouris A., Andre G., Poughon L., Francois J., Dussap C.-G., Jeminet G., Bertin G., Jouany J.-P.: Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxins complexation with β -D-glucans. *Biomacromolecules*, **7**, 1147–1155 (2006)
98. Yiannikouris A., Francois J., Poughon L., Dussap C.G., Bertin G., Jeminet G., Jouany J. P.: Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Food Protect.* **67**, 1195–1200 (2004)
99. Young J.C., Zhou T., Yu H., Zhu H., Gong J.: Degradation of trichotecene mycotoxins by chicken intestinal microbes. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 136–143 (2007)
100. Zhang X.B., Ohta Y.: Binding of mutagens by fractions of lactic acid bacteria on mutagens the cell wall skeleton. *J. Dairy Sci.* **74**, 1477–1481 (1991)

Karolina Kowalkowska¹, Anna Okulewicz^{1*}

Zakład Parazytologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski
ul. Przybyszewskiego 63-77, 51-148 Wrocław

Wpłynęło sierpniu 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Jelitowa flora bakteryjna gryzoni. 3. Badania na zwierzętach doświadczalnych. 4. Podsumowanie

Interactions between intestinal microflora and parasites of rodents

Abstract: Natural intestinal microflora is a complex system of microorganisms providing homeostasis in the gastrointestinal tract of the host. Next to the bacterial commensals, there are other, larger and more hostile to the host organisms such as parasites. Laboratory rodent (mice and rats) may be contaminated with intestinal parasites, mainly pinworm species. Helminth parasites can alter the interpretation of final results. It is known that intestinal flora and parasites of animals may interact with each-other, but the nature of those relationships is not fully investigated. Unfortunately, our state of knowledge does not allow to predict the direction of those interactions, hence it seems important to carry out further research on this issue. In this work, current results of experimental studies on interactions between intestinal microflora and parasites of rodents are presented.

1. Introduction. 2. Intestinal bacterial flora of rodents. 3. Studies in experimental animals. 4. Summary

Słowa kluczowe: flora jelitowa, pasożyty, nicienie, zależności, gryzonie konwencjonalne, germ-free, zwierzęta laboratoryjne

Key words: intestinal flora, parasites, nematodes, interactions, conventional rodents, germ-free, laboratory animals

1. Wprowadzenie

Gryzonie laboratoryjne – myszy, szczury, myszokoczek (gerbille), świnki morskie, bardzo często są wykorzystywane do badań eksperymentalnych. Według wykazu zwierząt laboratoryjnych hodowanych w Polsce [10] obecnie wiele szczepów gryzoni (wsobnych, kongenicznych, koizogenicznych, nie krewniaczych) jest obiektem badań immunologicznych, farmakologicznych, toksykologicznych, biochemicznych, biomedycznych, nad nowotworami i innych. W celach doświadczalnych powinny być wykorzystywane nie tylko zwierzęta zdrowe, ale również takie które nie są nosicielami zakażeń patogennych.

Aby uniknąć takich zagrożeń została opracowana, przy udziale WHO, FAO, ILAR, ICLAS, kategoryzacja zwierząt laboratoryjnych z podziałem na: gnotobiotyczne (wśród nich *germ-free*, monobionty, dibionty i polibionty); zwierzęta SPF (Specified Pathogen Free) i zwierzęta konwencjonalne (hodowle kontrolowane i otwarte) [3].

Zwierzęta konwencjonalne rzadko bywają badane w kierunku zarażenia pasożytami, których obecność może zmienić interpretację ostatecznych wyników badań eksperymentalnych [18]. Jak wykazały ekspertyzy w wielu hodowlach u myszy stwierdzone są przede wszystkim jelitowe nicienie, owsiki *Oxyuridae* z gatunków *Syphacia obvelata* i *Aspicularis tetraptera*, a u szczu-

rów *Syphacia muris*, rzadziej tasiemce [1, 17]. Niewielka intensywność inwazji pasożytów nie wywołuje na ogół objawów chorobowych u tych zwierząt i może nie wzbudzać niepokoju osób nadzorujących hodowle. Ustalono, że *Oxyuridae* mogą służyć jako biologiczne wskaźniki biologicznego zanieczyszczenia pomieszczeń dla zwierząt laboratoryjnych i ich występowanie (z wyszczególnieniem gatunków) powinno być wykazywane w sprawozdaniach z monitoringu ich zdrowia [23].

Pasożyty współwystępują w określonych odcinkach jelita (mikrohabitatach) z naturalną mikroflorą bakteryjną zwierząt. Mikroflora występująca na całej długości układu pokarmowego, oprócz wspomagania procesów trawiennych zachodzących w jelitach, jest także ważnym czynnikiem zapobiegającym bądź ograniczającym osiedlanie drobnoustrojów chorobotwórczych oraz organizmów pasożytniczych. Wysunięto tezę, że zmieniony skład jakościowy i ilościowy flory bakteryjnej żywiciela może przyczynić się do nasilenia inwazji patogenów i zintensyfikowania objawów chorobowych.

2. Jelitowa flora bakteryjna gryzoni

Badania mikroflory jelitowej gryzoni zostały podjęte w latach 60. XX wieku przez zespół Russella W. Schaedlera [22]. Eksperymentalnie kolonizowano myszy laboratoryjne wybranymi szczepami

* Autor korespondencyjny: Zakład Parazytologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych UW, ul. Przybyszewskiego 63-77, 51-148 Wrocław; e-mail: anna.okulewicz@microb.uni.wroc.pl

bakterii, izolowanymi z mikroflory zwierząt pochodzących z konwencjonalnych hodowli. W ich wyniku wyizolowano 8 szczepów bakterii najczęściej zasiedlających jelita gryzoni. W skład mikroflory wg Schaedlera wchodziły: *Escherichia coli* var. *mutabilis*, *Streptococcus* (*Enterococcus*) *faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *Streptococcus* z grupy N, *Bacteroides distasonis*, *Clostridium* sp., a także bakterie EOS – Extremely Oxygen Sensitive. W roku 1978 badacze z National Cancer Institute (NCI) dokonali weryfikacji składu flory opisanej przez Schaedlera i złożonej z 8 szczepów bakterii. Celem ich pracy było ujednolicenie mikroflory stosowanej do kolonizacji myszy gnotobiotycznych (germ-free). Autorzy [16] opracowali nową definicję mikroflory obecnie znaną jako „Zmieniona Flora Schaedlera” (ASF – Altered Schaedler Flora). W skład „Zmienionej Flory Schaedlera” (ASF) wchodzi 3 gatunki z pierwotnego zestawu: *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *Bacteroides distasonis* oraz szczególnie wrażliwe na tlen bakterie wrzecionowate (EOS), a także bakterie spiralne i 3 nowe szczepy niezwykle wrażliwych na tlen bakterii wrzecionowatych (EOS).

Na progu XXI wieku Dewhirst i wsp. [4] na podstawie sekwencji 16S rRNA chcieli przekonać się czy w skład mikroflory jelitowej gryzoni wchodzi te same szczepy które zostały zakwalifikowane jako „Zmieniona Flora Schaedlera” (ASF). Wykazano, że większość mikroflory jelit stanowią wrzecionowate bakterie lub stożkowate pałeczki określone jako niezwykle wrażliwe na tlen bakterie EOS – Extremely Oxygen Sensitive. Bakterie te przewyższają liczebnie bezwzględne beztlenowce. Wielu bakterii EOS nie udało hodować *in vitro*, a jeszcze mniej z nich zostało zidentyfikowanych.

Również inni badacze, na przestrzeni lat, zajmowali się florą bakteryjną gryzoni wykazując że bezwzględnie beztlenowe bakterie stanowią co najmniej 99% flory jelitowej tych zwierząt. Według [6] są to głównie bakterie *Lactobacillus* sp., i *Bacteroides* sp. zaś inni badacze [7] wyizolowali z treści jelita grubego myszy laboratoryjnych dodatkowo bakterie z rodzajów: *Eubacterium* sp., *Fusobacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp. i *Propionibacterium* sp. U innych gryzoni laboratoryjnych mikroflora jelitowa jest podobna. Według WORTHINGTONA i FULGHUMA [30] u myszokoczków występują bakterie z rodzajów: *Lactobacillus* sp. (najczęściej izolowany), *Bacteroides* sp., a także *Bifidobacterium* sp. i gatunki *Escherichia coli* oraz *Acinetobacter calcoaceticus*, zaś u szynszyli najczęściej identyfikowano bakterie z rodzajów *Bacteroides* sp., *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp.

Liczba mikroorganizmów w jelitach gryzoni jest ogromna. W 1 g treści jelita grubego myszy może wynosić od $4,4 \times 10^{10}$ do około 10^{11} bakterii [4, 7].

Tak duża liczba mikroorganizmów zapewnia intensywną działalność metaboliczną zwłaszcza w jelicie grubym zwierzęcia [11]. Mikroorganizmy te nie tylko

dostarczają niezbędnych substancji odżywczych (np. witaminy K) dla gospodarza, ale także chronią przed kolonizacją błon śluzowych przez drobnoustroje chorobotwórcze. Np. liczne badania wykazały zwiększoną podatność myszy laboratoryjnych pozbawionych bakterii na różne czynniki zakaźne w porównaniu do myszy z normalną florą [4]. Wyniki innych badań [5, 6] ujawniły, że flora bakteryjna jelit jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania układu pokarmowego, trawienia pokarmu a także kompetencji układu odpornościowego. Drobnoustroje pełnią również ważne funkcje metaboliczne, polegające na rozkładaniu obecnych w pożywieniu toksyn i karcynogenów.

3. Badania na zwierzętach doświadczalnych

Pod koniec lat 50. XX wieku podjęto również badania wzajemnych oddziaływań między pasożytami a florą jelitową zwierząt, głównie laboratoryjnych. Nieliczne prace dotyczyły eksperymentalnych zarażeń gryzoni patogennymi pierwotniakami. PHILLIPS i WOLFE [19] zaobserwowali że, u pozbawionych mikroflory jelitowej (gnotobiotycznych) świnek morskich, zarażonych pełzakiem czerwonej *Entamoeba histolytica* przebieg choroby jest łagodniejszy w porównaniu z osobnikami konwencjonalnymi. Leczą u monobiontów (zasiedlanych jednym gatunkiem bakterii), w zależności od użytych szczepów bakteryjnych, występowały objawy porównywalne do obserwowanych u zwierząt z pełną mikroflorą.

Zdecydowanie więcej prac opartych jest na zarażeniach doświadczalnych gryzoni laboratoryjnych pasożytniczymi helmintami, a zwłaszcza nicieniami. Jednymi z pierwszych którzy przystąpili do badań dotyczących oddziaływań między pasożytami a florą jelitową gryzoni byli polscy badacze – Zdzisław PRZYJAŁKOWSKI i Witold STEFAŃSKI. Ich działalność przypadała na lata 60. i 70. ubiegłego wieku, a prace oparte były w dużej mierze na eksperymentalnych zarażeniach myszy i szczurów nicieniami *Aspicularis tetraptera* i *Trichinella spiralis* [20, 21, 24]. W prowadzonych doświadczeniach autorzy wykazali, że naturalna flora bakteryjna jelit wpływa korzystnie lub jest wręcz niezbędna do rozwoju inwazji pasożytniczych nicieni. W wyniku eksperymentów wykazali m.in. konieczność obecności prawidłowej flory jelitowej podczas zarażenia owsikiem *A. tetraptera* [25].

Także wpływ prawidłowej mikroflory jako czynnika stymulującego do osiedlania się pasożytów i ich rozwoju w jelicie żywiciela wykazały doświadczenia przeprowadzane w tym okresie przez WESCOTTA [26, 28]. Prace autora opierały się na obserwacjach zależności między obecnością bakterii a rozwojem i lokalizacją nicienia *Nippostrongylus brasiliensis* u myszy. *N. brasiliensis* jest kosmopolitycznym pasożytem szczurów i myszy, który

usadawia się na nabłonku śluzówki jelita, pomiędzy kosmkami. Do zarażenia nowych osobników dochodzi poprzez larwy inwazyjne (L3), które żyją w kale zakażonych gryzoni i odżywiają się występującymi tam bakteriami [29]. Larwy te wnikają do żywiciela przez skórę lub *per os*. Cykl życiowy pasożyta obejmuje wędrówkę przez płuca i końcową lokalizację w obrębie jelita cienkiego w ciągu około tygodnia od momentu wniknięcia larw. W wyniku przeprowadzonego doświadczenia więcej larw *N. brasiliensis* znaleziono w płucach myszy konwencjonalnych niż u myszy *germ-free* zarówno po 48 h jak i 8 dniach od infekcji [26]. Podobne zależności zaobserwowano wcześniej [14] u eksperymentalnie zarażonych tym pasożytem świnek morskich. Również tutaj zanotowano większą liczbę larw wędrujących nicienia u zwierząt z normalną florą jelitową niż u świnek gnotobiotycznych. Także w trakcie dalszej wędrówki tego nicienia w organizmie myszy z pełną florą bakteryjną w jelitach rozwinęło się więcej dorosłych osobników niż u myszy bezbakteryjnych.

Lepszym modelem wydają się być pasożyty, których cykl rozwojowy odbywa się wyłącznie w obszarze układu pokarmowego i charakteryzuje się dłuższą przeżywalnością, stąd w dalszych doświadczeniach jako modelu użyto [27] nicienia *Nippostrongylus dubius*. Larwy tego pasożyta nie wędrują przez płuca, lecz krótko po rozpoczęciu inwazji wnikają w śluzówkę by po okresie około tygodnia przedostać się z powrotem do światła jelita. U zwierząt zarażanych *per os* dorosłe osobniki pasożyta uzyskiwały dojrzałość po 10 dniach od zarażenia a inwazja utrzymywała się do 4 miesięcy. Pierwsze obserwacje wykazały, że larwy *N. dubius* rozwijały się w osobniki dorosłe mniej licznie u myszy bezbakteryjnych niż konwencjonalnych. Dodatkowo pasożyty izolowane z jelit myszy *germ-free* osiągały mniejsze wymiary i zawierały mniejszą liczbę jaj. Dalsze badania wykazały zmiany patologiczne (obecność guzków) w jelitach obu grup myszy, które jednak zaczęły zanikać po około tygodniu u myszy z normalną florą jelitową, u pozostałych gryzoni utrzymywały się przez ponad 60 dni.

Podobne wnioski można wysnuć na podstawie późniejszych badań [13], w których wykorzystano węgorki *Strongyloides venezuelensis* w eksperymentalnych zarażeniach gryzoni. Na podstawie analiz parazytologicznych (określenie liczby pasożytów w jelitach) i histopatologicznych (zmiany morfologiczne) badacze wykazali większą inwazyjność tego nicienia u myszy gnotobiotycznych niż u myszy konwencjonalnych. Wyniki te wskazują że ekosystem bakterii jelitowych wpływa na przebieg infekcji *S. venezuelensis* a dodatkowe podawanie antybiotyków gryzoniom może pogłębić patogenność nicienia poprzez redukcję flory jelitowej.

Jednak w niektórych przypadkach mikroflora przewodu pokarmowego wydaje się być obojętna w osiedlaniu, rozwoju i egzystencji pasożytów, co wykazano na

przykładzie tasiemców *Hymenolepis diminuta*. Pasożyty te żyją w świetle jelita, a sposób ich odżywiania nie jest związany z penetracją śluzówki jelit, rozwijają się równie dobrze zarówno u myszy i szczurów bezbakteryjnych, jak i konwencjonalnych [9].

Szereg prac dotyczy stymulującego lub hamującego działania monokultur bakterii na jelitowe pasożyty wewnętrzne – głównie nicienie. Przyjałkowski [21] doświadczalnie wykazał, że *Staphylococcus epidermidis* hamuje rozwój włośni *Trichinella spiralis* a stymulujący wpływ na jego rozwój mają bakterie Gram-ujemne *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Proteus* sp.

W innych eksperymentach [12] wykazano, że w obecności bakterii z grupy *Bacillaceae* samice nicienia jelitowego *Heligmosomoides polygyrus* pasożytujące u gryzoni produkują martwe, zdeformowane jaja z nie wykształconą larwą. Dodatkowo u dorosłych samic nicieni w części głowowej i w okolicy wulwy zaobserwowano anomalie w budowie oskórka. Zmiany te powiązano z wydzielaniem przez bakterie m.in. chitynazy oraz brakiem prawidłowej flory bakteryjnej u myszy *germ-free* mogących neutralizować niekorzystny wpływ *Bacillaceae* na rozwój nicieni.

Doświadczenia przeprowadzane na gryzoniach bezbakteryjnych monobiontycznych, zasiedlonych jednym gatunkiem – *Bacillus mesentericus*, *Pseudomonas aeruginosa* lub *Lactobacillus* sp. i zarażonych nicieniami *Nippostrongylus dubius* ujawniły, że w jelitach takich zwierząt rozwijało się więcej dojrzałych form pasożyta niż u myszy *germ-free*, lecz mniej niż u gryzoni konwencjonalnych [2]. W jelitach myszy zarażonych bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* sp. obserwowano mniej zmian patologicznych w postaci guzków, a dorosłe samice nicienia były bardziej płodne (zawierały więcej jaj) w stosunku do pasożytów uzyskanych z myszy bezbakteryjnych. Stąd wniosek, że ten rodzaj bakterii ma znaczący wpływ na kształtowanie się układu pasożyt-żywićiel, gdyż stymuluje rozwój inwazji pasożytniczych.

Także doświadczenia przeprowadzone na modelu mysim z użyciem włośni *Trichinella spiralis* wykazały, że dorosłe postacie pasożyta występowały liczniej u gryzoni z pełną florą jelitową niż u gryzoni zarażonych tylko jednym gatunkiem bakterii – *Pseudomonas aeruginosa* [21].

Z nowych badań [8] wynika że niektóre gatunki bakterii wydają się być wręcz niezbędne do przebiegu inwazji pasożytniczej. Autorzy badali *in vitro* wpływ obecności żywych i martwych bakterii *Escherichia coli* na zdolność rozwoju larw włosogłówki mysiej *Trichuris muris*. W zaprojektowanym doświadczeniu inkubowali jaja tego nicienia w treści jelitowej pochodzącej z jelita ślepego myszy oraz, aby określić znaczenie bakterii w procesie wylęgania, jaja inkubowano także w monokulturze *E. coli*. W obu próbach uzyskano zbliżone wyniki – podobna liczba larw nicienia wylęgła się w obecności pełnej flory jelitowej jak i w przypadku

kontaktu z samymi pałeczkami okrężnicy. Wylęganie larw następowało tylko w temperaturze 37°C, sugerując tym samym istotny wpływ tego czynnika na rozwój pasożyta, prawdopodobnie chroniący w ten sposób larwy przed opuszczaniem osłonek jajowych w środowisku zewnętrznym. Istotną częścią doświadczenia było również stwierdzenie czy do wylęgu larw włosogłówek niezbędne są żywe bakterie czy tylko struktury tych mikroorganizmów. Ostatecznie wykazano, że więcej larw włosogłówek wylęgło się w obecności żywych bakterii *E. coli* niż w obecności bakterii zabitych przez wysoką temperaturę. Badacze tym samym dowiedli, że komunikacja i oddziaływanie między organizmami opierają się na kontakcie żywych organizmów a nie na działaniu neuroprzekazników bądź wyłącznie obecności struktur komórkowych bakterii i pasożyta.

Cytowane wyżej wyniki badań uwiarygodniły wpływ pełnej mikroflory, bądź poszczególnych bakterii na rozwój pasożytów jelitowych u gryzoni laboratoryjnych. Natomiast badania autorów brazylijskich [15] dotyczą drugiego aspektu – wpływu nicieni *Angiostrongylus costaricensis* na stan endogennej flory jelitowej. U eksperymentalnie zarażonych myszy szczepu Swiss Webster tymi pasożytami, które zasiedlają tylne odcinki jelita, znacząco wzrosła liczba jelitowych bakterii tlenowych – w jelicie krętym z $4,4 \times 10^7$ do $1,7 \times 10^8$. Podczas gdy beztlenowce z rodzaju *Peptostreptococcus* w okrężnicy zarażonych zwierząt osiągnęły wartość $7,5 \times 10^8$ a w grupie kontrolnej było ich $1,5^9$. Badacze sugerują, że takie zmiany jelitowej mikroflory u myszy pod wpływem zarażenia nicieniami mogą pomóc w rozwiązywaniu problemów w niektórych infekcjach bakteryjnych także u ludzi.

4. Podsumowanie

Wpływ bakterii na osiedlanie i rozwój pasożytów jest faktem niezaprzeczalnym, podobnie jak niejednostronność tych relacji. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że rola naturalnej flory bakteryjnej w regulacji układu pasożyt-żywiciel kształtuje się w sposób zróżnicowany. Na ogół ma wpływ stymulujący na rozwój pasożytów, jednak czasami jej obecność nie ma żadnego znaczenia. Wykazano również że monokultury poszczególnych bakterii mogą mieć dodatni lub hamujący wpływ na helminty jelitowe, a głównie nicienie. Badania wykazały także, że inwazja pasożytnicza rozwijająca się w jelicie żywiciela powoduje zmiany ilościowe bakterii bytujących we wspólnym mikrohabitaacie.

Niestety współczesny stan wiedzy nie pozwala przewidzieć kierunku interakcji danego gatunku mikroorganizmu i organizmu pasożytniczego oraz efektu tego związku na organizm żywiciela, stąd tak ważnym wydaje się prowadzenie dalszych badań nad tym zagad-

nieniem. Znajomość poszczególnych oddziaływań być może pozwoli w przyszłości na bardziej skuteczną walkę zarówno z pasożytami zwierząt jak i człowieka.

Piśmiennictwo

1. Bazzano T., Resettel T.I., Pinto R.M., Gomes D.C.: Patterns of infection with the Nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice. *Mem. Instit. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*, **97**, 1–5 (2002)
2. Chang J., Wescott, R.B.: Infectivity, fecundity, and survival of *Nematospirides dubius* in gnotobiotic mice. *Exp. Parasitol.* **32**, 327–334 (1972)
3. Czarnowska A., Brylińska J.: Nazewnictwo najczęściej używanych modeli zwierząt laboratoryjnych. W: *Zwierzęta Laboratoryjne Hodowane Ośrodkach naukowych w Polsce. Wykaz VII. Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych. Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2010*
4. Dewhirst F.E., Chien Ch., Paster B.J., Ericson R.L., Orcutt R.P., Schauer D.B., Fox J.G.: Phylogeny of the Defined Murine Microbiota: Altered Schaedler Flora. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3287–3292 (1999)
5. Dibaise J.K., Zhang H., Crowell M.D., Kraimalnik-Brown R., Decker G.A., Bruce E.P.: Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clinic Proc.* **83**, 460–469 (2008)
6. Foo M. C., Lee A.: Immunological response of mice to members of the autochthonous intestinal microflora. *Infect. Immun.* **6**, 525–532 (1972)
7. Harris M.A., Reddy C.A., Carter G.R.: Anaerobic bacteria from the large intestine of mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 907–912 (1976)
8. Hayes K.S., Bancroft A.J., Goldrick M., Portsmouth C., Roberts I.S., Grencis R. K.: Exploitation of the Intestinal Microflora by the Parasitic Nematode *Trichuris muris*. *Science*, **328**, 1391–1394 (2010)
9. Houser B.B., Burns W.C.: Experimental infection of gnotobiotic *Tenebrio molitor* and white rats with *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidae). *J. Parasitol.* **54**, 69–73 (1968)
10. Krysiak E., Unrug-Bielawska K.: *Zwierzęta Laboratoryjne Hodowane Ośrodkach naukowych w Polsce. Wykaz VII. Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych. Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2010*
11. Lenoir-Wijnkoop I., Hopkins M.: The intestinal microflora. Understanding the symbiosis. 6–10 (2003)
12. Lewis J.W., Mathers P.D.: The microbial environment and intestinal nematode infections of *Heligmosomoides polygyrus* in laboratory mice. *Lab. Anim.* **22**, 109–116 (1988)
13. Martins W.A., Melo A.L., Nicoli J.R., Cara D.C., Carvahlo M.A.R., Lana M.A., Vieira E.C., Farias L.M.: A method of decontaminating *Strongyloides venezuelensis* larvae for the study of strongyloidiasis in germ-free and conventional mice. *J. Med. Microbiol.* **49**, 387–390 (2000)
14. Newton W.I., Weinstein P.P., Jones M.F.: A comparison of the development of some rat and mouse helminths in germfree and conventional guinea pigs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **78**, 290–307 (1959)
15. Nobre V., Serufo J.C., Carvalho O.S., Gomes C.L., Mendonca F., Santos S.G., Mota E.M., Gomes D., Braga E., Antunes C.M.F., Lenzi H.L., Lambertucci J.R.: Alteration in the Endogenous Intestinal Flora of Swiss Webster Mice by Experimental *Angiostrongylus costaricensis* Infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*, **99**, 717–720 (2004)

16. Orcutt R.P., Gianni F.J., Judge R.J.: Development of an „Altered Schaedler Flora” for NCI gnotobiotic rodents. *Microecol. Ther.* **17**, 59 (1987)
17. Pacoń J., Piekarska J.: Pasożyty myszy w wybranych hodowlach zwierząt laboratoryjnych. *Wiad. Parazytol.* **50**, 93–94 (2004)
18. Perec-Matysiak A., Okulewicz A., Hidebrand J., Zaleśny G.: Helminth parasites of laboratory mice and rats. *Wiad. Parazytol.* **52**, 99–102 (2006)
19. Phillips B.P., Wolfe P.A.: The use of germfree guinea pigs in studies on the microbial interrelationships in amoebiasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **78**, 308–314 (1959)
20. Przyjałkowski Z.: Badania nad osiedlaniem *Aspicularis tetraptera* Nitzsch 1821 (Nematoda, Oxyuridae) u myszy bezbakteryjnych, *Acta Parasitol. Pol.* **20**, 389–395 (1972)
21. Przyjałkowski Z.: Effect of intestinal bacteria on the host response in *Trichinella spiralis* infection. *Acta Parasitol. Pol.* **25**, 287–292 (1978)
22. Schaedler R.W., Dubos R., Costello R.: The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J. Exp. Med.* **122**, 59–66 (1965)
23. Shibahara T.: Necessity of reexamining the pathogenicity and elimination of parasites in rats and mice. Microbial status and genetic evaluation of mice and rats. Proc. of the 1999 US/Japan Conference: 21–26 (1999)
24. Stefański W., Przyjałkowski Z.: Badania nad układem włóśnie-bakterie w przewodzie pokarmowym myszy. *Wiad. Parazytol.* **10**, 295–298 (1964)
25. Stefański W.: Flora bakteryjna jako jeden z czynników wpływających na osiedlenie się pasożytów w jelitach ich żywicieli. *Acta Parasitol. Pol.* **12**, 1–6 (1965)
26. Wescott, R.B., Todd A. C.: A comparison of the development of *Nippostrongylus brasiliensis* in germ-free and conventional mice. *J. Parasitol.* **50**, 138–143 (1964)
27. Wescott R.B.: Experimental *Nematospiroides dubius* infection in germfree and conventional mice. *Exptl. Parasitol.* **22**, 245–249 (1968)
28. Wescott R.B.: Metazoa-Protozoa-Bacteria Interrelationships. *Am. J. Clin. Nutr.* **23**, 1502–1507 (1970)
29. Weinstein P.P.: Vitamin B₁₂ changes in *Nippostrongylus brsi-liensis* in its free-living and parasitic habitats with biochemical implications. *J. Parasitol.* **82**, 1–6 (1996)
30. Worthington J.M., Fulghum R.S.: Cecal and fecal bacterial flora of the Mongolia gerbil and the chinchila. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1210–1215 (1988)

ROLE OF ASPARTIC PROTEINASES
IN *CANDIDA ALBICANS* VIRULENCE.
PART I. SUBSTRATE SPECIFICITY OF ASPARTIC PROTEINASES
AND *CANDIDA ALBICANS* PATHOGENESIS

ROLA PROTEAZY ASPARTYLOWEJ W WIRULENCJI *CANDIDA ALBICANS*
CZĘŚĆ I. SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA PROTEAZY ASPARTYLOWEJ
A PATOGENEZA ZAKAŻEŃ *CANDIDA ALBICANS*

Monika Staniszeńska^{1*}, Małgorzata Bondaryk¹, Katarzyna Siennicka², Joanna Piłat³,
Martin Schaller⁴, Wiesław Kurzątkowski¹

¹Independent Laboratory of Streptomyces and Fungi Imperfecti, National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene,
Chocimska 24, 00-791 Warsaw, Poland

²Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 166, 02-787 Warsaw, Poland

³Warsaw University of Technology, Pl. Politechniki 1, 00-661 Warsaw, Poland

⁴Department of Dermatology, Eberhard-Karls-University Tübingen, Liebermeisterstrasse 2572076, Tübingen, Germany

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wstęp. 1.1. *Candida albicans* – patogen oportunistyczny. 1.2. Kandydozy. 2. Zewnątrzkomórkowe enzymy a wirulencja *C. albicans*.
3. Produkcja proteazy aspartylowej przez morfotypy *C. albicans*. 4. Podsumowanie

Abstract: *Candida albicans* resides mainly as a harmless commensal in the gastrointestinal tract, vagina and some cutaneous areas of humans. However, in individuals who are immunocompromised or debilitated in some other way, *C. albicans* is responsible for superficially-localized or systemic infections. *Candida albicans* produces a large family of secreted aspartyl proteinases (Saps) which are key virulence factors in *C. albicans* pathogenesis. Saps contribute to infection by degrading tissue barriers and destroying host defense molecules. The secretion of Saps varies depending on the *C. albicans*' morphologies, the site and stage of infection, and the nature of the host response. This review focuses on characteristics and function of the members of aspartyl proteinases, which have been studied in more detail. It should be noted that the discrepancies in individual Sap's role in the virulence of *C. albicans* may result from differences in the sensitivity of methods used, or differences in infection models and stage of the epithelial cells, or variability among *C. albicans* strains.

1. Introduction. 1.1. *Candida albicans* as a commensal and as a pathogen. 1.2. Candidiasis. 2. Extracellular enzymes and *C. albicans* virulence. 3. *Candida albicans* aspartic proteinases. 4. Summary

Słowa kluczowe: *Candida albicans*, kandydoza, proteaza aspartylowa, wirulencja

Key words: *Candida albicans*, aspartic proteinases, candidiasis, virulence

1. Introduction

1.1. *Candida* as a commensal and as a pathogen

Candida albicans is a diploid microorganism belonging to genus *Candida* of ascomycetous-like fungal species which has no known teleomorph [1]. *Candida albicans* is an ubiquitous human commensal yeast which resides mainly on mucosal surfaces of the oral cavity as well as in the urogenital, gastrointestinal and vaginal tracts and some cutaneous areas of healthy individuals without symptoms of disease [5, 53]. The latter strain in commensal form can be detected in approximately 50% of the human population [75]. Furthermore, in all body locations, *C. albicans* represented the predominant *Candida* species (70%). On the other hand, results of previous

studies established association between fungal colonisation and candidaemia, and furthermore the rate of progression from colonisation to invasive infection ranges from 15 to 40% [79]. *Candida albicans* is considered to be a major causative factor of opportunistic human infections (invasive candidiasis) with high morbidity and mortality rate of 30 to 70% [5, 9–11, 13–15, 53, 96].

The status of the host immune system is the major factor balancing the transition of *C. albicans* from a commensal to a pathogen [84]. Much has been done to elucidate the host defence mechanisms against systemic candidiasis [30, 37, 68]. Moreover, many of the previous studies showed that *C. albicans* aspartic proteinases are immunogenic and elicit mucosal and systemic antibody responses [7, 44, 53, 55, 92, 99]. Recently, it was reviewed [37] that transition from healthy to pathogenic

* Corresponding author. Independent Laboratory of Streptomyces and Fungi Imperfecti, National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene, 24 Chocimska, 00-791 Warsaw; phone: +48 22 54 21 228; fax: + 48 22 849 74 84; e-mail: mstaniszewska@pzh.gov.pl

state occurs at the mucosal-fungal interface. Mucosal immune mechanisms are vital to prevent the systemic spread of pathogens from localized infection. The innate and adaptive arms of the immune response play key role in immunity to *Candida*. Several studies have demonstrated that innate immunity in mucosal infection involves many cell types: neutrophils, monocytes/macrophages, Natural Killer (NK) cells, dendritic cells (DC), CD4⁺ and CD8⁺ T cells, non-MHC restricted T cells such as $\gamma\delta$ -T cells, mucosal epithelial cells, stromal cells and keratinocytes [30, 37, 68]. In the case of systemic infection, the release of interferon- γ (INF- γ) and lymphotoxin- α (LTA) from Th1 cells is responsible for activation of the antifungal properties of neutrophils and macrophages in the deep tissues. Investigation in mice and humans has provided evidence for a protective role of the Th17 pathway in anti-fungal immunity at mucosal and epithelial surfaces, particularly the oral cavity and skin. During infection of mucosa, the release of IL-17 and IL-22 from specific Th17 lymphocytes recruits and activates neutrophils for the elimination of infection [37, 49, 50, 52]. Moreover, commensal flora in the oral, gastrointestinal and vaginal tracts plays a vital role in limiting infections [46]. *Candida albicans* has three major mechanisms of its own that mediate pathogenicity and invasiveness: (I) escape from host immune responses, (II) morphogenic change from the yeast to the hyphal form, which increases adherence and ability to invade host cells, and (III) host cell invasion, which is supported by factors associated with hyphae including adhesion molecules, invasion-like molecules, and secreted hydrolytic enzymes [53].

The incidence of *Candida* endogenous infections appeared to be due to several predisposing factors such as immunosuppressant or steroids treatments, long-term catheterization, abdominal surgery, treatment with broad-spectrum antibiotics, perforation of the gastrointestinal tract, destruction of the skin by deep burns, hyperalimentation, mechanical ventilation, renal failure, bone marrow transplant, premature very low birth weight infants, critically ill neonates, diabetes mellitus, Crohn's disease, immunologically comprised individuals, spread of HIV infections [16–19, 21, 23, 45, 79, 83]. However, rare cases of exogenous acquisition have also been reported, they occurred due to contaminated solutions and material (catheter-related), also via healthcare-associated cross-transmission of *C. albicans* [6, 71].

1.2. Candidiasis

Candidiasis may be classified as superficially-localized or a systemic [5, 20, 22, 24, 25, 27]. The surface-localized, mucocutaneous candidiasis can affect epidermal and mucosal surface including oral cavity, pharynx, esophagus, intestines, urinary bladder and vagina. It

occurs in the form of oropharyngeal candidiasis (OPC), cutaneous candidiasis (CC), esophageal candidiasis and vulvovaginal candidiasis (VVC) [26]. Increased risk of OPC is seen either in smokers of tobacco products or in patients with the following disorders: xerostomia, Sjögren's syndrome (SjS), cancer therapy followed by local mucosal injury, hyposalivation as well as in patients with local or systemic steroid and antibiotic treatments [8]. Furthermore, OPC is one of the first clinical signs of HIV infection, and is diagnosed in up to 95% of HIV+ patients [37]. The main described clinical forms of OPC are pseudomembranous (so-called thrush), erythematous, and angular cheilitis [8]. A chronic mucocutaneous candidiasis (CMC) is characterized by chronic or recurring infection of the skin, nails, oropharyngeal and esophageal involvement without the tendency for systemic dissemination and with increased frequency of endocrinopathy [5]. The CC has a number of predispositions, such as warmth, moisture and immunosuppression [26]. *Candida albicans* is responsible in over 85% for vulvovaginal candidiasis cases [28]. Fungal infection are very frequent in women, in fact, vulvovaginal candidiasis (VVC) affected up to 75% of all women [52]. Moreover, about 5–10% of women developed recurrent form – RVVC [5, 31–34]. Unlike systemic candidiasis, characterized by the presence of *Candida* in normally sterile sites locations in the body, VVC and RVVC affect vaginal tissue, where *C. albicans* is a natural commensal [5]. The systemic, invasive *C. albicans* infection (ICI) can affect organs causing pneumonia, endocarditis, myocarditis, pericarditis, meningitis, endophthalmitis, arthritis, osteomyelitis [35, 36]. *Candida albicans* is the most frequent causative factor of 50–70% of all invasive infections [38].

Although the incidence of candidaemia in Europe (0.5 episodes per 10,000 patient days) is lower than in the United States (2 episodes per 10,000 patient days), the incidence in Europe has recently increased [36]. The recent study by Schelenz [93] on surveillance conducted in hospitals in the United Kingdom showed that *C. albicans* remains the most common species causing candidaemia in Intensive Care Unit patients. Furthermore, study of Zoutis [100] and Nguyen et al. [79] conducted in neonatal intensive care unit in the United States and France respectively showed that *C. albicans* was the most frequent species responsible for invasive candidiasis infection in neonatal patient group. According to Schofield et al. [95], Morrison et al. [73], Bialková and Šubík [9], Schelenz [93], *C. albicans* was responsible for 59% of nosocomial candidaemia and for 55% of bloodstream infections. Enoch et al. [47] noted that *C. albicans* was responsible for 79.4% of candidaemias in intensive-care patients, but only for 37.5% in haematology patients. The contribution of *C. albicans* in invasive and disseminated

candidiasis appears highly similar in United States and Europe and accounts from 49 to 55% [36]. According to Kullberg and Filler [65] among the risk factors that predispose to candidaemia and disseminated candidiasis are: cancer (26%), abdominal surgery (14%), diabetes mellitus (13%) or human immunodeficiency virus (10%).

In the light of the above-mentioned literature data systemic mycoses of *C. albicans* etiology constitute a serious clinical problem world-wide. The high frequency of occurrence of these infections as well as the high mortality of patients with immunosuppression cause a tendency toward better understanding of *C. albicans* virulence factors and developing sensitive and specific diagnostic methods and appropriate strategies for candidiasis treatment.

Candida albicans strains represent an important clinical problem as they from this species possess more virulence factors than non-*Candida albicans* strains [5, 28, 39, 41]. Virulence factors identified so far include such phenomena as morphogenetic transition from yeast to pseudo- and true hyphae, adhesion to inert and biological substrates, production and secretion of hydrolytic enzymes, biofilm formation, antigenic variability and phenotype switching [1, 5, 13, 27, 43, 47, 48]. This review focuses on characteristic and function of the members of aspartyl proteinase, which have been studied in more detail, and are key virulence factors in *C. albicans* pathogenesis.

2. Extracellular enzymes and *C. albicans* virulence

Candida albicans is a producer of extracellular hydrolytic enzymes [9]. The hydrolytic enzymes produced by *C. albicans* in addition to the simple role of digesting molecules for nutrient acquisition, fulfil a number of functions [2]. It is generally considered that some of hydrolytic enzymes, such as *beta*-N-acetylhexosaminidase (HexNAcase), formerly known as N-acetyl-*beta*-D-galactosaminidase (NAGase), acid phosphatase and *beta*-D-glucosidase contribute specifically to the differentiation of *C. albicans* yeast strains [59, 60]. Niimi *et al.* [80] reported the HexNAcase enzyme to be a virulence factor for *C. albicans* since the HexNAcase-deficient mutant (EOB4) of the ATCC 10261 strain was less pathogenic than the parental wild type strain in a mouse infection model. Hube and Naglik [58] reported that production of hydrolases contributes to colonization of host surfaces, enhances adhesion by degrading host surface molecules, and allows penetration into deeper host tissues by digesting host cell membranes or evasion of host defence mechanism by digesting cells and molecules of the host immune system. The three most significant extracellular hydrolytic enzymes pro-

duced by *C. albicans* i.e., the phospholipases, lipases and secreted aspartyl proteinases (Saps) are linked to virulence [12, 58]. Phospholipases are important pathogenicity determinants in *C. albicans*. They play a significant role in damaging cell membranes by destroying phospholipids in host cells, therefore inducing cell lysis and facilitating tissue invasion [3, 12]. There are four types of secreted phospholipases: A, B, C and D [27]. Among them phospholipase B contributes to the pathogenicity of *C. albicans* by abetting the fungus in damaging and traversing host cell membranes [12]. Lipases are enzymes that catalyze both the hydrolysis and synthesis of triacylglycerols [51]. *Candida albicans* can produce at least nine lipases which can hydrolyze ester bonds of mono-, di-, and triacylglycerols [92]. Moreover, secreted lipases may play role in the adhesion and penetration steps of infection process in murine model of haematogenously disseminated candidiasis [29, 51]. Based on observations made by Kitano *et al.* [62], esterase activity (hydrolysis of ester bounds of triacylglycerols) is a common feature of *C. albicans* strains isolated from clinical specimens. The ability to secrete hydrolytic enzymes that destroy barriers to enable growth and break polymers to provide nutrients as well as inactivate the host defense molecules is considered as one of the virulence factors of *C. albicans* [54]. Among hydrolytic enzymes of *Candida* spp., aspartyl proteinases are by far the most commonly associated with virulence [75].

3. *Candida albicans* aspartic proteinases

Candida albicans secreted aspartic proteinases (Saps) represent a family of 10 related proteinases [57, 76] which catalyze the hydrolysis of peptide bonds (CO-NH) in proteins [35, 62, 69, 75, 99]. Ten SAP genes are located on five different chromosomes [43]. Naglik *et al.* [114] noted that within Sap isoenzyme family distinct groups based of sequence homology are clustered: Sap1 to Sap3 are up to 67% identical, and Sap4 to Sap6 are up to 89% identical, while Sap7 is only 20 to 27% identical to other Sap proteins, which makes it the most diverged member of family. It seems apparent from the previous studies [58, 75, 92] that Sap1-Sap8 proteins are secreted extracellularly, whereas Sap9 and Sap10 remain anchored in the fungal membrane. The proteases Sap9 and Sap10 are bound to the fungal cell surface by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor motif. Of these, Sap9 seems to be predominantly located in the cell membrane, and Sap10 is located in the cell wall and membrane [4]. Many of the early proteinase studies focused on the detection of Sap antigens inside the morphologies of *C. albicans* using polyclonal antibodies [35, 73, 97]. Accordingly, reports using

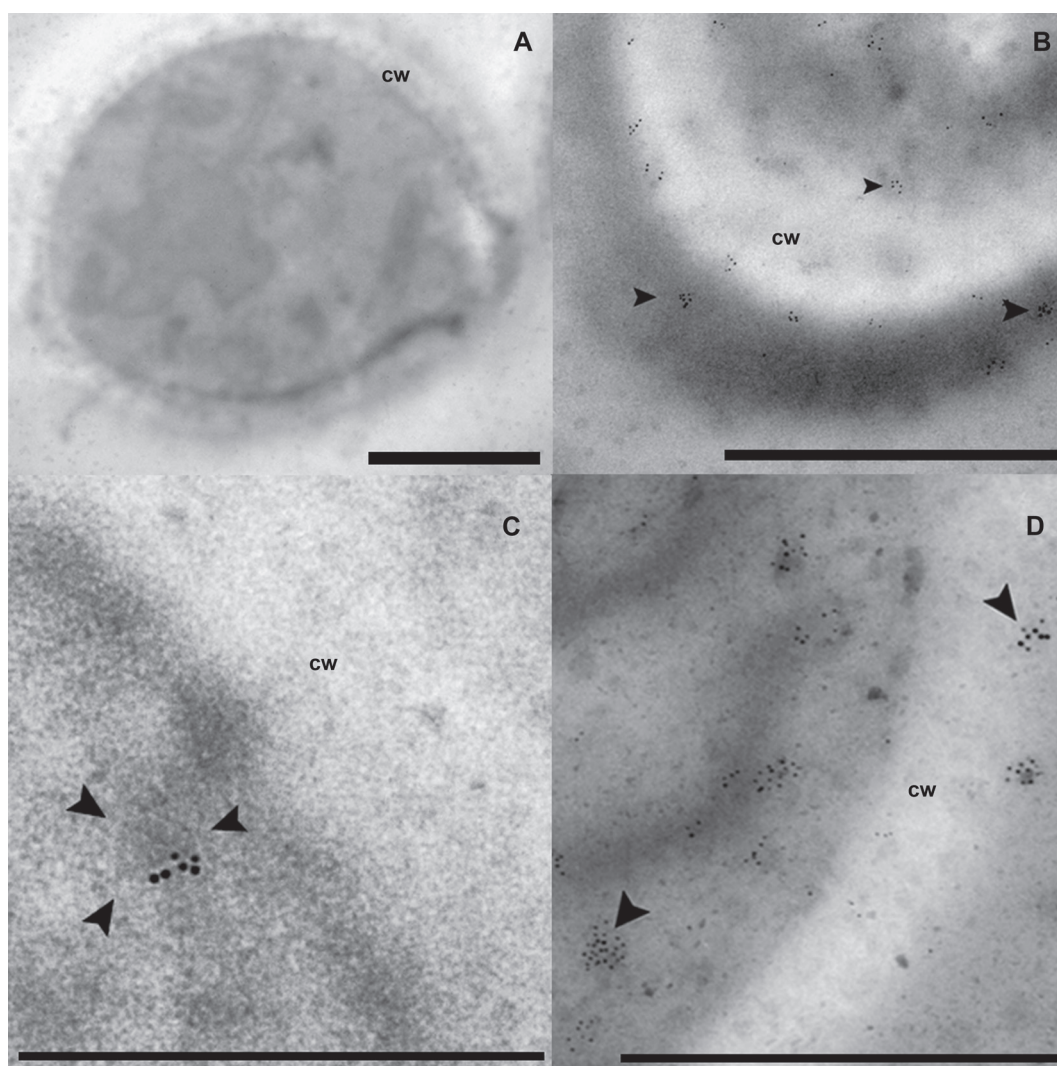


Fig. 1. Immunoelectron microscopy (IEM). Detection of Sap3 in pleomorphic cells of *Candida albicans* clinical strain using polyclonal rabbit anti-Sap3 serum and goat-anti-rabbit IgG conjugated to 5 nm gold particles. (A–D) Cells cultivated in Sap-inductive undiluted human serum for 18 h. (A) Control without anti-Sap3 antibody. No evidence of gold particles in control cells is seen. (B) Separate gold particles and clusters of them are visible in the cytoplasm (arrows) and in the cell wall (cw). (C) Note the vesicle packed with gold clusters in the cytoplasm (arrows). (D) Note the cytoplasm- and cell wall-located clusters of the enzyme marker (arrows). Bars = 1 μ m

immunogold-labelling techniques revealed that Sap proteins are localized inside the cell wall of yeast and hyphal cells of *C. albicans* [86–88, 97]. Moreover, Stringaro et al. [97] demonstrated that in rats with developed vaginitis the ultrastructural localization of Sap is observed only within the cell wall of hyphal cells. Similar results were observed in the *in vitro* model of experimental oral candidiasis [86] and reconstituted human epidermis (RHE model) [88]. In our study (unpublished data), immunogold labeling showed that in pleomorphic forms Sap1–6 localize mainly in the cell wall and in the cytoplasm. The cytoplasm-located clusters of the enzyme marker surrounded by a membrane-like structure were observed (Fig. 1). For more information on processing cultivation and regulation of Sap, the reader is guided to reference by Naglik et al. [75].

Many authors [35, 42, 58, 62, 69, 72, 73, 75, 76, 82, 88, 91, 92, 99] pointed out that Sap production is associated with a number of *C. albicans* virulence features, including hyphae formation, adhesion and phenotypic switching. These findings are supported by the fact that *C. albicans* SAP genes appear to have no equivalents in less pathogenic yeast species – *Saccharomyces cerevisiae* [69]. Furthermore, the proteinases appear to have adapted their biochemical properties to fulfil a number of specialized functions during the infection process, e.g., digestion of host cell membranes and molecules of the host immune system to avoid antimicrobial attack by the host [56, 75, 76, 98]. For example, a more recent study by Groppe et al. [53] found that the Sap proteinases degrade and inactivate the central human complement components C3b, C4b as well as

Table I

Expression of secreted aspartyl proteinases in human and in animal models

Model	Infection	Secreted aspartyl proteinases	Assay	Main findings	References
Murine and guinea pig	Systemic infection	SAP4-6	Southern blotting, survival curves	SAP4, SAP5 and SAP6 expression was observed during progression of systemic infection by <i>C. albicans</i> in animals	[43]
Murine and guinea pig	Disseminated infection	SAP1-3	Southern blotting, hybridization autoradiography	SAP1, SAP2 and SAP3 were detected during <i>C. albicans</i> disseminated infections	[20]
Rat	Infected rat vagina	Sap	Immunoelectron microscopy, SDS-PAGE with antirabbit IgG or antimouse IgG-peroxidase conjugated	Sap secreted by <i>C. albicans</i> during rat vaginitis; Sap localized in the cell wall of hyphal forms during infection	[53]
Human	Sera	Sap	Western blot with monoclonal antibody (MAb)	Detection of Sap antigen in the sera of patients with invasive candidiasis	[7]
Human	Oral candidiasis	SAP1-7	RT-PCR	SAP1-3 transcripts were observed in patients with oral candidiasis	[34]
Human	Oropharyngeal candidiasis	Sap1-3	Immunoelectron microscopy with murine monoclonal antibody	The expression of Sap1-3 does not confirm a pathogenetic role of the Sap1-3 in host-fungal interaction	[46]
Human	Oral and cutaneous candidiasis	Sap1-3 or Sap4-6	Immunoelectron microscopy	Sap1-3 crucial for mucosal and cutaneous candidiasis	[47]
Mice	Gastrointestinal infection	SAP1-6	RT-PCR, IVET	Expression of SAP4-6 was detected in higher percentage than SAP1-3; individual Saps are not indispensable factors for virulence	[25]
Mice	Disseminated candidiasis	SAP4-6	RT-PCR; immunoelectron microscopy	Hyphal morphologies without expression of SAP6 are less virulent; Sap1-3 antigens were found on yeast and hyphal cells, Sap4-6 were predominantly found on hyphal cells in close contact with host cells	[15]
Human	Vaginal candidiasis	SAP1-10	RT-PCR	SAP5 and SAP2 transcript were expressed in <i>C. albicans</i> cells infecting human epithelia <i>in vivo</i>	[48]
Mice	Keratitis infection model	SAP4-6	Southern blot analysis	SAP6 appears to be associated with morphogenetic transformation of yeast to invasive filamentous forms, SAP6 contributes to corneal pathogenicity,	[23]
Human	Oral candidiasis	SAP1-6	qRT-PCR	SAP5 and SAP9 are the most highly expressed proteinase genes <i>in vivo</i>	[37]
Mice	Disseminated infections	SAP1-6	qRT-PCR	Expression of SAP1-6 was low in murine model of haematogenously disseminated candidiasis	[11]

C5 and block the damaging effects of the activated complement system.

Numerous studies (see the following section) have correlated the SAP expression and morphogenesis process under hyphae inducing conditions. SAP genes were shown to be expressed differentially according to the morphological form of the fungus and the surrounding environment supporting transition [74]. Nantel et al. [78] showed that the serum favoured hyphae formation and expression of Sap4-6. In contrast, Hube and Naglik [58] reported that hyphae induction alone is sufficient for Sap expression and that the protein components of the serum are not necessary. On the contrary, early study of Brown and Gow [21] demonstrated

that Sap6 is expressed when hyphae growth is stimulated using polypeptide-containing culture media. To address this, two reports [35, 38] showed that hyphae formation was induced in modified Lee's medium after 18 h and under the same growth condition expression of Sap4-6 was detected. Finally, it was clearly established [35, 66, 75, 76, 91, 92] that yeast cells predominantly produce Sap1-3, while hyphae produce mainly Sap4-6. Supporting these data, more recent report by dos Santos [43] noted that the expression of SAP1-SAP3 and SAP8-SAP10 is detected in yeast cells, while the expression of SAP4-SAP6 is associated with the filamentous forms. However, Naglik et al. [77] concluded that although Sap5 may play an indirect role in facilitating

hyphal invasion, but SAP5 expression can be hypha-independent during oral and vaginal (RHE) infection. Yet, detailed information on Sap expression in different pleomorphic forms of *C. albicans* is still lacking.

Research efforts by many investigators in different laboratory have concentrated on the correlation study between Sap production *in vitro* and the virulence of *C. albicans* [4, 13, 40, 56, 58, 61, 63, 64, 67, 76, 81, 83, 85–91]. The first observation of extracellular proteinase involvement in *C. albicans* attachment to oral mucosa was presented by Borg and Rühle [13]. To address this, Sap production by *C. albicans* was demonstrated by Schaller et al. [85, 86, 88, 91]. Although the gene expression pattern of the vaginal RHE model was different from that in the oral RHE model, it was clearly suggested that Sap1 to Sap3 are the main proteinases contributing to the early stages of mucocutaneous infections. Moreover, Schaller et al. [87] also analyzed SAP expression in the *in vitro* model of cutaneous candidiasis based on reconstituted human epidermis. This analysis was undertaken to confirm the SAP1-3 predominant expression in this type of infection. Two recent reports have correlated proteolytic activity of Saps *in vitro* with the virulence of *C. albicans* species [67, 77]. The latter authors studied the role of Sap isoenzymes in *C. albicans* pathogenesis by comparing virulence of mutants with one or multiple SAP genes disturbed to wild-type control strain. As a result, using RHE models of oral and mucosal infections in human, it was founded that only Sap5 is potentially contributed to *C. albicans* virulence. Moreover, Naglik et al. [77] indicated that SAP9 is consistently the most highly expressed proteinase gene in monolayers and RHE models. According to the same group [77] SAP5 is the only gene significantly upregulated as infection progressed in oral and vaginal RHE models. This study [77], therefore allows to conclude that both genes (SAP5 and SAP9) do not influence fungus morphology. Finally, the latter studies abolished earlier findings that Sap1-3 subfamily is required for invasion of human epithelia as previously concluded [64, 74–76, 85–89, 91]. For example, Naglik et al. [77] indicated that the overall individual contribution of Sap1-3 and Sap4-6 subfamilies in inducing epithelial damage in the RHE model appears to be low. On the other hand, studies [40] using fungal mutants as well as set of fungal and host cells inhibitors demonstrated that proteases Sap1-6 support invasion into oral or intestinal epithelial cells. Finally, one should be noted that all of the above discrepancies in the results presented by many authors may be related either to differences in the sensitivity of methods used, or differences in infection models and stage of the epithelial cells, as well as variability among *C. albicans* strains [40, 67]. In fact, there are no directly comparable studies by different authors using the same technique, model, or site of infection (Table I).

4. Summary

In this review the of involvement secreted aspartic proteinase (Sap) members' in the pathogenesis of *C. albicans* infections, risk factors for candidiasis, as well as the incidences of candidiasis. The proteolytic activity of secreted aspartyl proteinases has been extensively studied in the last years [13, 24, 35, 57, 63, 75, 86–88, 90]. Aspartic proteinases are considered most significant extracellular hydrolytic enzymes as they are the key virulence factor in *C. albicans* pathogenesis. Saps have a number of specialized functions during infection e.g.: their proteolytic activity has been associated with tissue invasion as they degrade host proteins at mucosal sites; also Sap isoenzymes degrade and inactivate the central human complement components [3, 4, 53, 75, 76]. The Sap isoenzymes' role in *C. albicans* virulence has been supported by the fact that Sap production is associated with a number of other virulence factors such as adhesion, hyphal formation, pleomorphism, phenotypic switching [70]. At present, the roles and functions of the Saps during the infective process in humans are not clear and thus future functional studies have to be conducted.

Acknowledgement

This work was supported by the NN 404 113639 grant from the Ministry of Science and Higher Education in Poland.

References

1. Abad-Zapatero C., Goldman R., Muchmore S. W., Hutchins C., Stewart K., Navaza J., Payne C.D., Ray T.: Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: implications for the design of antifungal agents. *Protein Sci.* **5**, 640–65 (1996)
2. Abegg M.A., Lucietto R., Alabarse P.V.G., Mendes M.F.A., Benfato M.S.: Differential Resistance to Oxidants and Production of Hydrolytic Enzymes in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, **171**, 35–41 (2011)
3. Akçağlar S., Ener B., Töre O.: Acid proteinase enzyme activity in *Candida albicans* strains: a comparison of spectrophotometry and plate methods. *Turk. J. Biol.* **35**, 559–567 (2011)
4. Albrecht A., Felk A., Pichova I., Naglik J.R., Schaller M., de Groot P., MacCallum D., Odds F.C., Schafer W., Klis F., Monod M., Hube B.: Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J. Biol. Chem.* **281**, 688–694 (2006)
5. Barnett, J.A.: A history of research on yeasts 12: medical yeasts part I, *Candida albicans*. *Yeast*, **25**, 385–417 (2008)
6. Bassetti M., Mikulska M., Viscoli C.: Bench-to-bedside review: Therapeutic management of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit. Care*, **14**, 244 doi:10.1186/cc9239 (2010)
7. Beauséjour A., Grenier D., Goulet J.P., Deslauriers N.: Proteolytic Activation of the Interleukin-1 β Precursor by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **66**, 676–681 (1998)
8. Bensadoun R.J., Patton L.L., Lalla R.V., Epstein J.B.: Oropharyngeal candidiasis in head neck cancer patients treated with radiation: update 2011. *Support Care Cancer*, **19**, 737–744 (2011)

9. Bialková A., Šubík J.: Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Folia Microbiol.* **51**, 3–20 (2006)
10. Białasiewicz D., Kurnatowska A.J.: Aktywność wybranych enzymów hydrolitycznych *Candida albicans* – szczepów wyizolowanych z ontocenozy jamy ustnej. *Mikol. Lek.* **3**, 249–252 (1996)
11. Biswas S.K., Yokoyama K., Nishimura K., Miyaji M.: Effect of pH, carbon source and K⁺ on the Na⁺-inhibited germ tube formation of *Candida albicans*. *ISHAM Med. Mycol.* **38**, 363–369 (2000)
12. Biswas S., Van Dijck P., Datta A.: Environmental Sensing and Signal Transduction Pathways Regulating Morphopathogenic Determinants of *Candida albicans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 348–376 (2007)
13. Borg M., Rüchel R.: Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect. Immun.* **56**, 626–631 (1988)
14. Borges-Walmsley M., Walmsley A.R.: cAMP signaling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol.* **8**, 133–141 (2000)
15. Borman A.M., Linton Ch. J., Miles S.J., Johnson E.M.: Molecular identification of pathogenic fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, i7–i12 (2008)
16. Borst A., Theelen B., Reinders E., Boekhout T., Fluit A.C., Savelkoul P.H.M.: Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1357–1362 (2003).
17. Bouchara J.P., Tronchin G., Annaix V., Robert R., Senet J-M.: Laminin receptors on *Candida albicans* germ tube. *Infect. Immun.* **58**, 48–54 (1990)
18. Brassart D., Woltz A., Golliard M., Neeser J-R.: *In vitro* inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuca1→2Galβ-bearing complex carbohydrates. *Immun. Infect.* **59**, 1605–1613 (1991)
19. Brawner D.L., Smith F.O., Mori M., Nonoyama S.: Adherence of *Candida albicans* to tissue from mice with genetic immunodeficiency. *Infect. Immun.* **59**, 3069–3078 (1991)
20. Brown A.J.P.: Expression of growth form-specific factor during morphogenesis in *Candida albicans*. In: Calderone R.A. (ed) *Candida and candidiasis*. Washington: ASM Press. 2002, pp. 87–93
21. Brown A.J.P., Gow N.A.R.: Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* **7**, 333–338 (1999)
22. Bruno V.M., Mitchell A.P.: Large-scale gene function analysis in *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **12**, 157–161 (2004)
23. Bulik C.C., Sobel J.D., Nailor M.D.: Susceptibility profile of vaginal isolates of *Candida albicans* prior to and following fluconazole introduction – impact of two decades. *Mycoses*, **1**, 1–5 (2009)
24. Byoung-Kuk N., Gyung-Tae Ch., Chul-Young S.: Production, characterization, and epitope mapping of a monoclonal antibody against aspartic proteinase of *Candida albicans*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**, 429–433 (1999)
25. Cagnacci S., Grasso R., Marchese A., Corvò R., Debbia E., Rossi L.: The susceptibility of *Candida albicans* to gamma-radiations and ketoconazole depends on transitional filamentation. *Open. Microbiol. J.* **2**, 66–73 (2008)
26. Calderone R.A.: Taxonomy and Biology of *Candida*. In: Calderone, R.A. (ed) *Candida and candidiasis*. Washington: ASM Press. 2002a, pp. 15–27.
27. Calderone R.A., Fonzi W. A.: Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**, 327–334 (2001)
28. Calderone R.A., Gow N.A.R.: Host recognition by *Candida* species. In: Calderone R.A. (ed) *Candida and candidiasis*. Washington: ASM Press. 2002, pp. 67–86.
29. Cannom R.R., French S.W., Johnston D., Edwards Jr. J.E., Filler S.G.: *Candida albicans* stimulates local expression of leukocyte adhesion molecules and cytokines *in vivo*. *J. Infect. Dis.* **186**, 389–396 (2002)
30. Carvalho A.P., Gursky L.C., Rosa R.T., Rymowicz A.U.M., Campelo P.M.S., Grégio A.M.T., Koga-Ito C.Y., Samaranayake L.P., Rosa E.A.R.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs may modulate the protease activity of *Candida albicans*. *Microb. Pathog.* **49**, 315–322 (2010)
31. Cárdenes C.D., Carrillo A.J., Arias A., Rodríguez-Alvarez C., Torres-Lana A., Sierra A., Arévalo M.P.: Comparison of *albicans* ID2[®] agar plate with germ-tube for presumptive identification of *Candida albicans*. *Diagn. Micr. Infect. Dis.* **42**, 181–185 (2002)
32. Cárdenes C.D., Carrillo-Muñoz A.J., Arias A., Rodríguez-Alvarez C., Torres-Lana A., Sierra A., Arévalo M.P.: Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. *J. Microbiol. Meth.* **59**, 293–297 (2004)
33. Cervera A.M., Gozalbo D., McCreath K.J., Gow N.A.R., Martínez J.P., Casanova M.: Molecular cloning and characterization of a *Candida albicans* gene coding for cytochrome c haem lyase and a cell wall-related protein. *Mol. Microbiol.* **30**, 67–81 (2002)
34. Chauhan N., Li D., Singh P., Calderone R., Kruppa M.: The cell wall of *Candida* spp. In: Calderone R.A. (ed) *Candida and candidiasis*. Washington: ASM Press. 2002, pp. 159–175.
35. Chen Y. C., Wu C.C., Chung W.L., Lee F.J.S.: Differential secretion of Sap4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. *Microbiol.* **148**, 3743–3754 (2002)
36. Cho T., Aoyama T., Toyoda M., Nakayama H., Chibana H., Kaminishi H.: Transcriptional changes in *Candida albicans* genes by both farnesol and high cell density at an early stages of morphogenesis in *N*-acetyl-*D*-glucosamine medium. *Jpn. J. Med. Mycol.* **48**, 159–167 (2007)
37. Conti H.R., Gaffen S.L.: Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells mucosal candidiasis. *Microb. Infect.* **12**, 518–527 (2010)
38. Copping V.M.S., Barelle C.J., Hube B., Gow N.A.R., Brown A.J.P., Odds F.: Exposure of *Candida albicans* to antifungal agents affects expression of SAP2 and SAP9 secreted proteinase genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**, 645–654 (2005)
39. Cullen P.J. and Sprague G.F.: Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13619–13624 (2000)
40. Dalle F., Wächtler B., L'Ollivier C., Holland G., Bannert N., Wilson D., Labruère C., Bonnin A., Hube B.: Cellular interactions of *Candida albicans* with human epithelial cells and enterocytes. *Cell. Microbiol.* **12**, 248–271 (2010)
41. De Bernardis F., Adriani D., Lorenzini R., Pontieri E., Caruba G., Cassone A.: Filamentous growth and elevated vaginopathic potential of a nongerminative variant of *Candida albicans* expressing low virulence in systemic infection. *Infect. Immun.* **61**, 1500–1508 (1993)
42. De Bernardis F., Boccanera M., Adriani D., Spreghini E., Santoni G., Cassone A.: Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect. Immun.* **65**, 3399–3405 (1997)
43. dos Santos A.L.S.: HIV aspartyl proteinase inhibitors as promising compounds against *Candida albicans*. *World. J. Biol. Chem.* **1**, 21–30 (2010)
44. Dwivedi P., Thompson A., Xie Z., Kashleva H., Ganguly S., Mitchell A., Dongari-Bagtzoglou A.: Role of Bcr1-Activated Genes Hwp1 and Hyr1 in *Candida Albicans* Oral Mucosal Biofilms and Neutrophil Evasion. *PLoS ONE*, **6**, e16218 (2011)

45. Eggimann P, Bille J, Marchetti O.: Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU. *Ann. Intensive Care*, **1**, 37 doi:10.1186/2110-5820-1-37 (2011)
46. Ehrström S., Daroczy K., Rylander E., Samuelsson C., Johansson U., Anzén B., Pålsson C.: Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Microb. Infect.* **12**, 691–699 (2010)
47. Enoch D.A., Ludlam H.A., Brown N.: Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J. Med. Microbiol.* **55**, 809–818 (2006)
48. Fekete A., Ermi T., Gyetvai A., Gazdag Z., Pesti M., Varga Z., Balla J., Cserhádi C., Emödy L., Gergely L., Pócsi I.: Development of oxidative stress tolerance resulted in reduced ability to undergo morphologic transitions and decreased pathogenicity in a *t*-butylhydroperoxide-tolerant mutant of *Candida albicans*. *FEMS Yeast. Res.* **7**, 834–847 (2007)
49. Ferwerda G., Netea M.G., Joosten L.A., van der Meer J.W.M., Romain L., Kullberg B.J.: The role of Toll-like receptors and C-type lectins for vaccination against *Candida albicans*. *Vaccine*, **28**, 614–622
50. Gaffen S.L., Hernández-Santos N., Peterson A.C.: IL-17 signaling in host defense against *Candida albicans*. *Immunol. Res.* **50**, 181–187 (2011)
51. Gácsér A., Stehr F., Kröger K., Kredics L., Schäfer W., Nosan-chuck J.D.: Lipase 8 Affects the Pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **75**, 4710–4718 (2007)
52. Giraldo E., Martin-Cordero L., Hinchado M.D., Garcia J.J., Ortega E.: Role of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), extracellular signal-regulated kinase (ERK) and nuclear transcription factor kappa β (NF- κ B) on neutrophil phagocytic process of *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biochem.* **333**, 115–120 (2010)
53. Gropp K., Schild L., Schindler S., Hube B., Zipfel P.F., Skerka C.: The yeast *Candida albicans* evades human complement attack by secretion of aspartic proteases. *Mol. Immun.* **47**, 465–475 (2009)
54. Haynes K.: Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* **9**, 591–596 (2001)
55. Hornbach A., Heyken A., Schild L., Hube B., Löffler J., Kurzai O.: The Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protease Sap9 Modulates the Interaction of *Candida albicans* with Human Neutrophils. *Infect. Immun.* **77**, 5216–5224 (2009)
56. Hube B., Hess D., Baker C.A., Schaller M., Schäfer, Dolan J.W. The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. *Microbiol.* **147**, 879–889 (2001)
57. Hube B., Naglik J.: *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of the gene family. *Microbiol.* **147**, 1997–2005 (2001)
58. Hube B., Naglik J.: Extracellular hydrolases. In: Calderone R.A. (ed) *Candida and candidiasis*. Washington: ASM Press. 2002, pp. 107–122.
59. Jacobsen M.D., Boekhout T, Odds F.C.: Multilocus sequence typing confirms synonymy but highlights differences between *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*. *FEMS Yeast. Res.* **8**, 764–770 (2008)
60. Kanbe T., Kurimoto K., Hattori H., Iwata T., Kikuchi A.: Rapid identification of *Candida albicans* and its related species *Candida stellatoidea* and *Candida dubliniensis* by a single PCR amplification using primers specific for the repetitive sequence (RPS) of *Candida albicans*. *J. Dermatol. Sci.* **40**, 43–50 (2005)
61. Kantarcioğlu A.S., Yücel A.: Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, **45**, 160–165 (2002)
62. Kitanovic A., Nguyen M., Vogl G., Hartmann A., Günther J., Würzner R., Künkel W., Wölfl S., Eck R.: Phosphatidylinositol 3-kinase VPS34 of *Candida albicans* is involved in filamentous growth, secretion of aspartic proteases, and intracellular detoxification. *FEMS Yeast Res.* **5**, 431–439 (2005)
63. Korting H.C., Patzak U., Schaller M., Maibach H.I.: A model of human cutaneous candidosis based on reconstructed human epidermis for the light and electron microscopic study of pathogenesis and treatment. *J. Inf. Sci.* **36**, 259–267 (1998)
64. Korting H.C., Hube B., Oberbauer S., Januschke E., Hamm G., Albrecht A., Borelli C., Schaller M.: Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes SAP1 and SAP3 in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium. *J. Med. Microbiol.* **52**, 623–632 (2003)
65. Kullberg B.J., Filler S.G.: Candidemia. In: Calderone R.A. (ed) *Candida and candidiasis*. Washington: ASM Press. 2002, pp. 327–340
66. Lee S.A., Jones J., Hardison S., Kot J., Khalique Z., Bernardo S.M., Lazzell A., Monteagudo C., Lopez-Ribot J.: *Candida albicans* VPS4 is Required for Secretion of Aspartyl Proteases and In Vivo Virulence. *Mycopathologia*, **167**, 55–63 (2009)
67. Lermann U., Morschhäuser J.: Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. *Microbiol.* **154**, 3281–3295 (2008)
68. Liu Y., Yang B., Zhou M., Li L., Zhou H., Zhang J., Chen H., Wu C.: Memory IL-22-producing CD4⁺ T cells specific for *Candida albicans* are present in humans. *Eur. J. Immunol.* **39**, 1472–1479 (2009)
69. López-Ribot J.L., Casanova M., Monteagudo C., Sepúlveda P., Martínez J.P.: Evidence for the presence of high-affinity laminin receptor-like molecule on the surface of *Candida albicans* yeast cells. *Infect. Immune.* **62**, 742–746 (2004)
70. Mardegan R.C., Foglio M.A., Gonçalves R.B., Höfling J.F.: *Candida albicans* proteinases. *Braz. J. Oral. Sci.* **5**, 944–952 (2006)
71. Miranda L.N., van der Heiden I.M., Costa S.F., Sousa A.P.I., Sienna R.A., Gobara S., Santos C.R., Lobo R.D., Pessoa Jr. V.P.: *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J. Hosp. Infect.* **72**, 9–16 (2009)
72. Monod M., Borg-von Zepelin M.: Secreted Aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. *Biol. Chem.* **383**, 1087–1093 (2002)
73. Morrison C.J., Hurst S.F., Reiss E.: Competitive binding enzyme-linked immunosorbent assay that uses the secreted aspartyl proteinase of *Candida albicans* as an antigenic marker for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 835–848 (2003)
74. Naglik J.R., Newport G., White T.C., Fernandes-Naglik L., Greenspan J.S., Greenspan D., Sweet S.P., Challacombe S.J., Agabian N.: In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect. Immun.* **67**, 2482–2490 (1999)
75. Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B.: *Candida albicans* secreted aspartyl proteases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 400–428 (2003)
76. Naglik J., Albrecht A., Bader O., Hube B.: *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **6**, 915–926 (2004)
77. Naglik J.R., Moyes D., Makwana J., Kanzaria P., Tsihlaki E., Weindl G., Tappuni A.R., Rodgers C.A., Woodman A.J., Challacombe S.J., Schaller M., Hube B.: Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiol.* **154**, 3266–3280 (2008)
78. Nantel A., Dignard D., Bachewich C., Hargus D., Marciel A., Bouin A.-P., Sensen Ch. W., Hogues H., van het Hoog M., Gordon P., Rigby T., Benoit F., Tessier D.C., Thomas D.Y., Whiteway M.: Transcription profiling of *Candida albicans* cells

- undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 3452–3456 (2002)
79. Nguyen K.A., Zmeter G., Claris O., Kassai B.: Epidemiology of invasive *Candida* infection in a neonatal intensive care unit in France. *Acta Paediatr.* doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02514.x (2011)
 80. Niimi K., Shepeherd M.G., Cannon R.D.: Distinguishing *Candida* species by β -N-acetylhexosaminidase activity. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2089–2097 (2001)
 81. Pichová I., Pavličková L., Dostál J., Dolejší E., Hrušková-Hidingsfeldová O., Weber J., Ruml T., Souček M.: Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. *FEBS Eur. J. Biochem.* **268**, 2669–2677 (2001)
 82. Raška M., Běláková J., Křupka M., Weigl E.: Candidiasis – do we need to fight or to tolerate the *Candida* fungus? *Folia Microbiol.* **52**, 297–312 (2007)
 83. Rehaume L.M., Jouault T., Chamaillard M.: Lessons from the inflammasome: a molecular sentry linking *Candida* and Crohn's disease. *Trends. Immunol.* **31**, 171–175 (2010)
 84. Sampaio P., Santos M., Correia A., Amaral F.E., Chavéz-Galarza J., Costa-de-Oliveira S., Castro A.G., Pedrosa J., Pais C.: Virulence Attenuation of *Candida albicans* Genetic Variants Isolated from a Patient with a Recurrent Bloodstream Infection. *PLoS ONE* **5**, e10155, doi:10.1371/journal.pone.0010155 (2010)
 85. Schaller M., Schäfer W., Korting H.C., Hube B.: Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from oral cavity. *Mol. Microbiol.* **29**, 605–615 (1998)
 86. Schaller M., Korting H.C., Schäfer W., Bastert J., Chen W.C., Hube B.: Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol. Microbiol.* **34**, 169–180 (1999a)
 87. Schaller M., Hube B., Ollert M.W., Schäfer W., Borg-von Zeppelin M., Thoma-Greber M., Korting H.C.: *In vivo* expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV- infected patients. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 383–389 (1999b)
 88. Schaller M., Schackert C., Korting H.C., Januschke E., Hube B.: Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 712–717 (2000)
 89. Schaller M., Januschke E., Schackert C., Woerle B., Korting H.C.: Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis *in vivo*. *J. Med. Microbiol.* **50**, 743–747 (2001)
 90. Schaller M., Mailhammer R., Grassl G., Sander Ch. A., Hube B., Korting H.C.: Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J. Invest. Dermatol.* **118**, 652–657 (2002)
 91. Schaller M., Bein M., Korting H.C., Baur S., Hamm G., Mond M., Beinhauer S., Hube B.: The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstructed human vaginal epithelium. *Infect. Immun.* **71**, 3227–3234 (2003)
 92. Schaller M., Korting H.C., Borelli C., Hamm G., Hube B.: *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinases Modify the Epithelial Cytokine Response in an *In Vitro* Model of Vaginal Candidiasis. *Infect. Immun.* **73**, 2758–2765 (2005)
 93. Schelenz S.: Management of candidiasis in the intensive care unit. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, i31–i34 (2008)
 94. Schild L., Heyken A., de Groot P.W.J., Hiller E., Mock M., de Koster C., Horn U., Rupp S., Hube B.: Proteolytic Cleavage of Covalently Linked Cell Wall Proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. *Eucaryot Cell*, **10**, 98–109 (2011)
 95. Schofield D.A., Westwater C., Warner T., Nicholas P.J., Paulling E.E., Balish E.: Hydrolytic gene expression during oroesophageal and gastric candidiasis in immunocompetent and immunodeficient gnotobiotic mice. *J. Infect. Dis.* **188**, 591–599 (2003)
 96. Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D., Azeredo J.: Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *J. Med. Mycol.* **59**, 747–752 (2010)
 97. Stringaro A., Crateri P., Pellegrini G., Arancia G., Cassone A., De Bernardis F.: Ultrastructural localization of the secretory aspartyl proteinase in *Candida albicans* cell wall *in vitro* and in experimentally infected rat vagina. *Mycopathologia*, **137**, 95–105 (1997)
 98. Tavanti A., Pardini G., Campa D., Davini P., Lupetti A., Sonesi S.: Differential Expression of Secretory Aspartyl Proteinase Genes (*SAP1-10*) in Oral *Candida albicans* Isolates with Distinct Karyotypes. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4726–4734 (2004)
 99. Tongchusak S., Brusic V., Chaiyaroj S.C.: Promiscuous T cell epitope prediction of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase family of proteins. *Infect. Genetics Evolution*, **8**, 467–473 (2008)
 100. Zaoutis T.: Candidemia in children. *Curr. Med. Res. Opin.* **26**, 1761–1768 (2010)

ROLE OF ASPARTIC PROTEINASES
IN *CANDIDA ALBICANS* VIRULENCE.
PART II: EXPRESSION OF *SAP1-10* ASPARTIC PROTEINASE
DURING *CANDIDA ALBICANS* INFECTIONS *IN VIVO*

ROLA PROTEAZY ASPARTYŁOWEJ W WIRULENCJI *CANDIDA ALBICANS*
CZĘŚĆ II: EKSPRESJA *SAP1-10* PROTEAZY ASPARTYŁOWEJ
PODCZAS ZAKAŻEŃ *CANDIDA ALBICANS* *IN VIVO*

Monika Staniszeńska^{1*}, Małgorzata Bondaryk¹, Katarzyna Siennicka², Joanna Piłat³,
Martin Schaller⁴, Wiesław Kurzątkowski¹

¹Independent Laboratory of Streptomyces and Fungi Imperfecti, National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene,
Chocimska 24, 00-791 Warsaw, Poland

²Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 166, 02-787 Warsaw, Poland

³Warsaw University of Technology, Pl. Politechniki 1, 00-661 Warsaw, Poland

⁴Department of Dermatology, Eberhard-Karls-University Tübingen, Liebermeisterstrasse 2572076, Tübingen, Germany

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Ekspresja genów proteazy aspartylowej podczas zakażeń *Candida albicans* *in vivo*. 2. Ekspresja genów proteazy aspartylowej u innych gatunków z rodzaju *Candida*. 3. Inhibitory proteazy aspartylowej. 4. Podsumowanie

Abstract: *Candida albicans* is an opportunistic fungal pathogen known to produce several secreted hydrolytic enzymes, among which aspartic proteinases are considered to be a key virulence factor in pathogenesis. During last decade, Saps have been extensively studied in several *in vivo* studies based on human samples and animal models. It has been demonstrated that *SAP5* and *SAP9* are the most highly expressed proteinase genes *in vivo*. Despite many studies, very little is known about *SAP7* and *SAP8* role in *C. albicans* pathogenesis. Moreover, this review presents Sap regulation by nutritional supplementation and environmental factors, i.e. temperature, pH and the growth phase of *C. albicans* cells. In addition, Saps presence is discussed in *Candida tropicalis* as well as *Candida parapsilosis* and *Candida guilliermondii* as contribution of these non-*albicans* *Candida* strains in clinical infections is gradually increasing. Furthermore, the review underscores the need for studies using Sap enzymes as a potential drug-target due to their key role in virulence of *Candida* spp. The studies using the classical aspartic PI pepstatin A and HIV PIs provided evidence for the contribution of Sap to *C. albicans* virulence. Therefore, more conclusive studies concerning the 10 *SAP* gene expression and their regulation during infective process, association of Saps production with other virulence processes of *C. albicans* and Saps immune response in animal and human infection still have to be conducted.

1. Aspartic proteinase genes expression during *Candida albicans* infections *in vivo*. 2. Other non-*albicans* species that produce aspartic proteinases. 3. Aspartic proteinase inhibitors 4. Summary

Słowa kluczowe: *Candida albicans*, kandydoza, proteaza aspartylowa, wirulencja

Key words: *Candida albicans*, aspartic proteinases, candidiasis, virulence

1. Aspartic proteinase genes expression during *Candida albicans* infections *in vivo*

Enzymatic activities of *C. albicans* have received considerable attention in several *in vivo* studies [7, 15, 36, 42, 44]. Thus, the role of Saps in the development and progression of candidiasis has been studied for systemic and mucosal candidal infections [4, 23, 31, 37, 43, 53]. In addition, the research involving human samples and animal models are discussed in the manuscript (Table I). With regard to human mucosal infections, an early study by Schaller et al. [43] suggested pathogenetic role of the Sap1-3 during oral candidiasis. This notion was supported when a sensitive, RT-PCR technique was

used that was able to detect *SAP1* to *SAP3* transcripts in patients with oral candidiasis [34]. On the contrary, Hube and Naglik [22] demonstrated the production of Sap1-8 proteinases during oral and vaginal candidiasis. The results indicated that *SAP1*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP7*, *SAP8* expression was correlated with oral disease, whereas *SAP1*, *SAP3*, and *SAP6-8* expression was correlated with vaginal disease. It should be noted that although *SAP1*, *SAP3*, and *SAP8* were expressed either in oral or vaginal infections, the *SAP1-3* were preferentially expressed in vaginal, rather than oral, infections. Since then to more recent study [37], the results indicated either the differential expression of the *SAP* in humans or correlation these genes with active disease

* Corresponding author. Independent Laboratory of Streptomyces and Fungi Imperfecti, National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene, 24 Chocimska, 00-791 Warsaw; phone: +48 22 54 21 228; fax: + 48 22 849 74 84; e-mail: mstaniszewska@pzh.gov.pl

Table I

Expression of secreted aspartyl proteinases in human and in animal models

Model	Infection	Secreted aspartyl proteinases	Assay	Main findings	References
Murine and guinea pig	Systemic infection	SAP4-6	Southern blotting, survival curves	SAP4, SAP5 and SAP6 expression was observed during progression of systemic infection by <i>C. albicans</i> in animals	[43]
Murine and guinea pig	Disseminated infection	SAP1-3	Southern blotting, hybridization autoradiography	SAP1, SAP2 and SAP3 were detected during <i>C. albicans</i> disseminated infections	[20]
Rat	Infected rat vagina	Sap	Immunoelectron microscopy, SDS-PAGE with antirabbit IgG or antimouse IgG-peroxidase conjugated	Sap secreted by <i>C. albicans</i> during rat vaginitis; Sap localized in the cell wall of hyphal forms during infection	[53]
Human	Sera	Sap	Western blot with monoclonal antibody (MAb)	Detection of Sap antigen in the sera of patients with invasive candidiasis	[7]
Human	Oral candidiasis	SAP1-7	RT-PCR	SAP1-3 transcripts were observed in patients with oral candidiasis	[34]
Human	Oropharyngeal candidiasis	Sap1-3	Immunoelectron microscopy with murine monoclonal antibody	The expression of Sap1-3 does not confirm a pathogenetic role of the Sap1-3 in host-fungal interaction	[46]
Human	Oral and cutaneous candidiasis	Sap1-3 or Sap4-6	Immunoelectron microscopy	Sap1-3 crucial for mucosal and cutaneous candidiasis	[47]
Mice	Gastrointestinal infection	SAP1-6	RT-PCR, IVET	Expression of SAP4-6 was detected in higher percentage than SAP1-3; individual Saps are not indispensable factors for virulence	[25]
Mice	Disseminated candidiasis	SAP4-6	RT-PCR; immunoelectron microscopy	Hyphal morphologies without expression of SAP6 are less virulent; Sap1-3 antigens were found on yeast and hyphal cells, Sap4-6 were predominantly found on hyphal cells in close contact with host cells	[15]
Human	Vaginal candidiasis	SAP1-10	RT-PCR	SAP5 and SAP2 transcript were expressed in <i>C. albicans</i> cells infecting human epithelia <i>in vivo</i>	[48]
Mice	Keratitis infection model	SAP4-6	Southern blot analysis	SAP6 appears to be associated with morphogenetic transformation of yeast to invasive filamentous forms, SAP6 contributes to corneal pathogenicity	[23]
Human	Oral candidiasis	SAP1-6	qRT-PCR	SAP5 and SAP9 are the most highly expressed proteinase genes <i>in vivo</i>	[37]
Mice	Disseminated infections	SAP1-6	qRT-PCR	Expression of SAP1-6 was low in murine model of haematogenously disseminated candidiasis	[11]

and anatomical location. Address to the above, the letter authors [37] found that SAP5 and SAP9 are the most highly expressed proteinase genes *in vivo*.

Using animal models by Stringaro et al. [53] and RHE by Schaller et al. [46] both groups demonstrated that Sap1 and Sap2 are favoured during experimental rat vaginitis and actively secreted by *C. albicans* hyphal forms. Other studies [15, 41, 50, 51] showed that Sap4 and Sap6 are constitutively expressed during intra-peritoneal infection of mouse models, while Sap2, Sap3, and Sap5 are only occasionally detected. A more recent study by Correia et al. [11] suggested that Sap1 to Sap6 do not play a significant role in *C. albicans* virulence in a murine model of hematogenously disseminated candidiasis and that Sap1 to Sap3 are not necessary for suc-

cessful *C. albicans* infection. Finally, it was emphasized that Sap4-6 proteins play role during the initial phase of organ invasion, while Sap1-3 proteins play part in the later phases of the pathogenesis process. A more recent study by Jackson et al. [23] found that morphogenic conversion of *C. albicans* is closely associated with Sap6 production during corneal infection. Moreover, Jackson et al. [23] using Sap mutants suggested that SAP6 is involved in the pathogenesis of *C. albicans* keratitis as SAP6-altered strains did not establish persistent infection and failed either to invade or to trigger inflammation. Furthermore, reintroduction of the SAP6 gene into the fungal genome reconstituted corneal pathogenicity [23].

However, virulence differences in human data and previous mouse data (mentioned above) depend on dif-

ferent isolates of *C. albicans* and different infection models or molecular techniques employed. Animal models are powerful tools to study the pathogenesis of diverse types of candidiasis [9]. Moreover, murine models are particularly attractive because of cost, easy of handling, and experience with their use [9]. Despite of the above, there are differences in the interaction of *C. albicans* with these two mammalian species because of *C. albicans* is a natural commensal/pathogen of human but not of mice [37].

In general, Sap expression is regulated by nutritional supplementation and environmental factors, i.e., temperature, pH and the growth phase of *C. albicans* cells [35]. Chen et al. [8] determined that change of pH and temperature in the culture medium affect Sap4-6 expression. According to some authors [1, 22, 28, 46], Sap2 and Sap3 expression were optimal at pH 3.5 while Sap6 was most efficiently expressed in a less acidic (pH 5.0) medium as determined by tests conducted at 37°C in media with nitrogen source. Furthermore, according to Wu et al. [57] low levels of extracellular Sap may also stimulate the transcription and translation of SAP genes. Human serum provides proteins such as albumins and globulins generally considered to be cleaved by Sap enzymes which provide the essential nitrogen for cell growth [51, 55]. Early work [6] demonstrated that certain culture conditions influence proteolytic activity of *Candida* strains. The authors [6] claimed that among substrates hydrolyzed by Sap are: salivary lactoferrin, lactoperoxidase, mucin, secretory immunoglobulins, including secretory IgA. Moreover, three reports [6, 35, 46] noted that Sap2 exhibits broad substrate specificity. Their findings showed that collagen, stratum corneum, laminin and fibronectin are efficiently degraded by Sap2. The first experimental evidence [9, 10] suggests that Sap2 may be involved in the progression extracellular digestion of the intestinal mucus barrier observed after oral-intragastric inoculation of *C. albicans* in the infect mouse model. In addition, Lermann and Morschhäuser [29] found that only SAP2 is required for *C. albicans* growth in YCB-BSA medium (yeast carbon base – bovine serum albumin). The authors examined *sap4Δ sap5Δ sap6Δ* triple mutant and demonstrated that SAP2 expression does not depend on any of those other proteinases. In summary, the studies [1, 6, 20, 21, 35, 38, 46] noted that Sap2 is the most abundant secreted protein *in vitro* under growth in presence of exogenous protein. Thus, in these conditions high levels of aspartic proteases must be secreted to support growth [20].

Very little is known about SAP7 and SAP8 role in *C. albicans* pathogenesis, however according to Hornbach et al. [19] the expressions of Sap7 and Sap8 do not correlate with virulence. Furthermore, Albrecht et al. [4] note that mutants lacking SAP9 and/ or SAP10

had altered adhesion properties and were mitigated in inducing tissue damage. According to Hornbach et al. [19] expression of SAP9 is possibly independent of pH and morphotype. Studies of *C. albicans* gene expression during experimental infection reveal that different stress responses are mounted during different types of infections, presumably because different environments present different challenges [27]. In the future the search for Saps involvement in virulence and the molecules that determine the differences in Sap expression by quantification of experimental data, with using real-time PCR ought to be conducted.

2. Other non-*Candida albicans* species that produce aspartic proteinase

Many pathogenic non-*albicans* fungi of the genus *Candida* including such species as *Candida glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* possess SAP genes [24, 36]. For example, experiments held with using SAP1DNA as a probe allowed identifying cross-reacting bands in the genomic DNA of *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* [18, 32].

The yapsins of *S. cerevisiae* are a family of five glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked aspartyl proteinases (Yps1-3, Yps6, and Yps7) that have been shown to cleave peptides C-terminal to basic residues both *in vitro* and *in vivo* [24, 26]. The *S. cerevisiae* YPS genes are induced during cell wall remodelling; furthermore they have homologues in other fungi such as *C. albicans* as well as *C. glabrata* [26]. In *C. albicans*, the Yps-related proteinases are Sap9 and Sap10 [24]. Kaur et al. [24] using mouse macrophage-like cell line J774A.1 showed that macrophage-internalized *C. glabrata* exhibit transcriptional induction of a specific for this species cluster of genes encoding a family of putative aspartyl proteinases. Furthermore, 11 GPI-linked aspartyl proteinases are encoded by *C. glabrata* are closely related to YPS genes of *S. cerevisiae* [24]. Kaur et al. [24] noted that these genes are also required for survival within macrophages and for virulence in a murine model of disseminated candidiasis caused by *C. glabrata*. However, no typical SAP genes were described in *C. glabrata* [39].

Previously, the existence of the SAPT gene family in *C. tropicalis* was suggested [32]. Furthermore the study of Zug et al. [58] demonstrated that this gene family is likely to contain only four members (SAPT1-4). During *in vitro* studies it was observed that *C. tropicalis* show Sap activity in a medium containing bovine serum albumin as the sole source of nitrogen [57]. These authors [57] suggested that Sapt2, Sapt3, and Sapt4 could be produced under conditions yet to be described *in vitro* or during infection. However, it appears that Sapt1 plays a little role in *C. tropicalis* pathogenesis [18] as studies of

To g n i et al. [55] showed that Sapt1 did not contribute significantly to fungal virulence in inoculation candidiasis of the normal mouse. Although mortality rate was slightly lower in groups infected with the Δ sapt1 strain, the mutant still possessed the ability to invade and grow in the kidneys, which eventually led to the death of the infected mice [54]. Effect of disturbing Sapt2p, Sapt3p, and Sapt4p has yet to be studied [18]. Based on phylogenetic analyses, Parra - Ortega et al. [39] demonstrated that *C. tropicalis* SAPT4 is orthologous to *C. albicans* SAP1 and *C. dubliniensis* SAPD1.

It has been described that *C. dubliniensis* is species that is most closely related to *C. albicans* [33]. Furthermore, *C. dubliniensis* strains show highly proteolytic activity by producing greater amounts of proteinase than reference *C. albicans* strains [17]. Existence of SAP family in *C. dubliniensis* was confirmed by the study of Gilfillan et al. [17]. The latter authors [17] demonstrated that all the *C. dubliniensis* isolates examined possessed homologues to each of the seven *C. albicans* SAP genes tested. In total, eight SAP genes (Sapcd1-Sapcd4; Sapcd7-Sapcd10) in *C. dubliniensis* were described [39]. Furthermore, SAPD4 is only member of the Sap4-6 family found in the *C. dubliniensis* genome and the other non-*albicans* *Candida* species have no Sap4-6 orthologues [39]. However role of Sap isoenzymes in *C. dubliniensis* pathogenesis requires further studies [18].

Candida parapsilosis exhibit proteinase activity in medium where BSA is the sole nitrogen source [13]. In the study of De Viragh et al. [13] two genes encoding putative secreted aspartic proteases were identified, though only one product was identified as extracellular aspartic proteinase [40]. Furthermore, the latter authors [13] reported the purification of *C. parapsilosis* acid proteinases produced by yeasts in BSA. In further studies of *C. parapsilosis* SAP genes, three Sap isoenzymes (Sapp1-Sapp3) had been identified [39]. However, the effect of disturbing *C. parapsilosis* SAP genes has not been investigated [18].

Although other species possess SAP genes, *C. albicans* aspartyl proteinase is by far most characterised in detail [36] as this yeast remains the key fungal pathogen of humans. According to Parra - Ortega et al. [39] non-pathogenic yeast species contain fewer SAP and YAP genes than their opportunistic pathogen relatives. However same authors mention that SAP genes expression studies of non-*albicans* *Candida* species such as *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* are still missing [39].

3. Aspartic proteinase inhibitors

The role of *Candida* proteinases in pathogenesis and their potential as antifungal targets – have driven the use of aspartyl proteinase inhibitors (PIs) in *Candida*

research. The studies using the classical aspartyl PI pepstatin A and HIV PIs provided evidence for the contribution of Sap to *C. albicans* virulence. Schaller et al. [44] showed that pepstatin A was able to influence adhesion and invasion of *C. albicans* *in vitro*. Their findings indicated that pepstatin A can reduce histological damage during *C. albicans* infection in the model of human oral candidiasis. Furthermore, this would indicate that Sap activity contributes to the virulence in this *in vitro* model. Unfortunately, it was shown [42] that classical ligand pepstatin A cannot be used clinically, at least not systematically, because of its metabolism in the liver and rapid clearance from blood. Moreover, the results obtained by Lermann and Morschhäuser [29] cannot unequivocally include the possibility that pepstatin A inhibit Sap activity under the conditions used in the RHE model. Similar results were obtained by Schild et al. [50], who demonstrated that Sap9/Sap10 exhibiting a limited inhibition potential by pepstatin A. *Candida albicans* aspartic proteinase belongs to the same family as abundant HIV proteinase, the effect of three HIV proteinase inhibitors (ritonavir, indinavir and saquinavir) was studied on *Candida* adhesion to epithelial cells [14]. Among them ritonavir was found to be the most potent inhibitor of fungal adhesion [5, 10]. The latter authors [5] concluded that although the HIV protease inhibitors were found to attenuate adhesion of *C. albicans* to epithelial cells *in vitro*, but were not able to modulate phagocytosis of cells by PLMNs. Indeed, the drug capable of blocking adhesion could prove to be attractive anti-fungal. However, later it was reviewed [14] that future derivatives designed to treat mucosal candidiasis in humans may require improvements. For more information on remain HIV PIs efficacy at inhibition of *C. albicans* proteinase activity, the reader is guided to reference by Mardegan et al. [30] and Fear et al. [14]. Another promising approach was the development of antibodies against Sap. In 2007 De Bernardis et al. [12] showed that human domain antibodies against Sap2 inhibit the adherence of *C. albicans* to epithelial cells of rat vagina and that they exert a protective activity against experimental vaginal candidiasis.

As reviewed Gauwerky et al. [16], today the obvious need for completely new antimycotic agents is clear. Thus, drug combination that target not only essential genes but also important virulence factors that are essential for steps in infection could be attractive in the treatment of candidiasis.

4. Summary

The role of Saps in the development and progression of candidiasis has been studied *in vivo* for systemic and mucosal candidal infections. In addition, the research

involving both human samples and animal models were discussed (Table I). Those studies indicate that there are differences in the interaction of *C. albicans* with *in vivo* human and animal model. Moreover, it has been demonstrated that Sap mutants and specific aspartic proteinases inhibitors (i.e. pepstatin A) reduce the ability of *C. albicans* to damage host tissues [3, 6, 9, 22, 36, 55].

Although other non-*albicans* *Candida* species possess SAP genes, *C. albicans* aspartyl proteinases by far remain best characterised [36].

The knowledge on how the pathogen regulates the production of different virulence factors contributes to our better understanding of the pathogenesis [2]. Therefore further studies on SAP production and expression are required, which will not only help to develop more effective treatment of candidiasis but could also offer therapeutic options in the treatment of other inflammatory conditions.

Acknowledgements

Our own work was supported by the research project NN404 113639 founded by the National Science Centre of Poland.

References

1. Abad-Zapatero C., Goldman R., Muchmore S. W., Hutchins C., Stewart K., Navaza J., Payne C.D., Ray T.: Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: implications for the design of antifungal agents. *Protein Sci.* **5**, 640–65 (1996)
2. Abegg M.A., Lucietto R., Alabarse P.V.G., Mendes M.F.A., Benfato M.S.: Differential Resistance to Oxidants and Production of Hydrolytic Enzymes in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, **171**, 35–41 (2011)
3. Akçağlar S., Ener B., Töre O.: Acid proteinase enzyme activity in *Candida albicans* strains: a comparison of spectrophotometry and plate methods. *Turk. J. Biol.* **35**, 559–567 (2011)
4. Albrecht A., Felk A., Pichova I., Naglik J.R., Schaller M., de Groot P., MacCallum D., Odds F.C., Schafer W., Klis F., Monod M., Hube B.: Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. *J. Biol. Chem.* **281**, 688–694 (2006)
5. Bektic J., Lell C.P., Fuchs A., Stoiber H., Speth C., Lass-Flörl C., Borg von Zepelin M., Dierich M.P., Würzner R.: HIV protease inhibitors attenuate adherence of *Candida albicans* to epithelial cells in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **31**, 65–71 (2001)
6. Borg M., Rüchel R.: Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect. Immun.* **56**, 626–631 (1988)
7. Byoung-Kuk N., Gyung-Tae Ch., Chul-Young S.: Production, characterization, and epitope mapping of a monoclonal antibody against aspartic proteinase of *Candida albicans*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**, 429–433 (1999)
8. Chen Y. C., Wu C.C., Chung W.L., Lee F.J.S.: Differential secretion of Sap4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. *Microbiol.* **148**, 3743–3754 (2002)
9. Cole G.T., Seshan K.R., Pope L.M., Yancey R.J.: Morphological aspects of gastrointestinal tract invasion by *Candida albicans* in the infant mouse. *J. Med. Vet. Mycol.* **26**, 173–185 (1988)
10. Colina A.R., Aumont F., Deslauriers N., Belhumeur P., De Repentigny L.: Evidence for Degradation of Gastrointestinal Mucin by *Candida albicans* Secretory Aspartyl Proteinase. *Infect. Immun.* **64**, 4514–4519 (1996)
11. Correia A., Lermann U., Teixeira L., Cerca F., Botelho S., Gil da Costa R.M., Sampaio P., Gärtner F., Morschäuser J., Vilanova M., Pais C.: Limited Role of Secreted Aspartyl Proteinases Sap1 to Sap6 in *Candida albicans* Virulence and Host Immune Response in Murine Hematogenously Disseminated Candidiasis. *Infect. Immun.* **78**, 4839–4849 (2010)
12. De Bernardis F., Cassone A. and others: Human Domain Antibodies against Virulence Traits of *Candida albicans* Inhibits Fungus Adherence to Vaginal Epithelium and Protect against Experimental Vaginal Candidiasis. *J. Infect. Dis.* **195**, 149–157 (2007)
13. De Viragh P.A., Sanglard D., Togni G., Falchetto R., Monod M.: Cloning and sequencing of two *Candida parapsilosis* genes encoding acid proteases. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 335–342 (1993)
14. Fear G., Komarnytsky S., Raskin I.: Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacol. Ther.* **113**, 354–368 (2007)
15. Felk A., Kretschmar M., Albrecht A., Schaller M., Beinhauer S., Nichterlein T., Sanglard D., Korting H.C., Schäfer W., Hube B.: *Candida albicans* hyphal formation and expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect. Immun.* **70**, 3689–3700 (2002)
16. Gauwerky K., Borelli C., Korting H.C.: Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. *Drug. Discov. Today*, **14**, 214–222 (2009)
17. Gilfillan G.D., Sullivan D.J., Haynes K., Parkinson T., Coleman D.C., Gow N.A.R.: *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology*, **144**, 829–838 (1998)
18. Haynes K.: Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* **9**, 591–596 (2001)
19. Hornbach A., Heyken A., Schild L., Hube B., Löffler J., Kurzai O.: The Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protease Sap9 Modulates the Interaction of *Candida albicans* with Human Neutrophils. *Infect. Immun.* **77**, 5216–5224 (2009)
20. Hube B., Sanglard D., Odds F.C., Hess D., Monod M., Schafer W., Brown A.J., Gow N.A.: Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2 and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect. Immun.* **65**, 3529–3538 (1997)
21. Hube B., Naglik J.: *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of the gene family. *Microbiol.* **147**, 1997–2005 (2001)
22. Hube B., Naglik J.: Extracellular hydrolases. In: Calderone R.A. (ed) *Candida and candidiasis*. Washington: ASM Press. 2002, pp. 107–122.
23. Jackson B.E., Wilhelmus K.R., Hube B.: The Role of Secreted Aspartyl Proteinases in *Candida albicans* Keratitis. *IOVS*, **48**, 3559–3565 (2007)
24. Kaur R., Ma B., Cormack B.P.: A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7628–7633 (2007)
25. Kretschmar M., Nichterlein T. and others: Individual acid aspartic proteinases (Saps) 1–6 of *Candida albicans* are not essential for invasion and colonization of the gastrointestinal tract in mice. *Microb. Pathog.* **32**, 61–70 (2001)
26. Krysan D.J., Ting E.L., Abeijon C., Kroos L., Fuller R.S.: Yapsins Are a Family of Aspartyl Proteases Required for Cell Wall Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, **4**, 1364–1374 (2005)
27. Kumamoto C.A.: Niche-specific gene expression during *C. albicans* infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 325–330 (2008)
28. Lee S.A., Jones J., Hardison S., Kot J., Khaliq Z., Bernardo S.M., Lazzell A., Monteagudo C., Lopez-Ribot J.: *Candida*

- albicans* VPS4 is Required for Secretion of Aspartyl Proteases and In Vivo Virulence. *Mycopathologia*, **167**, 55–63 (2009)
29. Lermann U., Morschhäuser J.: Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. *Microbiol.* **154**, 3281–3295 (2008)
 30. Mardegan R.C., Foglio M.A., Gonçalves R.B., Höfling J.F.: *Candida albicans* proteinases. *Braz. J. Oral. Sci.* **5**, 944–952 (2006)
 31. Matsubara V.H., Silva E.G., Paula C.R., Ishikawa K.H., Nakamae A.E.M.: Treatment with probiotics in experimental oral colonization by *Candida albicans* in murine model (DBA/2). *Oral. Dis.* **18**, 260–264 doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01868.x (2011)
 32. Monod M., Togni G., Hube B., Sanglard D.: Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol. Microbiol.* **13**, 357–368 (1994)
 33. Moran G.P., Coleman D.C., Sullivan D.J.: *Candida albicans* versus *Candida dublinensis*: why is *C. albicans* more pathogenic? *Int. J. Microbiol.* doi: 10.1155/2012/205921 (2012)
 34. Naglik J.R., Newport G., White T.C., Fernandes-Naglik L., Greenspan J.S., Greenspan D., Sweet S.P., Challacombe S.J., Agabian N.: *In vivo* analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect. Immun.* **67**, 2482–2490 (1999)
 35. Naglik J.R., Challacombe S.J., Hube B.: *Candida albicans* secreted aspartyl proteases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 400–428 (2003)
 36. Naglik J., Albrecht A., Bader O., Hube B.: *Candida albicans* proteinases and host/ pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **6**, 915–926 (2004)
 37. Naglik J.R., Moyes D., Makwana J., Kanzaria P., Tschlakai E., Weindl G., Tappuni A.R., Rodgers C.A., Woodman A.J., Challacombe S.J., Schaller M., Hube B.: Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiol.* **154**, 3266–3280 (2008)
 38. Nantel A., Dignard D., Bachewich C., Hargus D., Maril A., Bouin A-P., Sensen Ch. W., Hogues H., van het Hoog M., Gordon P., Rigby T., Benoit F., Tessier D.C., Thomas D.Y., Whiteway M.: Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition. *Mol. Biol. Cell.* **13**, 3452–3456 (2002)
 39. Parra-Ortega B., Cruz-Torres H., Villa-Tanaca L., Hernández-Rodríguez C.: Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **104**, 505–512 (2009)
 40. Pichová I., Pavličková L., Dostál J., Dolejší E., Hrušková-Hidingsfeldová O., Weber J., Ruml T., Souček M.: Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. *FEBS Eur. J. Biochem.* **268**, 2669–2677 (2001)
 41. Ripeau J.S., Fiorillo M., Aumont F., Belhumeur P., de Repentigny L.: Evidence for differential expression of *Candida albicans* virulence genes during oral infection in intact and human immunodeficiency virus type 1-transgenic mice. *J. Inf. Dis.* **185**, 1094–1102 (2002)
 42. Rüchel R., Ritter B., Schaffrinski M.: Modulation of Experimental Systemic Murine Candidosis by Intravenous Pepstatin. *Zentralbl. Bakteriell. Mikrobiol. Hyg.* **273**, 391–403 (1990).
 43. Sanglard D., Hube B., Monod M., Odds F.C., Gow N.A.R.: A Triple Deletion of the Secreted Aspartyl Proteinase Genes *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* Causes Attenuated Virulence. *Infect. Immun.* **65**, 3539–3546 (1997)
 44. Schaller M., Schäfer W., Korting H.C., Hube B.: Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from oral cavity. *Mol. Microbiol.* **29**, 605–615 (1998)
 45. Schaller M., Korting H.C., Schäfer W., Bastert J., Chen W.C., Hube B.: Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol. Microbiol.* **34**, 169–180 (1999a)
 46. Schaller M., Hube B., Ollert M.W., Schäfer W., Borg-von Zeppelin M., Thoma-Greber M., Korting H.C.: *In vivo* expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 383–389 (1999)
 47. Schaller M., Januschke E., Schackert C., Woerle B., Korting H.C.: Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis *in vivo*. *J. Med. Microbiol.* **50**, 743–747 (2001)
 48. Schaller M., Bein M., Korting H.C., Baur S., Hamm G., Mond M., Beinhauer S., Hube B.: The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstructed human vaginal epithelium. *Infect. Immun.* **71**, 3227–3234 (2003)
 49. Schaller M., Korting H.C., Borelli C., Hamm G., Hube B.: *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinases Modify the Epithelial Cytokine Response in an In Vitro Model of Vaginal Candidiasis. *Infect. Immun.* **73**, 2758–2765 (2005)
 50. Schild L., Heyken A., de Groot P.W.J., Hiller E., Mock M., de Koster C., Horn U., Rupp S., Hube B.: Proteolytic Cleavage of Covalently Linked Cell Wall Proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. *Eucaryot Cell*, **10**, 98–109 (2011)
 51. Schofield D.A., Westwater C., Warner T., Nicholas P.J., Pauling E.E., Balish E.: Hydrolytic gene expression during oroesophageal and gastric candidiasis in immunocompetent and immunodeficient gnotobiotic mice. *J. Inf. Dis.* **188**, 591–599 (2003)
 52. Staib P., Wirsching S., Strauß A., Morschhäuser J.: Gene regulation and host adaptation mechanisms in *Candida albicans*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 183–188 (2001)
 53. Stringaro A., Crateri P., Pellegrini G., Arancia G., Cassone A., De Bernardis F.: Ultrastructural localization of the secretory aspartyl proteinase in *Candida albicans* cell wall *in vitro* and in experimentally infected rat vagina. *Mycopathologia*, **137**, 95–105 (1997)
 54. Szabo E.K., MacCallum D.M.: The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis. *FEMS Microbiol. Lett.* **320**, 1–8 (2011)
 55. Togni G., Sanglard D., Monod M.: Acid proteinase secreted by *Candida tropicalis*: virulence in mice of a proteinase negative mutant. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**, 257–265 (1994)
 56. Wright R.J., Carne A., Hieber A.D., Lamont I.L., Emerson G.W., Sullivan P.A.: A second gene for a secreted aspartate proteinase in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **174**, 7848–7853 (1992)
 57. Wu T., Samaranyake L.P., Leung W.K., Sullivan P.A.: Inhibition of growth and secreted aspartyl proteinase production in *Candida albicans* by lysozyme. *J. Med. Microbiol.* **48**, 721–730 (1999)
 58. Zaugg C., Borg-von Zeppelin M., Reichard U., Sanglard D., Monod M.: Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. *Infect. Immun.* **69**, 405–412 (2001)

Małgorzata Pawlikowska^{1*}, Wiesław Deptuła¹

¹ Katedra Mikrobiologii i Immunologii Wydział Biologii Uniwersytet Szczeciński,
ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin

Wpłynęło w lipcu 2011 r.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka rodziny *Parachlamydiaceae*. 3. Charakterystyka rodziny *Simkaniaceae*. 4. Charakterystyka rodziny *Rhabdochlamydiaceae*. 5. Charakterystyka rodziny *Waddliaceae*. 6. Charakterystyka rodziny *Piscichlamydiaceae*. 7. Charakterystyka rodziny *Clavochlamydiaceae*. 8. Charakterystyka rodziny *Criblamydiaceae*. 9. Charakterystyka chlamydii niesklasyfikowanych. 10. Podsumowanie

Environmental chlamydiae – new data

Abstract: To date, studies concerning bacteria from the order *Chlamydiales* were focused on a pathogen belonging to *Chlamydiaceae* family. Lately, thanks to molecular biology techniques, the taxonomy of *Chlamydiales* was expanded with four new families: *Rhabdochlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Clavochlamydiaceae* and *Criblamydiaceae* and new isolates non-classified to any family. These bacteria are isolated as endosymbionts of insects, fishes and from water and water desposits. Among these microorganisms, environmental chlamydiae have been identified, as pathogens of human and animals.

1. Introduction. 2. Characteristics of *Parachlamydiaceae* family. 3. Characteristics of *Simkaniaceae* family. 4. Characteristics of *Rhabdochlamydiaceae* family. 5. Characteristics of *Waddliaceae* family. 6. Characteristics of *Piscichlamydiaceae* family. 7. Characteristics of *Clavochlamydiaceae* family. 8. Characteristics of *Criblamydiaceae* family. 9. Characteristics of non-classified chlamydiae. 10. Summary

Słowa kluczowe: chlamydie środowiskowe, *Rhabdochlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Clavochlamydiaceae*, *Criblamydiaceae*

Key words: environmental chlamydiae, *Rhabdochlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Clavochlamydiaceae*, *Criblamydiaceae*

1. Wprowadzenie

Chlamydie od wielu lat znane są głównie jako patogeny człowieka i zwierząt, a ich systematyka do końca XX wieku obejmowała jeden rodzaj z 4 gatunkami [40]. W 1999 roku na podstawie badań molekularnych nastąpiła „rewolucja” w systematyce chlamydii, na podstawie której wyodrębniono w rzędzie *Chlamydiales* 4 rodziny: *Chlamydiaceae* z dwoma gatunkami *Chlamydia* sp. i *Chlamydophila* sp. oraz 3 nowe rodziny *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* i *Waddliaceae* [29]. Te trzy rodziny utworzyły bakterie bytujące w nowych niszach ekologicznych, jako że pierwotnie stwierdzano je u ameb, ryb, owadów, a obecnie izoluje się je także od ludzi i zwierząt ze stanów chorobowych [1, 18, 29, 58]. Fakty te przybliżyliśmy w poprzedniej pracy [58], która po raz pierwszy w piśmiennictwie polskim, scharakteryzowała chlamydie środowiskowe tworzące rodziny *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae* i *Waddliaceae*. Obecna systematyka chlamydii [52] została rozbudowana o następne 4 nowe rodziny, zaliczane także do chlamydii środowiskowych, to jest *Rhabdochlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Clavochlamydiaceae* i *Criblamydiaceae* (tab. I). O chlamydiach środowiskowych pojawiły się nowe dane, także dotyczące ich potencjalnej chorobotwórczości dla człowieka oraz zwierząt i te fakty prezentujemy w obecnej pracy.

2. Charakterystyka rodziny *Parachlamydiaceae*

Do rodziny *Parachlamydiaceae* (tab. I) przynależą dwa rodzaje *Parachlamydia* i *Neochlamydia*, każdy z jednym gatunkiem, odpowiednio *Parachlamydia* (*P.*) *acanthamoebae*, *Neochlamydia* (*N.*) *hartmanelleae* oraz rodzaj *Protochlamydia* z dwoma gatunkami: *Protochlamydia* (*Pr.*) *amoebophila* i *Pr. nagleriophila* oraz przypisany do rodziny „*Candidatus Metachlamydia lacustris*” [1, 5, 12, 15, 33, 42, 54, 66]. Charakterystykę rodziny oraz gatunków *P. acanthamoebae*, *N. hartmanelleae* i *Pr. amoebophila*, opisano poprzednio [58]. Obecnie należy tylko dodać, że parachlamydie, mimo że pierwotnie zostały wyizolowane jako endosymbionty ameb, są potencjalnymi patogenami dla ludzi i zwierząt [28, 37], gdyż mają zdolność do namnażania się w komórkach ludzi i małp [9, 11, 36]. Pierwsze doniesienia o chorobotwórczości u ludzi dotyczyły zapalenia rogówki u osób noszących soczewki kontaktowe, jako że ich gospodarze (ameby), znajdowały się w biofilmie występującym na szklach kontaktowych [17, 37]. U osób z obniżoną odpornością wykazano, że parachlamydie mogą powodować zmiany skórne [17, 37]. Nadto zdolność parachlamydii do przeżywania wewnątrz ameb, może doprowadzać do utajonych infekcji dróg oddechowych u ludzi, gdyż ameby ulegają lizie w błonie śluzowej nosa, a uwalniane parachlamydie zakażają komórki układu oddechowego

* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; tel.: (091) 444 16 05, 444 15 92; fax: (091) 444 16 06; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl

Tabela I

Systematyka rzędu *Chlamydiales* z uwzględnieniem chlamydii środowiskowych [1, 5, 7, 9–11, 12, 14–16, 18–21, 23–26, 30, 31, 37, 39, 41–44, 46–51, 54–57, 63, 65, 66]

Rząd Rodzina	<i>Chlamydiales</i>									
	Chlamydiaceae	Parachlamydiaceae	Simkaniaceae	Rhabdo-chlamydiaceae	Waddliaceae	Piscichlamydiaceae	Clavochlamydiaceae	Criblamydiaceae	Chlamydie nie zaklasyfikowane do rodzin	
Rodzaj i gatunek	Rodzaj: <i>Chlamydia</i> (C.) Gatunek: <i>C. trachomatis</i> <i>C. suis</i> <i>C. muridarum</i> Rodzaj: <i>Chlamydia</i> (Cp.) Gatunek: <i>Cp. psittaci</i> <i>Cp. abortus</i> <i>Cp. felis</i> <i>Cp. caviae</i> <i>Cp. pecorum</i> <i>Cp. pneumoniae</i>	Rodzaj: <i>Parachlamydia</i> (P.) Gatunek: <i>P. acanthamoebae</i> Rodzaj: <i>Neochlamydia</i> (N.) Gatunek: <i>N. hartmannellae</i> Rodzaj: <i>Protochlamydia</i> (Pr.) Gatunek: <i>Pr. amoebophila</i> <i>Pr. naeglerioophila</i> <i>Candidatus</i> <i>Metachlamydia</i> <i>lacustris</i>	Rodzaj: <i>Simkania</i> (S.) Gatunek: <i>S. negevensis</i> Rodzaj: <i>Fritschea</i> (F.) Gatunek: <i>F. bemisiae</i> <i>F. eriococci</i>	Rodzaj: <i>Rhabdochlamydia</i> (R.) Gatunek: <i>R. porcellionis</i> <i>R. crassifrons</i>	Rodzaj: <i>Waddlia</i> (W.) Gatunek: <i>W. chondrophila</i> <i>W. malaysiensis</i>	„ <i>Candidatus</i> <i>Piscichlamydia</i> <i>salmonis</i> ”	„ <i>Candidatus</i> <i>Clavochlamydia</i> <i>salmonicola</i> ”	<i>Criblamydia</i> <i>sequanensis</i> <i>Estrella</i> <i>lausannensis</i>	**bakterie chlamydiopodobne: Taynaya-24, CRG18, CRG20, CRG98, cvE60, CRIB32	
Inne gatunki	ECL VII*	ECL I-V, VII*; <i>Parachlamydia</i> sp. UV-7, cvC7, cvC15, Burton-46, UKC1-9, CRIB35, CRIB36, CRIB37	ECL VI, cvE6, cvE9, cvE38, cvE41	CRIB33, CRIB34	Brak danych	Brak danych	Brak danych	CRIB31		

Objaśnienia: ECL – chlamydialne linie środowiskowe (environmental chlamydiae lineage); ECL VII* – szczepy tej linii wykazują 87–89% podobieństwo do bakterii z rodziny *Chlamydiaceae*;**– sugeruje się, że zarazki te przynależą do rzędu *Chlamydiales* – grupa chlamydie niesklasyfikowane

[17]. Warto dodać, że ameby z parachlamydiami izolowano od ludzi z epidemią gorączki wilgotnej [27]. Ich patogenność potwierdzono wywołując eksperymentalnie zapalenie płuc u myszy i wykazując w ich płucach metodą PCR, obecność materiału genetycznego *P. acanthamoebae* [8]. Ponadto stwierdzono metodami biologii molekularnej udział tej bakterii w pozaszpitalnym zapaleniu płuc u ludzi [38] oraz wykazano ją w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów chorych na stwardnienie rozsiane [13], w płytkach miażdżycowych u ludzi [35], a także w poronionych płodach u bydła [6, 67], owiec i kóz [62]. U kobiet zakażonych *P. acanthamoebae*, wykazano możliwość jej przechodzenia przez łożysko i prowokowanie przedwczesnych porodów [2], jak też powodowanie schorzeń układu oddechowego u wcześniaków [53]. Bakterię tę wykazano metodą PCR w zapaleniu płuc, osierdza, nerek i wątroby u gadów (węże, żółwie, jaszczurki) [64]. *P. acanthamoebae* stwierdzano również u kotów z zapaleniem rogówki, nekrozą i erozją rogówki, nie wykazując obecności ameb, co sugerowałoby przeżywalność tych bakterii poza swoistym gospodarzem [59]. Bakterię wykryto u kurczaków z objawami typowymi dla chlamydiozy (zapalenie spojówek, osłabienie) [59]. Zainfekowanie *P. acanthamoebae* hodowli makrofagów (BMDM – bone-marrow derived macrophages), powoduje ich stymulację poprzez receptor TLR2 i TLR4, do produkcji TNF α , IL-6 i IL-12 [61]. Natomiast *Neochlamydia* sp. – szczep UWC22, izolowano z ameb rodzaju *Acanthamoeba* występujących na soczewkach kontaktowych u osób z zapaleniem rogówki [31]. Nowo opisany gatunek *Pr. naegleriophila*, został wyizolowany jako endosymbiont ameb z rodzaju *Naegleria*, występujących w wodach słodkich [9]. Bakteria ta wykazuje około 70% podobieństwo genetyczne w rejonie 16S rRNA do bakterii z rzędu *Chlamydiales* oraz 91,1% podobieństwo do *P. acanthamoebae* [9]. Zarzek ten może być przyczyną zapalenia płuc u ludzi, jako że ma zdolność przeżywania w ludzkich makrofagach [36]. Stwierdzono ją także w próbach pochodzących z płukania pęcherzyków oskrzelowych u osób z zapaleniem płuc [9]. Do rodziny *Parachlamydiaceae* przypisano także „*Candidatus Metachlamydia lacustris*”, zidentyfikowany jako endosymbiont nowo opisanego gatunku ameb *Saccamoeba lacustris* [15]. Analiza genetyczna jego 16S rDNA, wykazała podobieństwo 99,4% do *P. acanthamoebae*, 93,9% do bakterii z rodzaju *Protochlamydia* i 93,5% do rodzaju *Neochlamydia* oraz poniżej 89% do innych „linii chlamydialnych” [15]. Cechą tego endosymbionta jest to, że tworzy typowe chlamydialne inkluzje, ale namnaża się jedynie w amebie *Saccamoeba lacustris*, a nie namnaża się w amebach z rodzaju *Acanthamoeba* [15]. Również do tej rodziny (*Parachlamydiaceae*) zaliczono dwa nowe fylotypy, oznaczone jako cvC7 i cvC15, otrzymane w próbach pochodzących odpowiednio z popłuczyn z nosa i płwociny człowieka [19].

Obydwa izolaty wykazują 93,8% podobieństwo sekwencji 16S rDNA wobec siebie oraz 93,5% (cvC15) i 95,3% (cvC7) do *P. acanthamoebae* [19]. Także do tej rodziny przypisano wyizolowany z osadu słonego jeziora Burton (Wschodnia Antarktyda), izolat Burton-46, wykazujący 92% podobieństwo do bakterii z rodziny *Parachlamydiaceae* [7], a także 88,7% do *W. chondrophila* [20]. Nadto Devereaux i wsp. [23] do tej rodziny przypisali także 9 nowych fylotypów (UKC1-9) zidentyfikowanych u koali w Australii. Bakterie te wykryto w populacji koali, u których w latach 1999–2000 wykazano oprócz zakażeń typowych dla *Chlamydophila* (*Cp.*) *pneumoniae* i *Cp. pecorum*, obecność materiału genetycznego tych nowych „chlamydii”, wykazujących podobieństwo do bakterii z rodziny *Parachlamydiaceae*. Warto również wspomnieć, że do *Parachlamydiaceae* zaklasyfikowano izolaty CRIB35, CRIB36 i CRIB37, zidentyfikowane odpowiednio w biofilmie i osadzie zbiornika wodnego oraz w amebach *Acanthamoeba* [14]. Izolaty te (CRIB35 i CRIB36) wykazują podobieństwo na poziomie 97,5–97,6% do *Pr. amoebophila* i 99,4–99,5% do *Pr. naegleriophila*, zaś izolat CRIB37 wykazuje podobieństwo rzędu 97,1% do *N. hartmannellae* i 99,8% do szczepu UWC22 *N. hartmannellae* [14].

3. Charakterystyka rodziny *Simkaniaceae*

Rodzinę *Simkaniaceae* (tab. I) tworzy obecnie rodzaj *Simkania* (S.) z jednym gatunkiem oraz rodzaj *Fritschea* z dwoma gatunkami. Poprzednio [58] należały tu także dwa gatunki *Rhabdochlamydia* (*R.*) *porcellionis* i *R. crassificans*, ale obecnie tworzą one nową rodzinę *Rhabdochlamydiaceae*. Rodzaje *Simkania* i *Fritschea* zostały opisane i scharakteryzowane w poprzedniej pracy [58]. Dodać należy, że zdolność do przenoszenia tej bakterii przez ameby potwierdzono, wprowadzając zakażone tą bakterią ameby *Acanthamoeba polyphaga* do hodowli monocytów i makrofagów ludzkich, w których stwierdzono po pewnym czasie *S. negevensis* [45]. Także obecnie do tej rodziny przypisano kłady cvE6 i cvE9, wyizolowane z wody świeżej, odpowiednio z Francji i Włoch, które wykazują 87,9–92,7% podobieństwo do bakterii z rodzaju *Simkania* [20]. Ponadto opisano fylotypy cvE38 i cvE41, zidentyfikowane w wodzie słodkiej, które wykazują 98% podobieństwo do kładu cvE9 z rodziny *Simkaniaceae*, co dowodzi, że można umieścić je także w tej rodzinie [18].

4. Charakterystyka rodziny *Rhabdochlamydiaceae*

Rodzinę tę tworzą bakterie wcześniej klasyfikowane do rodziny *Simkaniaceae*, czyli *R. porcellionis* i *R. crassificans* (tab. I). Po raz pierwszy izolowano je z ciał

owadów, a obecnie także identyfikuje się je metodami biologii molekularnej u pacjentów w pozaszpitalnym zapaleniu płuc [38] oraz wcześniaków z problemami ze strony układu oddechowego [53], choć także otrzymano je z przypadków poronień u bydła [67]. Do tej rodziny, oprócz opisanych dwóch gatunków *R. porcelionis* i *R. crassificans* [58], przypisano izolaty CRIB33 i CRIB34 otrzymane w Hiszpanii, odpowiednio z osadu ze zbiornika wodnego oraz z wody powierzchniowej [14]. Analiza genetyczna wykazała 89,0% (CRIB33) i 87,5% (CRIB34) podobieństwo do *R. crassificans* [14].

5. Charakterystyka rodziny *Waddliaceae*

Do rodziny *Waddliaceae* należy rodzaj *Waddlia* (W.) z dwoma gatunkami: *W. chondrophila* i *W. malasyensis* (tab. I), które scharakteryzowano poprzednio [58]. Dowiedziono, że *W. chondrophila* odpowiedzialna jest za ronienia u bydła [6, 24, 50], ale także może powodować ronienia u ludzi, co wykazano na podstawie występowania przeciwciał anti-*W. chondrophila* w teście immunofluorescencyjnym i western-blott u kobiet po poronieniach [3, 4]. Także metodą nested-PCR wykazano występowanie materiału genetycznego *W. chondrophila* u pacjentów z pozaszpitalnym zapaleniem płuc [38], zaś metodą PCR-HRM stwierdzono ją u kur [60]. Bakteria ta ma zdolność namnażania się w ludzkich makrofagach [32], powodując odpowiedź immunologiczną, manifestującą się słabą syntezą IL-1 β i IL-10 [34]. Wykazano także, że bakteria ta w hodowlach ameb *Acanthamoeba castellanii*, wykazuje wrażliwość na doksycylinę i azytromycynę [33]. Opisano także, że *W. chondrophila* charakteryzuje się nieco odmiennym cyklem replikacyjnym w ludzkich makrofagach, niż klasyczne chlamydie czy parachlamydie [22]. Dowiedziono, że wczesna inkluzja tych bakterii przemieszcza się поближе mitochondrium w komórce gospodarza oraz łączy się z kalneksyną – białkiem siateczki endoplazmatycznej, co pozwala na przetrwanie tych zarazków w komórkach gospodarza [22].

6. Charakterystyka rodziny *Piscichlamydiaceae*

Do tej rodziny przynależą bakterie izolowane z cyst skrzelowych łososi, dla których zaproponowano nazwę „*Candidatus Piscichlamydia salmonis*” [26], a opisano wcześniej jako bakterię należącą do chlamydii niesklasyfikowanych [58]. Bakteria ta wykazuje cykl życiowy z trzema formami (ciałko podstawowe EB, ciało siateczkowate RB i ciało pośrednie IB), a jej podobieństwo genetyczne do bakterii z rodziny *Parachlamydiaceae* wynosi 81–82% i 80% do bakterii z rodzaju *Chlamydomphila* [26].

7. Charakterystyka rodziny *Clavochlamydiaceae*

Do tej rodziny przynależy „*Candidatus Clavochlamydia salmonicola*” izolowany z cyst skrzelowych łososi norweskich oraz ze skrzelii łososi atlantyckich hodowanych w Irlandii (tab. I). Otrzymano je również u wolno żyjących łososi, które wykazywały objawy ze strony układu oddechowego, m.in. cysty skrzelii [49]. W badaniach tych wykazano w oparciu o analizę genu 16S rRNA, ponad 90% podobieństwo do bakterii z rzędu *Chlamydiales* [49]. Analiza filogenetyczna „umieściła” tę bakterię w rodzinie *Chlamydiaceae* i ECLVII [49], choć podobieństwo *Clavochlamydia salmonicola* na poziomie 81% do *Piscichlamydia salmonis*, pozwoliło na utworzenie nowej rodziny *Clavochlamydiaceae*.

8. Charakterystyka rodziny *Criblamydiaceae*

Do tej rodzinie zaklasyfikowano *Criblamydia sequanensis* (tab. I) wyizolowaną z wód Sekwany [66], choć także obecność materiału genetycznego tego zarazka stwierdzono w hodowli ameb *Acanthamoeba castellanii*. Analiza genetyczna polegająca na sekwencjonowaniu genów 16S rRNA, 16S rDNA, translokazy ADP/ATP i RnpB, wykazała 88,5–89,8% podobieństwo ich do przedstawicieli rodziny *Parachlamydiaceae*, 87,1–88,3% do bakterii z rodziny *Waddliaceae*, 86,2–85,6% do zarazków z rodziny *Chlamydiaceae* oraz 84,7–85,6% do mikroorganizmów z rodziny *Simkaniaceae*. Stąd oceniono, że nowa bakteria nie przynależy do żadnej z rodzin, ale cechuje ją podobieństwo do zarazków z rzędu *Chlamydiales* i zaproponowano utworzenie nowej rodziny *Criblamydiaceae* fam. nov. [66]. Bakteria ta charakteryzuje się tym, że posiada cykl życiowy z dwiema formami morfologicznymi: ciałkiem EB o kształcie gwiazdzystym i ciałkiem RB. Próby hodowli tego zarazka w liniach tkankowych Vero, HEL, Hep-2 i A549, dały wynik negatywny, ale wykazano możliwość reinfekcji kultur ameb supernatantem z tych hodowli [66]. Również do tej rodziny przynależy *Estrella lausannensis*, wyizolowana w wody gruntowej w Hiszpanii i oznaczona pierwotnie jako CRIB30 [14], a która wykazuje podobieństwo, zarówno morfologiczne jak i genetyczne, we fragmencie 16S rDNA, do *Criblamydia sequanensis*, które wynosi 93% [14].

9. Charakterystyka niesklasyfikowanych chlamydii środowiskowych

W obrębie rzędu *Chlamydiales*, oprócz 8 rodzin, to jest *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Waddliaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Clavochlamydiaceae* i *Criblamydiaceae*, znajdują

się inne bakterie wewnątrzkomórkowe, które jeszcze nie zostały całkowicie sklasyfikowane (tab. I). Do tej grupy został przypisany jeszcze nie nazwany endosymbiont wyizolowany z komórek gastrodermy bezkręgowca *Xenoturbella* [43], który na podstawie analiz 16S i 23S rRNA, wykazuje podobieństwo do rodzaju *Fritschea* i do rodzaju *Simkania*. Jest to forma pleomorficzna, posiadająca spłaszczone dyskoidalne ciało elementarne, owalne lub kształtu muchy, w przekroju poprzecznym oraz sferyczne, wielokątne lub nieregularne ciało siateczkowate. Podobnie jak u wszystkich chlamydii nie zauważa się efektu cytopatycznego w hodowli [43]. Do tej grupy zalicza się także chlamydiopodobną bakterię wyizolowaną z naskórka białych krewetek pacyficznych (*Litopenaeus vannamei*) [44], która charakteryzuje się pleomorfizmem dwóch stadiów rozwojowych, ciała EB jak i ciała RB, bo są albo sferyczne albo owalne i obie formy mogą występować jako małe lub duże komórki [44]. Podkreślić należy, że nie wykazano obecności tej bakterii poza naskórkiem, co potwierdzałoby tropizm tych zarazków do komórek nabłonkowych [44]. W tej grupie niesklasyfikowanych chlamydii znalazł się także izolat Taynaya-24, otrzymany z osadu słonego jeziora z terenu Wschodniej Antarktydy [7]. Wykazuje on 87,9% podobieństwo do izolatu cvE6 należącego do rodziny *Simkaniaceae* [19]. Ponieważ oba nie reagowały ze starterami specyficznymi dla *S. negevensis*, sugeruje się, że stanowią one osobną linię. Również do niesklasyfikowanych chlamydii środowiskowych, należą bakterie zidentyfikowane genetycznie w cystach nabłonkowych skrzeli pławikonika australijskiego (CRG20) i okonia srebrzystego (CRG18) oraz z cyst skrzeli i skóry baramundi (CRG98) [55]. Analiza filogenetyczna wykazała, że nie należą one do rodzin w rzędzie *Chlamydiales*, a grupują się odpowiednio CRG20 z *R. porcellionis*, CRG18 z endosymbiontami ameb TUME1 i UWC22, zaś CRG98 tworzy odrębną linię, pomiędzy liniami z *Piscichlamydia salmonis* i *R. porcellionis* [55]. Także do chlamydii środowiskowych, przynależy otrzymany z biofilmu ze zbiornika wody w Hiszpanii izolat CRIB32 [14], który tworzy osobną linię w analizie genetycznej i wykazuje 85,6–88,7% podobieństwo do innych bakterii z rzędu *Chlamydiales* [14].

10. Podsumowanie

Z przedstawionych faktów wynika, że chlamydie środowiskowe są mikroorganizmami powszechnie występującymi w środowisku, zarówno wodnym jako endosymbionty ameb, krewetek czy ryb, ale także lądowym, gdyż stwierdza się je u owadów i ssaków. Wśród nich są bakterie patogenne dla człowieka, izolowane głównie ze schorzeń układu oddechowego i są to *Parachlamydia acanthamoebae*, *Protochlamydia naegleriophila* i *Simka-*

nia negevensis lub z przypadków poronień u kobiet i jest to *Waddlia chondrophila*. Bakterie te izolowano nie tylko od ssaków (bydło, koty), ale także od gadów (np. węże, żółwie, jaszczurki). Wykazują też zdolność do infekowania takich komórek jak monocyty/makrofagi. Fakty te, czyli powszechne występowanie ich w środowisku oraz potencjał chorobotwórczy, dowodzi konieczności przybliżania ich biologii, gdyż stają się one nowymi patogenami dla ssaków, w tym człowieka.

Piśmiennictwo

1. Amman R., Springer N., Schonhuber W., Ludwig W., Schmid E.N., Muller K.D., Michel R.: Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp. *Appl. Environment. Microbiol.* **63**, 115–121 (1997)
2. Baud D., Goy G., Gerber S., Vial Y., Hohlfeld P., Greub G.: Evidence of maternal-fetal transmission of *Parachlamydia acanthamoebae*. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 120–121 (2009)
3. Baud D., Thomas V., Arafa A., Regan L., Greub G.: *Waddlia chondrophila*, a potential agent of human fetal death. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1239–1243 (2007)
4. Bavoil P., Stephens R.S., Falkow S.A.: A soluble 60 kilodalton antigen of *Chlamydia* spp. is a homologue of *Escherichia coli* GroEL. *Mol. Microbiol.* **4**, 461–469 (1990)
5. Birtles R.J., Rowbotham T.J., Storey C., Marrie T.J., Raoult D.: Chlamydia-like obligate parasite of free – living amoeba. *Lancet*, **349**, 925–926 (1997)
6. Borel N., Ruhl S., Casson N., Kaiser C., Pospischil A., Greub G.: *Parachlamydia* spp. and related Chlamydia-like organisms and bovine abortion. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 1904–1907 (2007)
7. Bowman J.P., Rea S.M., McCammon S.A., McMeekin T.A.: Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic basin, Vestfold Hills, Eastern Antarctica. *Environment. Microbiol.* **2**, 227–237 (2000)
8. Casson N., Entenza J.M., Borel N., Pospischil A., Greub G.: Murine model of pneumonia caused by *Parachlamydia acanthamoebae*. *Microb. Pathog.* **45**, 92–97 (2008)
9. Casson N., Michel R., Müller K.-D., Aubert J.D., Greub G.: *Protochlamydia naegleriophila* as etiologic agent of pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 168–172 (2008)
10. Chua P.K.B., Corkill J.E., Hooi P.S., Cheng S.C., Winstanley C., Hart C. A.: Isolation of *Waddlia malaysiensis*, a novel intracellular bacterium, from fruit bat (*Eonycteris spelaea*). *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 271–277 (2005)
11. Collingro A., Poppert S., Heinz E., Schmitz-Esser S., Essig A., Schweikert M., Wagner M., Horn M.: Recovery of an environmental sludge by co-cultivation with *Acanthamoeba* sp. *Microbiology*, **151**, 301–309 (2005)
12. Collingro A., Toenshoff E.R., Taylor M.W., Fritsche T.R., Wagner M., Horn M.: 'Candidatus Protochlamydia amoebophila' an endosymbiont of *Acanthamoeba* spp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1863–1866 (2005)
13. Contini C., Seraceni S., Cultrera R., Castellazzi M., Granieri E., Fainardi E.: Molecular detection of *Parachlamydia*-like organisms in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **14**, 564–566 (2008)
14. Corsaro D., Feroldi V., Saucedo G., Ribas F., Loret J.-F., Greub G.: Novel *Chlamydiales* strains isolated from a water treatment plant. *Environ. Microbiol.* **11**, 188–200 (2009)

15. Corsaro D., Michel R., Walochnik J., Müller K.-D., Greub G.: *Saccamoeba lacustris*, sp. nov., (Amoebozoa: Lobosea: Hartmannellidae), a new lobose amoeba, parasitized by novel Chlamydia 'Candidatus Metachlamydia lacustris' (Chlamydiae: Parachlamydiaceae). *Eur. J. Protistol.* **46**, 86–95 (2010)
16. Corsaro D., Thomas V., Goy G., Venditti D., Radek R., Greub G.: 'Candidatus Rhabdochlamydia crassificans', an intracellular bacterial pathogen of the cockroach *Blatta orientalis* (Insecta: Blattodea). *Syst. Appl. Microbiol.* **30**, 221–228 (2007)
17. Corsaro D., Venditti D.: Emerging Chlamydial infections. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**, 75–106 (2004)
18. Corsaro D., Venditti D.: Detection of Chlamydiae from freshwater environments by PCR, amoeba coculture and mixed coculture. *Res. Microbiol.* **160**, 547–552 (2009)
19. Corsaro D., Venditti D., Valassina M.: New parachlamydial 16S rDNA phylotypes detected in human clinical samples. *Res. Microbiol.* **153**, 563–567 (2002)
20. Corsaro D., Venditti D., Valassina M.: New chlamydial lineages from freshwater samples. *Microbiology*, **148**, 343–344 (2002)
21. Crespo S., Zarza C., Padros F., Marin de Mateo M.: Epitheliocystis agents in sea bream *Sparus aurata*: morphological evidence for two distinct chlamydia-like developmental cycles. *Dis. Aquat. Org.* **37**, 61–72 (1999)
22. Croxatto A., Greub G.: Early intracellular trafficking of *Waddlia chondrophila* in human macrophages. *Microbiology*, **156**, 340–355 (2010)
23. Devereaux L.N., Polkinghorne A., Meijer A., Timms P.: Molecular evidence for novel chlamydial infections in the koala (*Phascogaleus cinereus*). *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 245–253 (2003)
24. Dilbeck P.M., Evermann J.F., Crawford T.B., Ward A.C.S., Leathers C.W., Holland C.J., Mebus C.A., Logan L.L., Rurangirwa F.R., McGuire T.C.: Isolation of a previously undescribed rickettsia from an aborted bovine fetus. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 814–816 (1990)
25. Dilbeck-Robertson P., McAllister M.M., Bradway D., Evermann J.F.: Results of a new serologic test suggest an association of *Waddlia chondrophila* with bovine abortion. *J. Vet. Diagn. Invest.* **15**, 468–469 (2003)
26. Draghi A., Popov V.L., Kahl M.M., Stanton J.B., Brown C.C., Tsongalis G.J., West A.B., Frasca S.: Characterization of 'Candidatus Piscichlamydia salmonis' (order Chlamydiales), a chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5286–5297 (2004)
27. Everett K.D.: Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. *Vet. Microbiol.* **75**, 109–126 (2000)
28. Everett K.D.E., Andersen A.A., Planut M., Hatch T.P.: Cloning and sequence analysis of the major outer membrane protein gene of *Ch. psittaci* 6BC. *Infect. Immun.* **59**, 2853–2855 (1991)
29. Everett K.D., Bush R.M., Andersen A.A.: Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 415–440 (1999)
30. Everett K.D.E., Thao M.L., Horn M., Dyszynski G.E., Baumann P.: Novel chlamydiae in whiteflies and scale insects: endosymbionts 'Candidatus Fritschea bemisiae' strain Falk and 'Candidatus Fritschea eriococci' strain Elm. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 1581–1587 (2005)
31. Fritsche T.R., Horn M., Wagner M., Herwig R.P., Schleifer K.-H., Gautam R.K.: Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environm. Microbiol.* **66**, 2613–2619 (2000)
32. Goy G., Croxatto A., Greub G.: *Waddlia chondrophila* enters and multiplies within human macrophages. *Microbes Infect.* **10**, 556–562 (2008)
33. Goy G., Greub G.: Antibiotic susceptibility of *Waddlia chondrophila* in *Acanthamoeba castellanii* amoebae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2663–2666 (2009)
34. Greub G., Desnues B., Raoult D., Mege J.-M.: Lack of microbicidal response in human macrophages infected with *Parachlamydia acanthamoebae*. *Microbes Infect.* **7**, 714–719 (2005)
35. Greub G., Hartung O., Adekambi T., Alimi Y.S., Raoult D.: Chlamydia-like organisms and atherosclerosis. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 705–706 (2006)
36. Greub G., Mege J.L., Raoult D.: *Parachlamydia acanthamoeba* enters and multiplies within human macrophages and induces their apoptosis. *Infect. Immun.* **71**, 5979–5985 (2003)
37. Greub G., Raoult D.: *Parachlamydiaceae*: potential emerging pathogens. *Emerg. Inf. Dis.* **8**, 625–630 (2002)
38. Haider S., Collingro A., Walochnik J., Wagner M., Horn M.: Chlamydia-like bacteria in respiratory samples of community-acquired pneumonia patients. *FEMS Microbiol. Lett.* **281**, 198–202 (2008)
39. Henning K., Schares G., Granzow H., Polster U., Hartmann M., Hotzel H., Sachse K., Peters M., Rauser M.: *Neospora caninum* and *Waddlia chondrophila* strain 2032/99 in a septic stillborn calf. *Vet. Microbiol.* **85**, 285–292 (2002)
40. Holt J.G. i wsp. (red.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore 1988.
41. Horn M., Wagner M.: Evidence for additional genus-level diversity of Chlamydiales in the environment. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 71–74 (2001)
42. Horn M., Wagner M., Müller K.-D., Schmid E.N., Fritsche T.R., Schleifer K.-H., Michel R.: *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology*, **146**, 1231–1239 (2000)
43. Israelsson O.: Chlamydial symbionts in the enigmatic *Xenoturbella* (Deuterostomia). *J. Invertebr. Pathol.* **96**, 213–220 (2007)
44. Jimenez R., Barniol R., de Barniol L., Machuca M.: A dual infection by infectious cuticular epithelial necrosis virus and a Chlamydia-like organism in cultured *Litopenaeus vannamei* (Boone) in Ecuador. *Aquacult. Res.* **32**, 875–883 (2001)
45. Kahane S., Dvoskin B., Friedman M.G.: The role of monocyte/macrophages as vehicles of dissemination of *Simkania negevensis*: an in vitro simulation model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**, 219–227 (2008)
46. Kahane S., Gonen R., Sayada C., Elion J., Friedman M.G.: Description and partial characterization of a new chlamydia-like microorganism. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**, 329–334 (1993)
47. Kahane S., Kimmel N., Friedmann M.G.: The growth cycle of *Simkania negevensis*. *Microbiology*, **148**, 735–742 (2002)
48. Kahane S., Metzger E., Friedman M.G.: Evidence that the novel microorganism „Z” may belong to a new genus in the family Chlamydiaceae. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, 203–208 (1995)
49. Karlsen M., Nylund A., Watanabe K., Helvik J.V., Nylund S., Plarre H.: Characterization of 'Candidatus Clavochlamydia salmonicola': an intracellular bacterium infecting salmonid fish. *Environ. Microbiol.* **10**, 208–218 (2007)
50. Kocan K.M., Crawford T.B., Dilbeck P.M., Evermann J.F., McGuire T.C.: Development of a rickettsia isolated from an aborted bovine fetus. *J. Bacteriol.* **172**, 5949–5955 (1990)
51. Kostanjsek R., Strus J., Drobne D., Avgustin G.: 'Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis', an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 543–549 (2004)

52. Krieg N.R., Ludwig W., Whitman W.B., Hedlund B.P., Paster B.J., Staley J.T., Ward N., Brown D., Parte A (eds.): Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 4. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. 2nd ed., Springer Verlag, Nowy Jork 2011
53. Lamothe F., Aebi S., Schneider A., Jatton-Ogay K., Vaudaux B., Greub G.: *Parachlamydia* and *Rhabdochlamydia* in premature neonates. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 2072–2075 (2009)
54. Marrie T.J., Raoul D., la Scola B., Birtles R.J., de Carolis E.: *Legionella*-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. *Emerg. Inf. Dis.* **7**, 1026–1029 (2001)
55. Meijer A., Roholl P.J.M., Ossewaarde J.M., Jones B., Nowak B.F.: Molecular evidence for association of *Chlamydiales* bacteria with epitheliocystis in leafy seadragon (*Phycodurus eques*), silver perch (*Bidyanus bidyanus*), and barramundi (*Lates calcarifer*). *Appl. Environment. Microbiol.* **72**, 284–290 (2006)
56. Mitchell S.O., Steinum T., Rodger H., Holland C., Falk K., Colquhoun D.J.: Epitheliocystis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., farmed in Ireland is associated with 'Candidatus Clavochlamydia salmonicola' infection. *J. Fish Dis.* **33**, 665–673 (2010)
57. Nylund A., Kvenseth A.M., Isdal E.: A morphological study of the epitheliocystis agent in farmed Atlantic salmon. *J. Aquat. Anim. Health.* **10**, 43–55 (1998)
58. Pawlikowska M., Deptuła W.: Chlamydie środowiskowe – nowe patogeny człowieka i zwierząt. *Post. Mikrobiol.* **46**, 59–67 (2007)
59. Richter M., Mathies F., Gönchi E., Aebi S., Spiess B., Greub G.: *Parachlamydia acanthamoebae* in domestic cats with or without corneal disease. *Vet. Ophthalmol.* **13**, 235–237 (2010)
60. Robertson T., Bibby S., O'Rourke D., Belifore T., Agnew-Crumpton R., Noormohammadi A.H.: Identification of chlamydial species in crocodiles and chickens by PCR-HRM curve analysis. *Vet. Microbiol.* **145**, 373–379 (2010)
61. Roger T., Casson N., Croxatto A., Entenza J.M., Pusztaszeri M., Akira S., Reymond M.K., Le Roy D., Calandra T., Greub G.: Role of MyD88 and Toll-like Receptors 2 and 4 in the sensing of *Parachlamydia acanthamoebae*. *Infect. Immun.* **78**, 5195–5201 (2010)
62. Ruhl S., Goy G., Casson N., Thoma R., Pospischil A., Greub G., Borel N.: *Parachlamydia acanthamoebae* infection and abortion in small ruminants. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1966–1968 (2008)
63. Rurangirwa F.R., Dilbeck P.M., Crawford T.B., McGuire T.C., McElwain T.F.: Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86–1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order *Chlamydiales*: proposal of *Waddlia* fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 577–581 (1999)
64. Soldati G., Zu Z.H., Vaughan L., Polkinghorne A., Zimmermann D.R., Huder J.B., Pospischil A.: Detection of Mycobacteria and Chlamydiae in granulomatous inflammation of reptiles: a retrospective study. *Vet. Pathol.* **41**, 388–397 (2004)
65. Thao M.-L., Baumann L., Hess J.M., Falk B.W., Ng J.C.K., Gullan Baumann P.: Phylogenetic evidence for two new insect-associated chlamydia of the family *Simkaniaceae*. *Curr. Microbiol.* **47**, 46–50 (2003)
66. Thomas V., Casson N., Greub G.: *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular *Chlamydiales* isolated from Seine river water using amoebal co-culture. *Environ. Microbiol.* **8**, 2125–2136 (2006)
67. Wheelhouse N., Katzer F., Wright F., Longbottom D.: Novel Chlamydia-like organisms as cause of bovine abortions, UK. *Emerg. Inf. Dis.* **16**, 1323–1324 (2010)

SPIS TREŚCI

W. Małek, S. Wdowiak-Wróbel, M. Targońska, M. Kalita, S. Gnat – Osmoadaptacja i systemy transportu potasu w bakteriach Gram-ujemnych	93
I. Stefańska, T. Dzieciatkowski, G. Młynarczyk – Zakażenia ortomyksowirusami u osób z zaburzeniami odporności	99
M. Piotrowska – Wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania mikotoksyn z żywności i pasz	109
M. Staniszevska, M. Bondaryk, K. Siennicka, J. Piłat, M. Schaller, W. Kurzątkowski – Rola proteazy aspartylowej w wirulencji <i>Candida albicans</i> . Część I. Specyficzność substratowa proteazy aspartylowej a patogenez zakażeń <i>Candida albicans</i>	121
M. Staniszevska, M. Bondaryk, K. Siennicka, J. Piłat, M. Schaller, W. Kurzątkowski – Rola proteazy aspartylowej w wirulencji <i>Candida albicans</i> . Część II: Ekspresja <i>SAP1-10</i> proteazy aspartylowej podczas zakażeń <i>Candida albicans in vivo</i>	127
K. Kowalkowska, A. Okulewicz – Współzależności między florą jelitową i pasożytami gryzoni	137
M. Pawlikowska, W. Deptuła – Chlamydie środowiskowe – nowe dane	143

CONTENTS

W. Małek, S. Wdowiak-Wróbel, M. Targońska, M. Kalita, S. Gnat – Osmoadaptation and potassium transport systems in Gram-negative bacteria	93
I. Stefańska, T. Dzieciatkowski, G. Młynarczyk – Infections with orthomyxoviruses in patients with immunological disorders	99
M. Piotrowska – Using of microorganisms for mycotoxin removal from food and feed	109
M. Staniszevska, M. Bondaryk, K. Siennicka, J. Piłat, M. Schaller, W. Kurzątkowski – Role of aspartic proteinases in <i>Candida albicans</i> virulence. Part I. Substrate specificity of aspartic proteinases and <i>Candida albicans</i> pathogenesis	121
M. Staniszevska, M. Bondaryk, K. Siennicka, J. Piłat, M. Schaller, W. Kurzątkowski – Role of aspartic proteinases in <i>Candida albicans</i> virulence. Part II: Expression of <i>SAP1-10</i> aspartic proteinase during <i>Candida albicans</i> infections <i>in vivo</i>	127
K. Kowalkowska, A. Okulewicz – Interactions between intestinal microflora and parasites of rodents	137
M. Pawlikowska, W. Deptuła – Environmental chlamydiae – new data	143