

Kwartalnik

Tom 51

Zeszyt 4•2012

PAŹDZIERNIK – GRUDZIEŃ

CODEN:

PMKMAV 51 (4)

2012

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Index Copernicus ICV = 9,52 (2012)

Impact Factor ISI = 0,151 (2012)

Punktacja MNiSW = 15,00 (2012)

<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

JACEK BIELECKI (redaktor naczelny), JERZY HREBENDA (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 04, fax (22) 554 14 04
e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl; j.hrebenda@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 13 arkuszy wyd., Papier offset 90 g

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



Prof. dr hab. Zygmunt Sidorczyk
Emerytowany profesor zwyczajny
Uniwersytetu Łódzkiego

1940–2012

Prof. dr hab. Zygmunt Sidorczyk – biochemik, mikrobiolog, specjalista w zakresie immunochemii bakterii zmarł 26 sierpnia 2012 r. w Łodzi. Był osobą zasłużoną dla rozwoju mikrobiologii polskiej, w szczególności łódzkiego ośrodka mikrobiologicznego.

Profesor Zygmunt Sidorczyk urodził się w 1940 r. w Czyżewicach na wschodnich terenach Polski, w jej granicach sprzed II Wojny Światowej. Po wojnie Jego rodzina osiadła w Swędowie na ziemi łódzkiej. Uczył się w Szkole Podstawowej w Swędowie i Liceum Ogólnokształcącym w Zgierzu. Studia biologiczne na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Łódzkiego w zakresie biochemii ukończył w 1964 r., uzyskując tytuł magistra. W tym samym roku rozpoczął pracę jako asystent w Zakładzie Mikrobiologii Ogólnej w Instytucie Mikrobiologii UŁ. Stopień doktora uzyskał w roku 1972, pod opieką promotorską prof. dr hab. Krystyny Kotelko. Habilitował się w roku 1981, a tytuł profesora otrzymał w roku 1992. Odbył kilka staży naukowych w Instytucie Immunobiologii im. Maxa Plancka we Freiburgu w Niemczech, a następnie w Forschungszentrum Borstel w Niemczech. Współpracował także z Instytutem Chemii

Organicznej Rosyjskiej Akademii Nauk w Moskwie. Wizytował też inne zagraniczne ośrodki naukowe.

Interesował się strukturą chemiczną i swoistością antygenową lipopolisacharydu (LPS, endotoksyny) uropatogennych bakterii z rodzaju *Proteus*, a zwłaszcza *Proteus penneri*, bakteriom którym z zespołem badawczym poświęcił najwięcej uwagi. Jego badania przyczyniły się do poznania struktury chemicznej wszystkich regionów LPS pałeczek *Proteus*: części O-swoistej, rdzenia i lipidu A. Zajmował się też z zespołem swoistością serologiczną antygeny O i regionu rdzeniowego LPS tych bakterii. Bogaty dorobek naukowy Profesora Zygmunta Sidorczyka obejmuje ponad 100 publikacji prac doświadczalnych oraz artykułów przeglądowych i współautorstwo podręcznika akademickiego. Kierował 7 grantami finansowanymi z Komitetu Badań Naukowych. Wypromował 7 doktorów i ponad 80 magistrów mikrobiologii. Recenzował ponad 30 prac doktorskich, był też recenzentem w kilkunastu przewodach habilitacyjnych i postępowaniach profesorskich.

Od 1990 r. do przejścia na emeryturę w roku 2000 kierował Zakładem Mikrobiologii Ogólnej. Już jako adiunkt wykładał mikrobiologię ogólną, a później jako docent i profesor także mikrobiologię środowiskową dla studentów biologii, specjalności mikrobiologicznej. Prowadził też specjalistyczne wykłady monograficzne z immunochemii drobnoustrojów oraz proseminaria i seminaria dla studentów mikrobiologii.

Prof. dr hab. Z. Sidorczyk pełnił też szereg funkcji organizacyjnych. W latach 1984–1991 był Zastępcą Dyrektora, a w latach 1991–1996 Dyrektorem Instytutu Mikrobiologii UŁ, w latach 1996–2003 V-ce Przewodniczącym Komitetu Mikrobiologii PAN, a w latach 1999–2003 V-ce Przewodniczącym Rady Naukowej Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi. Był członkiem International Endotoxin Society i Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów. Za swą działalność był m.in. wyróżniony Medalem Komisji Edukacji Narodowej, Złotym Krzyżem Zasługi i Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski, a także nagrodami Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Sekretarza Naukowego PAN i Rektora UŁ.

Odszedł naukowiec, którego wyniki badań znacząco rozszerzyły naszą wiedzę o endotoksynach bakterii, ich strukturze i swoistości serologicznej. Jego osiągnięcia badawcze i organizacyjne przyczyniły się do ugruntowania wysokiej pozycji mikrobiologii nie tylko w Polsce, ale dzięki współpracy Zmarłego z ośrodkami zagranicznymi, także poza naszym Krajem.

Pozostanie w naszej pamięci na zawsze!

Antoni Różalski

Joanna Olszewska¹, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynica^{1*}

¹Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego
02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

Wpłynęło w kwietniu 2012 r.

1. Wstęp. 2. HMP – ogólna charakterystyka. 3. Mikroflora jelit. 3.1. Różnorodność taksonomiczna mikroflory jelit człowieka. 3.2. „Core microbiome” jelit. 3.3. Zmiany mikroflory jelit w zależności od wieku. 3.4. Wpływ diety i genotypu gospodarza na różnorodność mikroflory jelit. 3.5. Wybrane funkcje mikroflory jelit. 3.6. Mikroflora jelit człowieka a choroby. 3.6.1. Nowotwory. 3.6.2. Otyłość. 4. Podsumowanie

Human Microbiome Project – influence of gut microbiota on human physiology and health

Abstract: The HMP (Human Microbiome Project) is one of several international projects which use metagenomic analysis to study human health. The HMP is a logical conceptual and experimental extension of Human Genome Project. The first part of the review presents general characteristic of the project, its goals and implementation phases.

The gastrointestinal tract microbiota is extremely dense and diverse. Microbiota genes encode many biochemical pathways that humans have not evolved. Gut microbiota composition is influenced by human age, diet and genotype and its shifts are associated with many diseases. This review summarizes the latest research concerning the association of gut microbial ecology with the mechanisms by which microbes in the gut may mediate host physiology and metabolism in the context of obesity and cancer.

1. Introduction. 2. HMP – general characteristic. 3. Gut microbiota. 3.1. Microbial diversity of the human gut microbiota. 3.2. Gastrointestinal tract core microbiome. 3.3. Intestinal microbiota composition over human life. 3.4. Influence of diet and human genotype on gut microbiota. 3.5. Selected activities of gut microbiota. 3.6. Gut microbiota and diseases. 3.6.1. Cancer. 3.6.2. Obesity. 4. Summary

Słowa kluczowe: HMP (Human Microbiome Project), mikrobiom jelit, nowotwory, otyłość

Key words: HMP (Human Microbiome Project), gut microbiota, cancer, obesity

1. Wstęp

Przed ukończeniem realizacji projektu HGP (Human Genome Project), niektórzy badacze przewidywali identyfikację około 100 000 genów w genomie człowieka. Zaskoczeniem okazał się fakt, że genom ludzki zawiera tylko ok. 20 000 kodujących białka genów, co nie różni go zbyt wiele od genomu muszki owocowej. Jeżeli jednak rozszerzymy nieco nasze spojrzenie na ludzki organizm, okaże się, że liczba 100 000 genów to o wiele za mało, aby go scharakteryzować [86]. Wynika to z faktu, że ciało dorosłego, zdrowego człowieka jest środowiskiem życia dla co najmniej 10 razy więcej komórek bakterii niż naszych własnych, a większość z nich zasiedla nasz przewód pokarmowy, głównie jelito (10^{13} – 10^{14} komórek bakterii i archeonów) [1, 79], nie wspominając już o związanych z nimi bakteriofagach, których liczbę szacuje się na rząd wielkości wyższą niż liczba bakterii [1].

Jeżeli rozpatrywalibyśmy organizm człowieka jako połączenie komórek ludzkich i mikroorganizmów, genom jako sumę ludzkich genów i genów mikroorganizmów, a wypadkowe właściwości metabolizmu jako mieszanek cech metabolizmu człowieka i mikroorganizmów zasiedlających go, wyłoni się nam obraz

człowieka stanowiącego spójnie funkcjonujący „super-organizm”, gdzie mikroorganizmy nadają mu cechy, których sam nie byłby w stanie rozwinąć [29, 86]. Jeszcze przed zakończeniem realizacji Human Genome Project zdawano sobie sprawę z tego faktu i postulowano, że chociaż zsekwencjonowanie genomu ludzkiego będzie ogromnym osiągnięciem biologii, nie będzie kompletne, dopóki nie zrozumiemy synergistycznych powiązań pomiędzy człowiekiem a mikroorganizmami zasiedlającymi nasz organizm [11]. Wiedząc, jak słabo poznana jest nasza endogenna flora bakteryjna, sugerowano wtedy stworzenie „second human genome project” zakładającego zsekwencjonowanie genomów mikroorganizmów z czterech istotnych miejsc bytowania drobnoustrojów w ciele człowieka: jamy ustnej, jelita, pochwy i skóry. Realizacja takiego projektu miałaby pomóc w wypełnieniu kluczowej luki w zrozumieniu ewolucji, rozwoju, funkcji układu immunologicznego i chorób człowieka [74, 75].

Dzięki staraniom wielu wybitnych naukowców świadomych potrzeby wnikliwego zbadania mikroflory człowieka, w 2007 roku został zainicjowany Human Microbiome Project – ogólnoswiatowa inicjatywa mająca na celu poznanie genomów mikroorganizmów jako

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

składników genomu człowieka, kształtujących jego metabolizm i ich wpływu na procesy fizjologiczne oraz predispozycje do zapadalności na różne choroby [86].

Pojęcie mikrobiomu człowieka zostało po raz pierwszy zaproponowane przez J. Lederberga w 2001 roku, dla opisanego ekologicznej społeczności komensalnych, symbiotycznych i patogennych mikroorganizmów, które w dosłownym sensie dzielą naszą przestrzeń życiową [52]. Jednak dziś, zgodnie z pierwszym oficjalnie wydanym opisem założeń HMP, termin ten częściej stosuje się w odniesieniu do wszystkich genomów mikroorganizmów żyjących w i na ciele człowieka, samemu zaś zespołowi tych mikroorganizmów nadając pojęcie „mikrobiota” [86, 93]. Co zrozumiałe, na początku większość badań była skoncentrowana na analizie mikroorganizmów chorobotwórczych, mniej z nich dotyczyło korzyści wynikających z obecności niepatogennej mikroflory w ludzkich organizmach [72]. Jednak dość szybko zaczęto uświadamiać sobie, że nie wszystkie oddziaływania pomiędzy mikroorganizmami a człowiekiem doprowadzają do powstawania chorób, że nasze organizmy są zamieszkiwane przez wiele komensalnych mikroorganizmów, które często nie tylko nie wywołują chorób, ale nawet przynoszą nam widoczne korzyści [13]. Przykładem interesującego podejścia z początku XX wieku do mikroflory człowieka może być działalność Arthura I. Kenna, który już w 1909 r., czyli ponad 100 lat temu, w *Journal of Biological Chemistry* opublikował artykuł *Some observations on the study of the intestinal bacteria*, w którym koncentruje się na analizie wpływu diety na naszą mikroflorę i efektach jakie ta mikroflora wywiera na zdrowie człowieka [1]. Również laureat Nagrody Nobla z 1908 roku, Elie Metchnikoff, w artykule *Prolongation of life: optimistic studies* postulował, że pewne bakterie mogą polepszać stan zdrowia gospodarza [9]. Co istotne, prace tak dawne jak m.in. ta autorstwa Kenna zawierały wiele pytań, które dziś nadal są aktualne i próbuje się je wyjaśnić poprzez realizację zadań HMP.

Korzystne zależności oddziaływań pomiędzy mikroorganizmami a gospodarzem były badane przez ponad wiek, ale dopiero odkrycia biologii molekularnej umożliwiły dokładniejsze zrozumienie problemu. Należy pamiętać, że większość naszej dotychczasowej wiedzy opierała się na badaniach mikroorganizmów, które potrafiliśmy hodować. Ocenia się, że nawet 20–80% mikroorganizmów związanych z człowiekiem (w zależności od miejsca bytowania w organizmie człowieka), nie jesteśmy w stanie wyhodować, co prawdopodobnie skutkuje niedocenianiem znaczenia ich różnorodności [18, 72].

Początkowe próby określenia liczby i filogenetycznego pokrewieństwa mikroorganizmów człowieka polegały na analizie stosunkowo dobrze konserwowanej sekwencji nukleotydowej 16S rRNA w preparatach pochodzących z mieszaniny organizmów [72]. Przez długi czas, do peł-

nego scharakteryzowania ich biologicznej i genetycznej natury, były konieczne czyste kultury bakterii, a analizy 16S rRNA pozwalały jedynie na ujawnienie obecności tych niezdolnych do wzrostu *in vitro* mikroorganizmów, nie zapewniając informacji o funkcjonowaniu ich społeczności. Aktualnie poza analizami 16S rRNA bada się złożoność próbek na drodze sekwencjonowania materiału genetycznego uzyskanego bezpośrednio ze środowiska. To podejście jest nazywane „metagenomiką”. Termin metagenomika został zaproponowany przez prof. J. Handelsmana w roku 1998 [31].

Już teraz wiadomo, że ogromną rolę w przyszłych badaniach odegrają, oprócz metagenomiki, również badania mRNA (metatranskryptomika), białek (metaproteomika) i sieci metabolicznych (metainteraktomika), gdyż sama metagenomika nie zapewnia bezpośrednich informacji o tym, które geny są w danych warunkach funkcjonalne [86].

2. HMP – ogólna charakterystyka

Wcześniejsze badania analizujące mikroflorę człowieka stały się inspiracją do rozpoczęcia przedsięwzięć realizowanych na dużo większą skalę. W listopadzie 2005 roku w Paryżu odbyło się międzynarodowe spotkanie zorganizowane przez French National Institute for Agricultural Research (INRA), które zaowocowało podjęciem decyzji o utworzeniu Human Intestinal Metagenome Initiative (HIMI), w celu dokładniejszego poznania wpływu mikroflory jelitowej człowieka na nasze zdrowie i choroby, oraz zaleceniem powołania International Human Microbiome Consortium (IHMC), aby gromadzić wyniki badań płynących z laboratoriów całego świata (<http://human-microbiome.org/>). W niedługo potem, miała miejsce dyskusja na temat zalet powstania sponsorowanego przez NIH (The National Institutes of Health, a part of the U.S. Department of Health and Human Services) Human Microbiome Project (HMP), który miałby zająć się tematem mikroflory człowieka nieco szerzej – uwzględniając nie tylko mikroorganizmy kolonizujące jelito, ale też inne nisze ekologiczne, takie jak: jama ustna, układ moczowo-płciowy (śluzówka pochwy), skóra oraz układ oddechowy (śluzówka jamy nosowej).

Zainicjowany w 2007 roku HMP jest 5-letnim projektem, realizowanym z dużym nakładem finansowym, którego głównym celem jest wykonanie charakterystyki mikroflory człowieka w stopniu, który umożliwi badanie jej zmian w odniesieniu do populacji, genotypu, stanu zdrowia, wieku, składników pokarmowych, stosowanych leków i środowiska życia oraz jej wpływu na różne choroby. Uznano, że dzięki wystandaryzowaniu metod i źródeł pobieranych prób i zastosowaniu najnowszych strategii badawczych, będziemy w stanie

poprawiać nasze zdrowie przez monitorowanie i manipulację mikroflorą [72].

HMP jest w sensie logicznym, pojęciowym i eksperymentalnym rozszerzeniem Human Genome Project i stanowi interdyscyplinarne połączenie różnych projektów realizowanych jednocześnie na kilku kontynentach, a jego powstanie było możliwe głównie dzięki zastosowaniu najnowszych metod laboratoryjnych. Opracowanie technik globalnych analiz materiału genetycznego czy białek umożliwiło mikrobiologii wejście w nową erę, rozszerzając obiekt jej badań z właściwości pojedynczo wyizolowanych organizmów do całych społeczności mikroorganizmów [86]. W ramach HMP założono sekwencjonowanie około 1000 referencyjnych genomów mikroorganizmów powszechnie występujących w organizmie człowieka, w tym około 600 bakteryjnych, a następnie prowadzenie analiz metagenomowych, które pozwolą na scharakteryzowanie społeczności bakteryjnych kolonizujących konkretne nisze ekologiczne: drogi oddechowe (nos), skórę, przewód pokarmowy i drogi moczowo-płciowe. W ciągu 5 lat, od 2009 do 2014 roku, przewidywane jest zsekwencjonowanie całych mikrobiomów 250 ochotników [97].

Główne cele HMP są następujące:

- Ustalenie kwestii posiadania przez ludzi wspólnej, „rdzeniowej” („core”) mikroflory,
- Sprawdzenie korelacji zmian ludzkiej mikroflory ze zmianami stanu zdrowotnego człowieka,
- Skonstruowanie nowych i udoskonalanie już obecnych narzędzi technologicznych i bioinformatycznych potrzebnych do zrealizowania celów HMP, aby umożliwić hodowlę większej liczby mikroorganizmów lub opracować inne rozwiązania użyteczne do ich analiz oraz umożliwić uporządkowanie i pracę nad ogromną liczbą danych zbieranych w czasie trwania projektu,
- Rozwiązanie etycznych, prawnych i społecznych problemów związanych z badaniami nad mikroflorą człowieka [97].

HMP zakładał realizację projektu w trzech etapach. Pierwszy etap to pozyskiwanie próbek i ich wstępna analiza. Pierwszym stadium tego etapu jest stworzenie referencyjnych zestawów genomów mikroorganizmów człowieka, które występują w określonych częściach ciała: nosie, jamie ustnej, skórze, przewodzie pokarmowym i drogach moczowo-płciowych, przez wykorzystanie danych eksperymentalnych zsekwencjonowanych wcześniej genomów mikroorganizmów, głównie zdolnych do wzrostu *in vitro*. Bardzo istotne na tym etapie badań jest przeprowadzenie analiz porównawczych wybranych genomów na poziomie 16S rRNA i stworzenie ogólnodostępnych baz danych. Analizom tym towarzyszą poszukiwania nowych metod hodowli mikroorganizmów, które do tej pory uchodziły za niezdolne do wzrostu *in vitro* i ulepszenie metod już sto-

sowanych. Drugie stadium to uzyskiwanie metodami metagenomowymi referencyjnych zestawów ludzkiego mikrobiomu, gdzie uwaga skupia się w dużej mierze na analizach mikroflory organizmów mono- i dizygotycznych bliźniąt oraz ich matek. Trzecie stadium obejmuje uzyskiwanie próbek od ludzi klasyfikowanych na podstawie różnych kryteriów, a badania obejmują nieco dalszych członków rodziny (np. ojców, rodzeństwo) oraz ludzi w różnym wieku, uwzględniając też różnice demograficzne, socjo-ekonomiczne, kulturowe i mieszkańców krajów, gdzie następuje szybki rozwój technologiczny i gwałtowne zmiany trybu życia. Przedsięwzięciom tym nieustannie towarzyszy rozwój narzędzi, w tym bioinformatycznych niezbędnych do analizy transkryptomów, proteomów i metabolomów.

Na drugi etap składają się dokładniejsze badania mikroflory wybranych ludzi spełniających wyznaczone kryteria. Określenie poziomu szczegółowości prowadzenia analizy sekwencyjnej oraz liczby badanych osób jest kluczowe w celu scharakteryzowania „pełnego” ludzkiego mikrobiomu. Na tym etapie poszukuje się też gatunków drobnoustrojów blisko spokrewnionych z tymi związanymi z ludzkim organizmem albo posiadających wspólne z nimi geny, które występują w organizmach innych ssaków oraz swobodnie w środowisku, w celu zsekwencjonowania ich genomów i zdefiniowania nisz ich bytowania.

Celem trzeciego etapu nazywanego „global human microbiome diversity project” jest porównanie dużej liczby prób pobranych od ludzi z rejonów oddalonych od siebie w sensie geograficznym, demograficznym i kulturowym. Niezwykle istotnym elementem tego etapu jest także wybranie osób o zróżnicowanym stanie zdrowotnym, cierpiących na różne choroby i odnalezienie związku tych dolegliwości z mikroflorą zasiedlającą ich organizmy, a także zsekwencjonowanie DNA próbek środowiskowych z miejsc będących rezerwuarami mikroorganizmów i powiązanie uzyskanych informacji z danymi dotyczącymi wymiany genów i całych mikroorganizmów między nimi a organizmem człowieka. Zdobyta wiedza znajdzie potencjalnie zastosowanie w tworzeniu testów diagnostycznych, terapiach, działaniach mających na celu polepszenie światowych sieci żywieniowych, a także edukacji zdrowotnej zarówno pojedynczych jednostek jak i całych społeczności [86].

Jednym z pierwszych istotnych problemów podczas badań prowadzonych w ramach HMP była kwestia, które próbki, od jakich ludzi, można uznać za ‘referencyjne’. Wiadomo było, że niemożliwym będzie uzyskanie tak dużej liczby, tak różnorodnych prób, aby stanowiły całkowicie wiarygodną reprezentację mikroorganizmów całej ludzkiej populacji. Można będzie jedynie dołożyć starań, żeby ta liczba i różnorodność, w sensie rasy, grupy etnicznej i innych demograficznych cech, jak najbardziej odzwierciedlała badane społeczeństwa.

Następnym ważnym krokiem podjętym w celu przyspieszenia, a może nawet umożliwienia prowadzenia analiz, było wprowadzenie terminu „normalny” zamiast „zdrowy” w odniesieniu do wolontariuszy, od których pobierano próbki. Gdyby się tak nie stało, istniałoby zbyt wiele klinicznych kryteriów ograniczających przyjmowanie do projektu nowych chętnych, gdyż brani byłiby pod uwagę tylko ludzie zdrowi w każdym aspekcie, w odniesieniu do każdego miejsca ciała człowieka.

Także ujednoczenie danych napływających z różnych laboratoriów ma znaczący wpływ na wyniki prowadzonych badań. Określono dokładnie metody pobierania prób i sekwencjonowania DNA, a także przeprowadzono eksperymenty, gdzie zrekonstruowano sztuczny zespół mikroorganizmów, żeby sprawdzić wiarygodność i porównywalność dostarczanych danych. Serie następujących kolejno po sobie eksperymentów z wykorzystaniem nowych narzędzi mają na celu wyeliminowanie wszelkich artefaktów [72].

Ważny element HMP stanowią aspekty etyczne, prawne i socjologiczne. Szczególnie istotna jest ochrona prywatności ochotników, od których pobierane są materiały do badań i informowanie ich o korzyściach i zagrożeniach uczestnictwa w projekcie. Dane gromadzone z analiz mikrobiomu stają się powszechnie dostępne, ale już do sekwencji nukleotydowych DNA ludzkiego genomu i informacji medycznych o uczestnikach dostęp mają wyłącznie naukowcy biorący udział w przedsięwzięciu. Jednak coraz częściej zadawane są pytania, czy nawet ten zestaw mikroflory nie jest unikatowy dla każdego człowieka i nie stanowi swoistego „odcisku palca”, co może być wykorzystywane w technikach śledczych. Kolejnymi sprawami są bezpieczeństwo badanych osób w sensie fizycznym, czy też kwestie etyczne – szczególnie dotyczy to prenatalnych i neonatalnych manipulacji ludzką mikroflorą. Potencjalne zastosowania zgromadzonej wiedzy w leczeniu i zapobieganiu chorobom są bardzo rozległe, lecz istnieje też obawa, że powszechnie dostępne wyniki badań mogą stać się groźnym narzędziem o potencjalnym wykorzystaniu w atakach bioterrorystycznych [72, 86, 97].

3. Mikroflora jelit

Stosunkowo najwięcej uwagi w badaniach nad mikrobiomem człowieka poświęca się analizie różnorodności mikroorganizmów obecnych w przewodzie pokarmowym (GI – gastrointestinal tract), a w szczególności w jelitach, nazywając często ich genomy trzecim głównym genomem ssaków, zaraz po jądrowym i mitochondrialnym [9]. I jest to w pełni uzasadnione. GI zapewnia doskonałe warunki do życia i wzrostu zarówno bakteriom komensalnym, normalnie tam występującym, ale też dostarczającym wraz z pożywieniem, które mogą

w znaczący sposób wpływać na procesy zachodzące w tej niszy ekologicznej. Istotnie, bogactwo mikroorganizmów w jelicie jest ogromne, stanowi ono najgęstszy naturalny ekosystem bakteryjny z dotychczas poznanych. Jak już zostało wspomniane na początku pracy, szacuje się, że liczba komórek mikroorganizmów w ciele człowieka dziesięciokrotnie przewyższa liczbę naszych własnych somatycznych i płciowych komórek, a największa i najbardziej złożona jest zawartość jelita, gdzie liczbę drobnoustrojów szacuje się nawet na 10^{14} komórek, a 1 g kału człowieka zawiera 10^{12} komórek bakterii [33, 54]. Ogromna przewaga liczebności i różnorodności taksonomicznej bakterii w przewodzie pokarmowym nad innymi niszami w ciele człowieka (skóra, jama ustna, drogi moczowo-płciowe) została potwierdzona w wielu badaniach [13]. Metagenomowe analizy ludzkiego mikrobiomu wykazały, że w jelicie znajduje się 3,3 miliona unikatowych genów, czyli 150 razy więcej niż w naszym własnym genomie, a różnorodność bakterii jelitowych jest szacowana na ponad 1000 gatunków [11, 93].

Mikroflora jelit wpływa na wiele aspektów naszej fizjologii i nadaje nam cechy, których sami nie byłibyśmy w stanie rozwinąć. Zawiera geny, które nie występują w komórkach ssaków, a pomimo to, są niezbędne dla utrzymania optymalnego poziomu zdrowia [9]. Zaburzenia i zmiany składu mikroflory przyczyniają się do powstawania wielu różnorodnych chorób. Część z nich zostanie przedstawiona w dalszej części tej pracy przeglądowej.

3.1. Różnorodność taksonomiczna mikroflory jelit

Bakterie zasiedlają Ziemię od co najmniej 2,5 miliarda lat. Znane jest 55 typów bakterii, jednak w ludzkich jelitach występuje tylko część z nich (m.in. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Spirochaetes*), a dwa typy: *Bacteroidetes* i *Firmicutes* są zdecydowanie dominujące [54].

Dane eksperymentalne pierwszej przeprowadzonej na dużą skalę molekularnej analizy różnorodności mikroflory jelit (13 335 sekwencji 16S rRNA ze śluzówki jelit trzech dorosłych osób i po jednej próbce kału od każdej z tych osób) zostały opublikowane w 2005 roku [18]. Rezultatem było powstanie największej bazy danych sekwencji nukleotydowych 16S rRNA z pojedynczego badania nad jakimkolwiek ekosystemem. Zidentyfikowano aż 395 gatunków bakterii i jeden gatunek archeonu, *Methanobrevibacter smithii*. Liczba poszczególnych sekwencji nukleotydowych reprezentujących każdy takson stanowiła miarę obfitości jego występowania w jelicie. Większość ze zidentyfikowanych w tym badaniu organizmów należała do dwóch typów: *Firmicutes* (301 z 395 gatunków) i *Bacteroidetes*

tes (65), co było zgodne z wcześniejszymi analizami sekwencji nukleotydowych 16S rRNA [34, 38, 91]. Najwięcej zaś (95%) sekwencji nukleotydowych w obrębie *Firmicutes* pochodziło z materiału genetycznego bakterii klasy *Clostridium*. W tym samym badaniu autorzy zasygnalizowali również, że około 80% gatunków bakterii zasiedlających ludzkie jelita nie potrafimy hodować, a nowo odkryte gatunki stanowiły w przeprowadzonej analizie aż 60% wszystkich wykrytych gatunków. Jednak już nawet wtedy przewidywano, że mała czułość analiz przeprowadzanych z wykorzystaniem 16S rRNA może zaniżać różnorodność bakterii we florze jelit, co potwierdziły późniejsze badania nad mikrobiomem jelit opublikowane w 2010 roku, które szacowały to zróżnicowanie na 1000–1150 gatunków w całej puli bakterii uzyskanych od 124 osób [70]. Inna opublikowana w 2007 roku analiza ponad 45 000 bakteryjnych sekwencji nukleotydowych 16S rRNA dostarczyła podobnych danych, jeżeli chodzi o udział klas bakterii w mikroflorze jelit. Ponad 98% wszystkich gatunków należała do jednego z czterech typów: *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%), *Proteobacteria* (8%) i *Actinobacteria* (3%), natomiast udział innych grup taksonomicznych był raczej zmienny [23]. Chociaż w różnych badaniach pojawiają się czasem odmienne proporcje liczebności pomiędzy poszczególnymi grupami taksonomicznymi bakterii, naukowcy są zgodni, co do dominacji w jelicie mikroorganizmów należących do dwóch typów: *Firmicutes* i *Bacteroidetes*.

Oprócz badań skupiających się na składzie mikroflory jelitowej w momencie pobierania próbki, prowadzone były długookresowe analizy trwające od kilku miesięcy do dwóch lat, mające na celu sprawdzenie zmian w składzie gatunkowym bakterii w różnych przedziałach czasu, dotyczące zarówno ogólnej proporcji pomiędzy grupami taksonomicznymi, jak i dokładniejszych analiz liczebności poszczególnych gatunków, których obecność jest obserwowana u większości ludzi (m.in. *Clostridium coccooides*, *Clostridium leptum*, *Bacteroides fragilis*). Wykazały one, że skład mikroflory jelitowej dorosłego człowieka nie ulega drastycznym zmianom w czasie i jest dość stabilny [36, 63, 94].

Badania domeny *Archaea* w jelitach dotyczą głównie archeonów metanogennych. Nie występują one jednak w jelitach wszystkich ludzi [22]. Oprócz wspomnianego wcześniej gatunku *Methanobrevibacter smithii*, dość dokładnie udało się opisać i zsekwencjonować genom jeszcze jednego przedstawiciela *Archaea*, mianowicie *Methanosphaera stadtmanae* [17, 25]. Gatunek ten ma najbardziej ograniczony metabolizm ze wszystkich metanogennych archeonów [25], co tłumaczy jego rzadsze występowanie niż *M. smithii* [18, 68, 80]. Podczas gdy *M. smithii* wykorzystuje H_2 i CO_2 , *M. stadtmanae* korzysta z metanolu do produkcji metanu i syntezy ATP [25]. Poziom metanolu wzrasta przy degradacji pektyn

przez bakterie beztlenowe np. niektóre gatunki *Bacteroides* [46], co umożliwia *M. stadtmanae* występowanie w środowisku jelit, gdzie znajduje się wiele gatunków bakterii tego rodzaju.

Dzięki zastosowaniu metod niezależnych od otrzymywania czystych kultur zidentyfikowano również małą liczbę przedstawicieli rzędu *Methanosarcinales* oraz gatunek *Methanobrevibacter orali* [80].

Stosunkowo nieduża liczba badań została przeprowadzona w celu zanalizowania różnorodności wirusów w ludzkich jelitach. Wykryto jednak, że w przeciwieństwie do społeczności bakteryjnych, których skład jest dużo bardziej podobny u ludzi spokrewnionych, różnorodność wirusów w jelitach jest unikatowa dla poszczególnych osób i nie zależy od stopnia pokrewieństwa. Jednak, pomimo znacznych interpersonalnych wariacji w zawartości wirusów i ich materiału genetycznego, ich różnorodność wewnątrz jednego organizmu jest bardzo mała, zdominowana przez zaledwie kilka fagów, które wykazują wysoki poziom genetycznej stabilności [76].

3.2. „Core microbiome” jelit

W momencie zainicjowania HMP zadawano sobie pytanie o istnienie rdzeniowego mikrobiomu człowieka (core microbiome), czyli zestawu genów, który będzie obecny u wszystkich/większości drobnoustrojów badanych osób. Badania przeprowadzone nad dużą pulą bakteryjnego 16S rRNA (prawie 10 tysięcy nukleotydowych sekwencji 16S rRNA niemal całej długości i 2 miliony fragmentów 16S rRNA) wykazały, że co prawda mikrobiom jest po części wspólny dla członków rodzin, jednak zestaw mikroorganizmów każdej osoby różni się pochodzeniem i składem gatunkowym z porównywalnym poziomem różnorodności pomiędzy dorosłymi monozygotycznymi i dzygotycznymi bliźniakami [88]. Co zaskakujące, nie wykryto jednego gatunku bakterii licznie (z założenia >0,5% zespołu mikroorganizmów) występującego u wszystkich badanych 154 osób. Jednakże analizy pozwoliły zidentyfikować zestaw genów mikroorganizmów obecny w badanych próbach, co mogłoby wskazywać na istnienie wspólnego dla ludzi mikrobiomu na poziomie nie gatunkowym, ale na poziomie materiału genetycznego. Otrzymane dane sugerują, że na poziomie taksonomicznym o wspólnej mikroflorze można mówić tylko w przypadku małej populacji lub biorąc pod uwagę niższą niż 0,5% częstość występowania danego gatunku. Przeprowadzone nieco później metagenomowe badania próbek zawartości jelit 124 Europejczyków wykryły 18 gatunków obecnych u wszystkich badanych osób i 57 gatunków u 90% osób tej samej populacji oraz udokumentowały, że większość zidentyfikowanych genów mikroorganizmów była wspólna dla wszystkich badanych [70]. Jednakże dalsze analizy częstości występowania tych popularnych gatunków

u innych osób wykazały dużą różnorodność pomiędzy mikroflorą poszczególnych osobników. Otrzymane dane pozwalają wnioskować, że „core microbiota” w ludzkich jelitach może istnieć jedynie w dość małej populacji o określonej wielkości, a zwiększając liczbę badanych do nieograniczonej dużej liczby, powoduje się zanik „core microbiota”. Problemy dotyczące badań nad rdzeniowym mikrobiomem omawia praca przeglądowa *Shade i Handelsman* [83].

3.3. Zmiany mikroflory jelit w zależności od wieku

Skład mikroflory jelit, chociaż nie wykazuje istotnych zmian w czasie życia dorosłego człowieka, ulega znacznym modyfikacjom w ciągu pierwszych miesięcy po urodzeniu, na co duży wpływ mają czynniki środowiska. Po osiągnięciu przez dziecko około roku skład ten chociaż ciągle unikatowy, upodabnia się do charakterystycznego zestawu mikroorganizmów obserwowanego u dorosłych [71]. Podstawowe funkcje wyrażane przez jelitowe mikroorganizmy, takie jak pobieranie składników odżywczych, fermentacja składników pożywienia, stymulacja układu odpornościowego gospodarza, ochrona przed patogenami zaczynają ujawniać się pod koniec drugiego roku życia [61]. Fakt ten potwierdziła opublikowana w 2007 roku praca japońskich naukowców prezentująca wyniki badań metagenomowych próbek kału 13 zdrowych osób, wśród których byli zarówno dorośli (w wieku 24–45 lat) jak i dzieci karmione jeszcze naturalnym pokarmem (3–7 miesięcy) oraz starsze (1.5 i 3 lata) [51]. Wykazano, że, podczas gdy skład mikroflory dzieci karmionych piersią był stosunkowo prosty, z dominacją niewielu gatunków, lecz ujawniał duże różnice zarówno w taksonomii bakterii jak i w zestawie genów pomiędzy osobnikami, to próbki pobrane od starszych dzieci i osób dorosłych były bardziej złożone gatunkowo, ale za to charakteryzowały się znaczną funkcjonalną jednorodnością (podobieństwo sekwencji nukleotydowych), bez względu na wiek czy płeć. W przeprowadzonych badaniach udokumentowano występowanie różnic pomiędzy zestawem genów obecnych w mikrobiomie ludzi dorosłych, w porównaniu do mikrobiomu noworodków, co w dużej mierze związane jest ze spożywanym pokarmem. Istotnym przykładem może być obecność bakterii gatunku *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* w mikrobiomie noworodków. Niedługo po urodzeniu jelita karmionych piersią dzieci są szybko kolonizowane przez konsorcja bakteryjne często zdominowane przez *Bifidobacterium*. Ten gatunek posiada zdolność wykorzystywania zawartych w mleku molekuł o małej wartości odżywczej dla noworodka (HMO – human milk oligosaccharides), które nie mogą być rozłożone przez enzymy trawienne gospodarza. Genom tej bakterii zawiera geny związane z katabolizmem, kodujące zewnątrzkomórkowe białka

wiązane i permeazy aktywowane pod wpływem HMO, co daje mu ogromną przewagę nad innymi, nieposiadającymi takich zdolności grupami bakterii występującymi w przewodzie pokarmowym noworodków [82]. Również inne badania wykazały związek mikroflory jelit z karmieniem piersią, potwierdzając duży udział w procesach katabolicznych bakterii rodzajów *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* [30, 32]. Źródła pochodzenia tych wczesnych kolonizatorów nie są do końca poznane, chociaż wiadomo, że pewne gatunki są przekazywane od matki do dziecka [21, 62, 64]. Pod koniec wieku dojrzewania zostaje osiągnięty pewien górny poziom składu mikroflory, który jest dość stabilny u zdrowych dorosłych ludzi [24], a *Clostridium leptum*, *Clostridium coccoides*, *Bacteroides* i *Bifidobacterium* stanowią tu cztery dominujące grupy [61]. Kolejne zmiany widoczne są u ludzi starszych. Można m.in. zaobserwować wtedy zmniejszenie liczby *Bifidobacterium* i *Bacteroides*, czemu towarzyszy także spadek liczby rodzaju *Lactobacillus* oraz proporcjonalny wzrost liczby fakultatywnych beztlenowców, takich jak *E. coli* [37, 61]. Także stosunek *Firmicutes* do *Bacteroidetes* znacznie zmienia się w ciągu życia, na początku wzrastając wraz z wiekiem, aby potem znów obniżyć się u starszych osób [61]. Warto dodać, że zmiany tej proporcji mogą mieć także związek z otyłością, co wskazuje na inną fizjologię trawienia u starszych ludzi [55]. Jednak uogólniając, zarówno noworodki, ludzie w średnim wieku jak i osoby starsze mają ograniczony do dość małej liczby zestaw typów mikroorganizmów, co wskazuje na kształtowanie się różnorodności mikroflory w jelicie pod silną presją selekcyjną [33].

3.4. Wpływ diety i genotypu gospodarza na różnorodność mikroflory jelit

Różne czynniki środowiskowe mają wpływ na mikroflorę jelit. Do najistotniejszych można zaliczyć dietę gospodarza oraz jego status genetyczny. Wykazano na przykład, że próbki jelitowego mikrobiomu pobierane od dorosłych Japończyków i Amerykanów różnią się składem, głównie, jeżeli chodzi o gatunki *Bacteroides* i archeonów. U Amerykanów zawierały one bardzo mało sekwencji nukleotydowych i genów gatunków *Bacteroides* oraz znaczną liczbę genów należących do archeonów, podczas gdy u Japończyków było na odwrót: obserwowano wysoką liczbę sekwencji nukleotydowych i genów *Bacteroides* i prawie całkowity brak genów należących do archeonów [28, 51]. Również inne badanie, ograniczające się do przeprowadzenia analiz mikrobiota ludzi z jednego kontynentu, a nawet jednego kraju (Japonii) wykryło znaczne różnice w różnorodności mikroflory pomiędzy osobami mieszkającymi w mieście i na wsi [8], co mogło być spowodowane odmienną dietą i statusem genetycznym gospodarzy.

Oprócz wspomnianych wcześniej badań dotyczących różnic pomiędzy mikrobiotą karmionych mlekiem matki noworodków a starszych dzieci i dorosłych, przeprowadzono jeszcze wiele innych analiz wpływu pokarmu na mikroflorę. Wykazano na przykład, że popularne diety mające na celu spadek wagi, oparte na spożywaniu przede wszystkim białek i małej ilości węglowodanów, mogą powodować zmianę składu populacji bakterii w jelicie grubym człowieka i ich mikrobiologicznej aktywności, a co za tym idzie, ich wpływu na zdrowie gospodarza. Wprowadzając określone diety i pobierając próbki kału od badanych osób do analizy 16S rRNA przy pomocy fluorescencyjnej hybrydyzacji *in-situ* (FISH), wykazano, że redukcja ilości węglowodanów w spożywanych posiłkach prowadzi do spadku zawartości w jelicie bakterii produkujących maślan: *Roseburia* spp., *Eubacterium recitale* oraz *Bifidobacterium* spp., ale nie stymuluje zmian liczby *Bacteroides* spp., zaś spożywanie większej ilości węglowodanów skutkuje zwiększeniem ogólnej liczby komórek bakterii [3, 16, 78]. Prowadzone było także wiele innych badań dotyczących wpływu różnych diet, np. niskokalorycznych, czy zawierających dużo oliwy z oliwek z dodatkiem liofilizowanych owoców i ekstraktu z warzyw, które zmieniały kompozycję mikroflory jelit, nie tylko zmniejszając masę ciała i zawartość tłuszczów, ale też redukując rozwój gruczolaków w jelicie myszy [58, 59]. Być może, zmiany mikroflory związane ze spożywaniem określonych pokarmów mogą pośrednio przyczyniać się do hamowania karcynogenezy w komórkach jelit [59, 66].

Warto wspomnieć, że poziom liczebności niektórych składowych ludzkiej mikroflory jelit może zostać pośrednio zmieniony przez dietę z powodu aktywności innych uczestników tej społeczności, które są już bezpośrednio zależne od spożywanego przez gospodarza pokarmu. W eksperymencie użyto szczepu *Bifidobacterium adolescentis* oraz wykorzystujące mleczan i produkujące maślan szczepu *Eubacterium hallii* i *Anaerostipes caccae*. Udokumentowano, że *E. hallii* i *A. caccae*, wysiane na podłoże ze skrobią, nie były w stanie same utworzyć czystych kultur, natomiast kiedy były hodowane we wspólnych kulturach z *B. adolescentis*, które dostarczały im metabolitów (mleczan, octan), pojawiały się maślan (cross-feeding) [7].

Coraz więcej dowodów wskazuje również na wyraźny wpływ statusu genetycznego gospodarza na kompozycję mikroflory jelit. Porównania sekwencji 16S rRNA bakterii z próbek kału ludzi dorosłych o różnym stopniu pokrewieństwa, pokazały m.in. wyraźnie wyższe podobieństwo mikroflory jelit pomiędzy monozygotycznymi bliźniakami niż przypadku niespokrewnionych osób żyjących w takich samych warunkach środowiskowych np. małżeństw [95]. Porównania zestawów mikrobiota pobranych od mono- i dizygotycznych bliźniąt jeszcze wyraźniej wskazały na duże znaczenie genotypu

gospodarza [85, 90]. Również badania dotyczące osób cierpiących na chorobę zwaną rodzinną gorączką śródziemnomorską (FMF – Familial Mediterranean Fever), warunkowaną występowaniem mutacji w genie MEFV (Mediterranean Fever), wskazały na znaczne zmiany kompozycji bakterii u osób chorych, objawiające się spadkiem ogólnej liczby bakterii, mniejszą różnorodnością i poważnymi zmianami w populacjach bakterii typów *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. FMF jest chorobą zapalną dziedziczącą się autosomalnie recesywnie, która charakteryzuje się krótkimi, samoustępującymi nawrotami gorączki i zapaleniem błon surowiczych. Najczęściej dotyka populacje pochodzące z okolic basenu Morza Śródziemnego i Bliskiego Wschodu, w tym Żydów sefardyjskich, Ormian, Arabów i Turków. Gen MEFV koduje białko odpowiadające za hamowanie procesu zapalnego. W okresie remisji, kiedy nie obserwowano objawów chorobowych, różnorodność bakterii była bardziej zbliżona do występującej u osób zdrowych, jednak wciąż znacznie odbiegała od normy, co wskazuje na zależność składu mikroflory jelit od odpowiednich alleli w genotypie gospodarza [48].

3.5. Wybrane funkcje mikroflory jelit

Rozszyfrowanie biologicznych funkcji tak różnorodnego taksonomicznie i dynamicznego kompleksu, jakim jest ludzka mikroflora jelit oraz interakcji pomiędzy nią a gospodarzem nadal stanowi duże wyzwanie. Powszechnie stosuje się w tych badaniach uproszczone modele ekosystemów, takie jak zwierzęta gnotobiotyczne, zwierzęta ze zdefiniowanym zestawem drobnoustrojów normalnie występujących w ich organizmach, lub z przeszczepionymi mikroorganizmami charakterystycznymi dla innych organizmów. Jako modele zwierzęce stosowane są do tego celu głównie myszy, świnię, kurczaki oraz ryby z rodziny karpowatych – *Danio rerio*.

Mikroorganizmy wpływają w znaczący sposób na równowagę energetyczną [5] i wspomagają biotransformację licznych związków chemicznych, do których przeprowadzenia sam organizm człowieka nie jest przystosowany [51, 69]. Dzięki tym ogromnym metabolicznym zdolnościom umożliwiają nam przekształcanie złożonych składników pokarmowych, takich jak błonnik (składniki ścian komórek roślinnych: celuloza, pektyny, hemicelulozy, lignina) czy jelitowa mucyna w proste cukry, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SFCA, short chain fatty acid), głównie octan, propionian, maślan i inne łatwo przyswajalne substancje [12, 28, 96]. Węglowodany zawarte w pożywieniu są trawione przez mikrobiota w jelicie grubym. Ocenia się, że ta mikrobiologiczna fermentacja może dostarczać nawet 10% energii uzyskiwanej z pożywienia, głównie w postaci SFCA, która jest wykorzystywana przez komórki gospodarza [67]. W genomie *B. thetaiotaomicron* odnaleziono

cztery razy więcej genów, których produkty uwikłane są w pozyskiwanie i metabolizm węglowodanów, w porównaniu do liczby podobnych genów obecnych w genomie człowieka [77]. Maślan jest preferowanym źródłem energii dla komórek nabłonkowych jelita grubego, a jego obecność ma związek z rozrostem śluzówki jelit i proliferacją komórek nabłonka. Może on także stanowić ochronę przed chorobami, takimi jak stany zapalne czy nowotwory jelit [14, 45, 92]. W 2006 roku została przeprowadzona analiza sekwencyjna typu „shotgun” DNA uzyskanego z próbek kału pochodzących od dwóch dorosłych osób odmiennej płci, w której, aby szczegółowo zbadać metaboliczny potencjał mikroflory, użyto dwóch strategii – KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) oraz COGs (Clusters of Orthologous Groups) [28]. Oba systemy adnotacji zawierają kategorie funkcji metabolicznych zorganizowane w wiele poziomów hierarchii; analizy KEGG to mapowanie enzymów w znane ścieżki metaboliczne, a analizy COG wykorzystują pochodzenie ewolucyjne do grupowania funkcjonalnie spokrewnionych genów. Tak jak się spodziewano, wśród 11 zrekonstruowanych KEGG ścieżek metabolicznych dla mikrobiomu dystalnej części jelita, geny metabolizmu polisacharydów były szeroko rozpowszechnione. Potwierdziły to również analizy COG wskazujące na udział mikroorganizmów w trawieniu węglowodanów. Istotną rolę odgrywają w tym procesie mezofilne metanogenne archeony, albowiem akumulacja H_2 , stanowiącego końcowy produkt bakteryjnej fermentacji, zmniejsza wydajność przetwarzania spożywanych polisacharydów, a wytwarzanie metanu przez te archeony jest główną drogą usuwania H_2 z ludzkich jelit [84].

Mikroflora jelit pełni również istotną rolę w modulowaniu homeostazy śluzówkowych subpopulacji komórek układu immunologicznego. Przede wszystkim odpowiedzialna jest za zjawisko immunologicznej ignorancji, zapobiega bezpośredniemu kontaktowi bakterii z komórkami układu immunologicznego. Sygnały bakterii komensalnych wzmacniają integralność nabłonka jelit oraz chronią komórki przed uszkodzeniami kontrolując także tempo ich proliferacji. Dodatkowo drobnoustroje komensale indukują wytwarzanie i wydzielanie przez komórki nabłonkowe przeciwciał sekretorycznych (sIgA) i kationowych peptydów o aktywności antibakteryjnej (CAMPs, cationic antimicrobial peptides). Stymulują także wytwarzanie mucyny. Wszystkie te mechanizmy utrudniają kontakt pomiędzy komórkami układu immunologicznego a mikroorganizmami i ułatwiają utrzymanie immunologicznej ignorancji [44].

Wiele badań udokumentowało, że skład mikrobiota wpływa na zjawiska immunologicznej homeostazy, regulując liczebność różnych subpopulacji limfocytów np. poziom limfocytów Th17, Treg czy ogólny stosunek limfocytów Th1 do Th2. Rolę w tych procesach poznano

jak dotychczas, dla nielicznych gatunków mikrobiota. Udokumentowano, że podczas kolonizacji zwierząt przez powszechnie występujący w środowisku jelit gatunek *Bacteroides fragilis*, unikatowe dla tego gatunku polisacharydy bakteryjne (PSA) kierują dojrzewaniem rozwijającego się układu immunologicznego. Analizy porównawcze ze zwierzętami GF wykazały, że PSA modelują procesy immunologiczne organizmu gospodarza, a mianowicie korygują równowagę pomiędzy limfocytami Th1 oraz Th2. Mutanty w genach biorących udział w syntezie PSA *B. fragilis* nie wykazywały tych właściwości [65].

Opisano również znaczącą rolę, jaką pełnią w oddziaływaniach z gospodarzem SFB (segmented filamentous bacteria), niezdolne do wzrostu *in vitro*, klasyfikowane jako *Candidatus arthromitis*, tworzące spory, przedstawiciele typu *Firmicutes*. Zidentyfikowano je w przewodach pokarmowych wielu zwierząt np. ptaków, myszy, królików. Rzadko kolonizują one GI ludzi. Jako nieliczne z mikrobiota GI wchodzi w bezpośredni kontakt z komórkami nabłonka jelit i wysyłając odpowiednie sygnały decydują o poziomie limfocytów Th17, regulując liczbę Th17 w stosunku do limfocytów Treg [26, 44]. Myszy pozbawione tych mikroorganizmów charakteryzowały się znacznie niższym poziomem limfocytów Th17, a przeszczepienie bakteryjnej zawartości jelit od myszy posiadających znaczną liczbę Th17, przywracało powstawanie tych komórek [42]. Co ciekawe, różnicowanie naiwnych limfocytów Th w Th17 zależne od SFB wydaje się być niezwiązane się z funkcją receptorów TLR/NOD. Kolonizacja jelit przez SFB ma również wpływ na wytwarzanie peptydów przeciw bakteryjnych i skutkuje zwiększoną odpornością np. na infekcje jelitowym patogenem *Citrobacter rodentium*, bakteriami rodzaju *Salmonella* oraz enterokokami opornymi na wankomycynę (VRE, vancomycin-resistant *Enterococcus*) [43].

Jak wiadomo, receptory TLR (Toll-like receptors) są sensorami infekcji drobnoustrojami i pełnią istotną rolę w inicjacji stanu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej. Bakteryjne ligandy, cząsteczki PAMP, rozpoznawalne przez te receptory nie są unikalne dla patogenów i występują też u komensalnych mikroorganizmów. Jednak komensale mikroorganizmy zatrzymywane na powierzchni nabłonka, często nie stymulują odpowiedzi immunologicznej. Natomiast bakterie patogene, wyposażone w różnorodne czynniki wirulencji, są w stanie ominąć barierę nabłonka i po przeniknięciu do warstwy podśluzówkowej zostają rozpoznane przez receptory TLR makrofagów i komórek dendrytycznych. Wykazano jednak, że niektóre produkty komensalnych bakterii także stymulują receptory TLR w normalnych warunkach, gdy nabłonek jelit jest nienaruszony. W przeprowadzonym eksperymencie, usunięcie komensalnej mikroflory w wyniku zastosowania antybiotyków

doprowadziło do całkowitego zatrzymania w jelicie syntezy cytokin zależnej od MyD88 (ang. myeloid-differentiation marker, białko adaptorowe, niezbędne do zaistnienia reakcji zapalnej powstałej w wyniku aktywacji receptorów Toll-like) [73].

Równie ciekawa u mikrobiota jelit jest kwestia redukcji genów odpowiedzialnych za syntezę silnie immunogennej flageliny rozpoznawanej przez receptory TLR5, co skutkuje obniżeniem poziomu odpowiedzi układu odpornościowego gospodarza. Zaobserwowano także brak genów odpowiedzialnych za procesy chemotaksji. Stanowi to kolejne przystosowanie mikroflory jelit do niszy, którą zajmuje, gdyż zdolność do ruchu i chemotaksja nie są bezwzględnie wymagane w środowisku jelit ze względu na perystaltykę jelit [51].

Zespół mikroorganizmów komensalnych jelit bezwzględnie stanowi barierę chroniącą nas przed patogenami. Poza blokowaniem dostępu patogenów do komórek nabłonka, mikrobiota chroni nas przed infekcjami, modulując skład dostępnych w jelitach składników odżywczych. Zawartość i jakość węglowodanów, podstawowych źródeł energii, zależna jest od kompozycji naszej mikroflory. Zmiana składu mikroflory; stosunku liczby *Firmicutes* do *Bacteroides*, skutkuje zwiększeniem podatności myszy na infekcję [81]. Z drugiej strony, bakterie patogenne w drodze adaptacji do konkretnej niszy ekologicznej zyskały zdolność wykorzystywania licznych źródeł węgla, co pozwala im na współzawodniczenie z komensalami. Tropizm enteropatogenów w odniesieniu do kolonizowanych fragmentów przewodu pokarmowego jest uzależniony od rezydujących tam komensali. Skład SCFA modulowany przez mikroflorę stanowi sygnał odbierany przez patogeny. Maślan obecny głównie w końcowym odcinku jelit sprzyja adhezji enterohemokrwotocznych szczepów *E. coli* (EHEC) do kolonocytów (badania z wykorzystaniem linii komórkowej CaCo2) poprzez stymulację ekspresji genów wyspy patogenności odgrywających rolę w procesach adhezji. Dodatkowo w jelitach bydła, gdzie ta bakteria jest komensalem, wytwarzana przez niektóre szczepy typu *Bacteroides* cząsteczka sygnalizacyjna AHL (acyl homoserine lacton) tworząc kompleks z czynnikiem regulatorowym SdiA, hamuje ekspresję genów wyspy patogenności [40]. Odwrotnie, maślan blokuje ekspresję genów inwazyjności *S. Typhimurium*, a mrówczan obecny głównie w jelicie cienkim podnosi poziom ekspresji genów warunkujących wirulencję *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* [27, 39].

Co więcej, mikroflora jelit związana jest z produkcją niektórych niezbędnych dla człowieka witamin: K, B12, kwasu foliowego, B1, B6 oraz ma wpływ na recyrkulację kwasów żółciowych (poprzez wytwarzanie hydrolaz kwasów żółciowych). Rola kwasów żółciowych jako cząsteczek sygnalizacyjnych jest bardzo istotna w wielu procesach fizjologicznych – między innymi regulują one

własną biosyntezę, adsorpcję lipidów czy homeostazę cholesterolu. Mikroflora jelit bierze także udział w przekształcaniu potencjalnych mutagenów i karcynogenów takich jak heterocykliczne aminy i N-nitroso związki, których endogenna produkcja w jelitach wzrasta przy spożywaniu czerwonego mięsa. Bierze też udział w aktywacji bioaktywnych związków np. fitoestrogenów, które wykazują zdolność interakcji z układem hormonalnym i modulowania jego czynności w sposób charakterystyczny dla żeńskich hormonów płciowych. Nie są one wytwarzane przez system endokryny, a trafiają do naszego organizmu przez konsumpcję zawierających je roślin [47, 56, 60].

Co istotne, badania wykazały znaczący udział w genomach mikroflory jelit ruchomych elementów genetycznych, prawdopodobnie z powodu dużej gęstości komórek tam obecnych. Szczególnie szeroko rozpowszechnione były transpozony zawierające geny homologiczne z genami niesionymi przez koniugacyjny transpozon Tn1549, kodujący systemy transportu ABC i intergazy/miejscowo specyficzną rekombinazę, a więc geny wpływające na horyzontalny transfer genów i mogące nadawać bakteriom nowe cechy przystosowawcze [51]. O wysokiej częstości przekazywania ruchomych elementów genetycznych pomiędzy mikroorganizmami tej niszy ekologicznej świadczyć mogą badania, w których odkryto obecność w genomach jelitowej mikroflory, wyłącznie Japończyków, porphyranaz, specyficznej grupy enzymów związanych z metabolizmem węglowodanów, które przekształcają porphyran zawarty w czerwonych glonach – powszechnie spożywanych właśnie w Japonii. Te CAZymy (carbohydrate-active enzymes) nie występują w żadnym z poznanych genomów mikroorganizmów środowiska lądowego, lecz obecne są w genomach kilku morskich bakterii i zostały także zidentyfikowane w genomie jelitowej bakterii *Bacteroides plebeius* wyizolowanej od Japończyków [35, 49].

3.6. Mikroflora jelit człowieka a choroby

Mikrobiota jelit jest prawdopodobnie niezbędną częścią składową ludzkiego organizmu, konieczną do utrzymania prawidłowego stanu zdrowia, a jej zmiany są związane z indukcją niektórych chorób jelitowych i podwyższeniem ryzyka wystąpienia schorzeń ogólnoustrojowych. Mutualistyczne zależności ssaków z ich jelitową mikroflorą są oparte na tolerancji. Zmniejszenie lub zmiana tolerancji gospodarza może prowadzić do przewlekłych stanów zapalnych, takich jak nieswoiste zapalenie jelit (IBD, inflammatory bowel diseases) czy zespół jelita drażliwego (IBS, irritable bowel syndrome). Co więcej, badania sugerują związek składu mikroflory z chorobami ogólnoustrojowymi, np. nowotworami, cukrzycą i otyłością. Niżej podano kilka danych eksperymentalnych wskazujących na wpływ mikrobiomu

na rozwój chorób nowotworowych oraz związek pomiędzy mikrobiomem i otyłością. Zagadnienia dotyczące powiązań pomiędzy mikroflorą jelit a IBD omówione zostaną w odrębnej pracy przeglądowej.

3.6.1. Nowotwory

Szacuje się, że około 15% chorób nowotworowych stymulowanych jest przez infekcje bakteryjne. Ryzyko zachorowania na nowotwór jelita grubego i odbytu (CRC, colorectal cancer) również związane jest z mikroflorą jelit. Opisano wiele mechanizmów, dzięki którym komensalne bakterie mogą przekształcić prokarcynogeny znajdujące się w pożywieniu w związki uszkadzające DNA (np. etanol i heterocykliczne aminy) lub bezpośrednio wytwarzać karcynogeny (np. fecapentanes), czy też doprowadzić do rozwoju CRC poprzez silną zmianę potencjału redoks środowiska w sąsiedztwie komórek nabłonkowych jelita przez np. produkcję wolnych rodników tlenowych przez *Enterococcus faecalis* albo siarkowodoru przez bakterie redukujące siarczany [41]. Przeprowadzono wiele badań mających na celu przetestowanie roli pre- i probiotyków w zapobieganiu karcynogenezie i wiele z nich, chociaż nie wszystkie, wykazały ich skuteczność. Myszy nieprodukujące IL-10, pozbawione mikroorganizmów są mniej podatne na IBD, a co za tym idzie, późniejsze zachorowanie na CRC, a kolonizowane przez normalną mikroflorę jelit, są bardziej narażone na rozwój nowotworu [89]. Podobnie jest w przypadku myszy pozbawionych transformującego czynnika wzrostu beta1 (TGF- β 1, transforming growth factor beta 1) [19]. Podatność myszy z zaburzoną ścieżką sygnalizacyjną TGF- β 1, np. pozbawionych genów: *smad3* (mothers against decapentaplegic homolog 3), *rag2* (recombinase-activating gene 2), czy *tgfb1* (transforming growth factor beta 1), na nowotwory jelit po zainfekowaniu mikroorganizmami wywołującymi zapalenie w jelicie znacznie wzrastała [20, 57].

Z drugiej strony, badania z wykorzystaniem myszy *Apc^{Min}* (u których rozwija się dużo nowotworów jelit ze względu na mutacje w genie *apc* powodujących zespół rodzinnej polipowatości gruczolakowej) hodowanych w warunkach GF, wykazały brak silnego związku pomiędzy statusem mikrobiologicznym gospodarza a redukcją liczby jelitowych polipów, co wskazuje na to, że microbiota może mieć różny wpływ na nowotwory jelit o molekularnie odmiennych przyczynach [15]. W dodatku, flora bakteryjna może produkować maślan, silny inhibitor deacetylazy histonów, który może zmienić epigenetyczne programowanie kolonocytów i brać udział w ochronie przed nowotworami jelit [2].

Mając na uwadze fakt, że wystąpienie stanu zapalnego jest czynnikiem ryzyka nowotworu jelita grubego oraz powiązanie infekcji *Helicobacter pylori* z nowotworami żołądka, poszukiwano metodami metagenomicznymi ewentualnego mikroorganizmu odpowiedzialnego

za wzrost ryzyka rozwoju nowotworu jelita grubego. Analizując tkanki pobrane od chorych i zdrowych pacjentów, wykazano znaczącą nadreprezentację w tych pierwszych nukleotydowych sekwencji *Fusobacterium nucleatum*. Analizy potwierdziły, badając poziom nukleotydowych sekwencji 16S rDNA. Obecność *Fusobacterium* w tkankach nowotworowych wykazano także metodą FISH. Bakteria ta rzadko kolonizuje ludzki GI, a uprzednio kolonizacja *F. nucleatum* wykazywała powiązanie z paradontozą oraz zapaleniem woreczka żółciowego [10, 50].

3.6.2. Otyłość

Tradycyjne spojrzenie na problem otyłości koncentruje się na aspekcie odżywiania i genetycznych predyspozycjach gospodarza. Jednak wiele badań, stosując mysie modele otyłości, wykazało związek mikroflory jelit z otyłością. Według tych analiz, związane z dietą modyfikacje w mikroflorze jelit, jeżeli porównywać myszy normalne (*ob/+*, *+/+*) i cierpiące na otyłość (*ob/ob*), spowodowały znaczną różnicę stosunku dwóch głównych typów bakterii w tym środowisku: *Bacteroides* i *Firmicutes*. U myszy otyłych stwierdzono 50% spadek liczebności *Bacteroides* i proporcjonalny wzrost *Firmicutes*. Dodatkowo analizy sekwencyjne wykazały znaczący wzrost liczby genów związanych z wykorzystaniem energii z pożywienia w jelitowym mikrobiomie myszy otyłych [53]. Udokumentowano też, że u osób będących na niskokalorycznej diecie, wraz z utratą wagi, wzrasta liczba bakterii z typu *Bacteroidetes* [55]. Obserwacje te nie wykazały jednoznacznie, czy zmiana w zawartości *Bacteroidetes* jest przyczyną tycia, czy też był to efekt spożywania określonych składników pokarmowych, które selektywnie wspomagały wzrost jednych grup bakterii, nie wpływając lub hamując wzrost innych.

W innym eksperymencie wykazano, że w przeciwieństwie do myszy posiadających mikroflorę jelit, zwierzęta GF nie mają tendencji do tycia, pomimo spożywanej wysoko tłuszczowej i wysokocukrowej diety [6, 87]. Ciekawe rezultaty przyniosło badanie, w którym przeszczepiono mikroflorę od myszy otyłych (z DIO, diet-induced obesity) myszom GF, u których, po tym zabiegu, zaobserwowano tendencję do szybszego odkładania się tłuszczu, niż w przypadku przeszczepu mikroflory od chudych myszy [87]. Jak wspomniano wcześniej, mikroflora jelit jest niezbędna do przetwarzania niektórych polisacharydów obecnych w pożywieniu. Ustalono, że przeszczepienie microbiota z jelit myszy dzikich, konwencjonalnie hodowanych myszom GF, może spowodować nawet 60% wzrost zawartości tłuszczu w ciele i oporność na działanie insuliny już w ciągu 14 dni, pomimo ograniczonego spożycia pokarmów. Mikroflora sprzyja wchłanianiu cukrów prostych ze światła jelita, co powoduje indukcję procesu lipogenezy w wątrobie. Powoduje też supresję ekspresji czynnika

adipocytów (fasting-induced adipose factor), należące do grupy angiopoetyno-podobnych białek, który jest inhibitorem lipazy lipoproteinowej. Skutkuje to odkładaniem się triglicerydów w adipocytach. Myszy GF pozbawione czynnika adipocytów tracą „oporność” na otyłość wywołaną kaloryczną dietą [5, 6]. Potwierdza to hipotezę, że bakteryjna mikroflora nie tylko umożliwia wydajniejsze wykorzystywanie węglowodanów zawartych w pożywieniu, ale też ma zdolność do modulowania przetwarzania pokarmu i magazynowania tłuszczu przez gospodarza.

5. Podsumowanie

The Human Microbiome Project został stworzony, aby przez udoskonalanie i wprowadzanie do badań nowych narzędzi oraz generowanie rzetelnych baz danych rozszerzyć granice naszej wiedzy o mikroorganizmach kolonizujących różne nisze ekologiczne organizmu człowieka. Dostarczając wielu użytecznych informacji na temat roli, jaką pełnią mikroorganizmy w ludzkim ciele i wpływu zmian w ich składzie na nasze zdrowie, mikrobiologia stwarza nowe możliwości, które w przyszłości pozwolą medycynie na pełniejsze zrozumienie podstaw niektórych chorób człowieka, monitorowanie stanu zdrowia, prawidłowe diagnozowanie i skuteczniejsze, kompleksowe leczenie. Zastosowanie pre- i probiotyków w profilaktyce i terapii może okazać się w wielu przypadkach mniej inwazyjną alternatywą w stosunku do obecnie prowadzonych praktyk leczniczych.

Projekt HMP jest również jednym z elementów podejmowanych na całym świecie prób udokumentowania, zrozumienia i reagowania na skutki działalności człowieka – nie tylko odnoszące się do ludzkiego zdrowia, lecz także do ogólnej równowagi w biosferze. Istnieje założenie, że podobnie jak w przypadku mikrobiologicznego monitorowania zmian w lądowych i wodnych ekosystemach, tak i w przypadku organizmu człowieka będą prowadzone szczegółowe badania pozwalające na obserwację różnic i zmian w ekologii mikroorganizmów ludzi z różnych obszarów geograficznych. Między innymi dzięki HMP nadszedł czas, aby wreszcie zniszczyć sztuczną barierę pomiędzy mikrobiologią medyczną a środowiskową i odnieść ogólne zasady z trudem gromadzone przez lata badań nad makro-światem do świata w skali mikro rezydującym w człowieku.

W badaniach HMP nieocenionym źródłem informacji jest przede wszystkim mikroflora jelit, która stanowi najgęstszy ekosystem na Ziemi i zdaje się mieć największy wpływ na różne aspekty fizjologii człowieka oraz tendencję do zapadalności na wiele chorób, nie tylko jelitowych, ale również ogólnoustrojowych, których związek z mikroflorą przez długi czas pozostawał nie-

poznany. Jelita stanowią więc, jeśli chodzi o badania nad „mikroewolucją” człowieka, swego rodzaju naturalne laboratorium.

Na zakończenie warto nadmienić, że HMP został zainicjowany w okresie olbrzymiego technologicznego postępu, gdy koszty sekwencjonowania DNA zaczęły gwałtownie spadać, a znacznie wzrastała przepustowość badań, co umożliwia dziś prowadzenie kompleksowych analiz na ogromną skalę. Przyczynił się także do powszechnego, ogólnościowego wkroczenia mikrobiologii w nową „erę” – erę metagenomiki, która stwarza nieskończone wręcz możliwości dla przyszłych badań nad mikro-światem.

Piśmiennictwo

1. Aziz R.K.: A hundred-year-old insight into the gut microbiome. *Gut. Pathog.* **1**, 21 (2009)
2. Balamurugan R., Rajendiran E., George S., Samuel G.V., Ramakrishna B.S.: Real-time polymerase chain reaction quantification of specific butyrate-producing bacteria, *Desulfovibrio* and *Enterococcus faecalis* in the feces of patients with colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 1298–1303 (2008)
3. Barcenilla A., Pryde S.E., Martin J.C., Duncan S.H., Stewart C.S., Henderson C., Flint H.J.: Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1654–1661 (2000)
4. Bauer E., Williams B.A., Smidt H., Verstegen M.W., Mosenthin R.: Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **7**, 35–51 (2006)
5. Bäckhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., Semenkovich C.F., Gordon J.I.: The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15718–15723 (2004)
6. Bäckhed F., Manchester J.K., Semenkovich C.F., Gordon J.I.: Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 979–984 (2007)
7. Belenguer A., Duncan S.H., Calder A.G., Holtrop G., Louis P., Lobley G.E., Flint H.J.: Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3593–3599 (2006)
8. Benno Y., Endo K., Mizutani T., Namba Y., Komori T., Mitsuoka T.: Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1100–1105 (1989)
9. Carroll I.M., Threadgill D.W., Threadgill D.S.: The gastrointestinal microbiome: a malleable, third genome of mammals. *Mamm Genome*, **20**, 395–403 (2009)
10. Castellarin M., Warren R.L., Freeman J.D., Dreolini L., Krzywinski M., Strauss J., Barnes R., Watson P., Allen-Vercoe E., Moore R.A., Holt R.A.: *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res.* doi:10.1101/gr.126516.111 (2011)
11. Davies J.: In a map for human life, count the microbes, too. *Science*, **291**, 2316 (2001)
12. Dethlefsen L., Eckburg P.B., Bik E.M., Relman D.A.: Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends. Ecol. Evol.* **21**, 517–523 (2006)

13. Dethlefsen L., McFall-Ngai M., Relman D.A.: An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, **449**, 811–818 (2007)
14. Di Sabatino A., Morera R., Ciccocioppo R., Cazzola P., Gotti S., Tinozzi F.P., Tinozzi S., Corazza G.R.: Oral butyrate for mildly to moderately active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* **22**, 789–94 (2005)
15. Dove W.F., Clipson L., Gould K.A., Luongo C., Marshall D.J., Moser A.R., Newton M.A., Jacoby R.F.: Intestinal neoplasia in the ApcMin mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status. *Cancer Res.* **57**, 812–814 (1977)
16. Duncan S.H., Belenguer A., Holtrop G., Johnstone A.M., Flint H.J., Lobley G.E.: Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1073–1078 (2007)
17. Duncan S.H., Louis P., Flint H.J.: Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Lett. Appl. Microbiol.* **44**, 343–350 (2007)
18. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **308**, 1635–1638 (2005)
19. Engle S.J., Ormsby I., Pawlowski S., Boivin G.P., Croft J., Balish E., Doetschman T.: Elimination of colon cancer in germ-free transforming growth factor beta 1-deficient mice. *Cancer Res.* **62**, 6362–6366 (2002)
20. Erdman S.E., Fox J.G. i wsp.: Nitric oxide and TNF-alpha trigger colonic inflammation and carcinogenesis in *Helicobacter hepaticus*-infected, Rag2-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 1027–1032 (2009)
21. Favier C.F., de Vos W.M., Akkermans A.D.: Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe*, **9**(5), 219–229 (2003)
22. Florin T.H., Zhu G., Kirk K.M., Martin N.G.: Shared and unique environmental factors determine the ecology of methanogens in humans and rats. *Am. J. Gastroenterol.* **95**(10), 2872–2879 (2000)
23. Frank D.N., St Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R.: Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13780–13785 (2007)
24. Franks A.H., Harmsen H.J., Raangs G.C., Jansen G.J., Schut F., Welling G.W.: Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3336–3345 (1998)
25. Fricke W.F., Seedorf H., Henne A., Krüer M., Liesegang H., Hedderich R., Gottschalk G., Thauer R.K.: The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis. *J. Bacteriol.* **188**, 642–658 (2006)
26. Gaboriau-Routhiau V., Cerf-Bensussan N. i wsp.: The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, **31**, 677–689 (2009)
27. Gantois I., Ducatelle R., Pasmans F., Haesebrouck F., Hautefort I., Thompson A., Hinton J.C., Van Immerseel F.: Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 946–949 (2006)
28. Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S., Gordon J.I., Relman D.A., Fraser-Liggett C.M., Nelson K.E.: Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, **312**, 1355–1359 (2006)
29. Goodacre R.: Metabolomics of a superorganism. *J. Nutr.* **137**, 259–266 (2007)
30. Haarman M., Knol J.: Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2359–2365 (2006)
31. Handelsman J.: Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 669–685 (2004)
32. Harmsen H.J., Wildeboer-Veloo A.C., Raangs G.C., Wagendorp A.A., Klijn N., Bindels J.G., Welling G.W.: Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**, 61–67 (2006)
33. Hattori M., Taylor T.D.: The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res.* **16**, 1–12 (2009)
34. Hayashi H., Sakamoto M., Benno Y.: Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol.* **46**, 535–548 (2002)
35. Hehemann J.H., Correc G., Barbeyron T., Helbert W., Czjzek M., Michel G.: Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*, **464**, 908–912 (2010)
36. Heilig H.G., Zoetendal E.G., Vaughan E.E., Marteau P., Akkermans A.D., de Vos W.M.: Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 114–123 (2002)
37. Hébuterne X.: Gut changes attributed to ageing: effects on intestinal microflora. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **6**, 49–54 (2003)
38. Hold G.L., Pryde S.E., Russell V.J., Furrie E., Flint H.J.: Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **39**, 33–9 (2002)
39. Huang Y., Suyemoto M., Garner C.D., Cicconi K.M., Altier C.: Formate acts as a diffusible signal to induce *Salmonella* invasion. *J. Bacteriol.* **190**, 4233–4241 (2008)
40. Hughes D.T., Terekhova D.A., Liou L., Hovde C.J., Sahl J.W., Patankar A.V., Gonzalez J.E., Edrington T.S., Rasko D.A., Sperandio V.: Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9831–9836 (2010)
41. Huycke M.M., Gaskins H.R.: Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), **229**, 586–597 (2004)
42. Ivanov I.I., Frutos Rde L., Manel N., Yoshinaga K., Rifkin D.B., Sartor R.B., Finlay B.B., Littman D.R.: Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell. Host. Microbe*, **4**, 337–349 (2008)
43. Ivanov I.I., Littman D.R. i wsp.: Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, **139**, 485–98 (2009)
44. Ivanov I.I., Littman D.R.: Modulation of immune homeostasis by commensal bacteria. *Curr Opin Microbiol.* **14**, 106–14 (2011)
45. Jacobasch G., Schmiedl D., Kruschewski M., Schmehl K.: Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases. *Int. J. Colorectal. Dis.* **14**, 201–11 (1999)
46. Jensen N.S., Canale-Parola E.: *Bacteroides pectinophilus* sp. nov. and *Bacteroides galacturonicus* sp. nov.: two pectinolytic bacteria from the human intestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* **52**, 880–887 (1986)
47. Jones B.V., Begley M., Hill C., Gahan C.G., Marchesi J.R.: Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13580–13585 (2008)

48. Khachatryan Z.A., Ktsoyan Z.A., Manukyan G.P., Kelly D., Ghazaryan K.A., Aminov R.I.: Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. *PLoS One*, **3**, e3064 (2008)
49. Kitahara M., Sakamoto M., Ike M., Sakata S., Benno Y.: *Bacteroides plebeius* sp. nov. and *Bacteroides coprocola* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 2143–2147 (2005)
50. Kostic A.D., Meyerson M. i wsp.: Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.*, doi:10.1101/gr.126573.111 (2011)
51. Kurokawa K., Hattori M. i wsp.: Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* **14**, 169–81 (2007)
52. Lederberg J., McCray A.T.: 'Ome Sweet' Omics – a genealogical treasury of words. *Scientist*, **15**, 8 (2001)
53. Ley R.E., Bäckhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.I.: Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11070–5 (2005)
54. Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I.: Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, **124**, 837–848 (2006)
55. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I.: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, **444**, 1022–1023 (2006)
56. Lunn J.C., Kuhnle G., Mai V., Frankenfeld C., Shuker D.E., Glen R.C., Goodman J.M., Pollock J.R., Bingham S.A.: The effect of haem in red and processed meat on the endogenous formation of N-nitroso compounds in the upper gastrointestinal tract. *Carcinogenesis*, **28**, 685–690 (2007)
57. Maggio-Price L., Treuting P., Zeng W., Tsang M., Bielefeldt-Ohmann H., Iritani B.M.: *Helicobacter* infection is required for inflammation and colon cancer in SMAD3-deficient mice. *Cancer Res.* **66**, 828–38 (2006)
58. Mai V., Colbert L.H., Berrigan D., Perkins S.N., Pfeiffer R., Lavigne J.A., Lanza E., Haines D.C., Schatzkin A., Hursting S.D., Calorie restriction and diet composition modulate spontaneous intestinal tumorigenesis in Apc(Min) mice through different mechanisms. *Cancer Res.* **63**, 1752–1755 (2003)
59. Mai V., Dietary modification of the intestinal microbiota. *Nutr. Rev.* **62**, 235–42 (2004)
60. Mai V., Draganov P.V.: Recent advances and remaining gaps in our knowledge of associations between gut microbiota and human health. *World J. Gastroenterol.* **15**, 81–85 (2009)
61. Mariat D., Firmesse O., Levenez F., Guimaraes V., Sokol H., Doré J., Corthier G., Furet J.P.: The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.*, **9**, 123 (2009)
62. Martín R., Langa S., Reviriego C., Jiménez E., Marín M.L., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M.: Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* **143**, 754–758 (2003)
63. Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Takada T., Tanaka R.: Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7220–7228 (2004)
64. Matsumiya Y., Kato N., Watanabe K., Kato H.: Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J. Infect. Chemother.* **8**, 43–49 (2002)
65. Mazmanian S.K., Liu C.H., Tzianabos A.O., Kasper D.L.: An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, **122**, 107–118 (2005)
66. McGarr S.E., Ridlon J.M., Hylemon P.B.: Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature. *J. Clin. Gastroenterol.* **39**, 98–109 (2005)
67. McNeil N.I.: The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**, 338–342 (1984)
68. Mihajlovski A., Alric M., Brugère J.F.: A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the mcrA gene. *Res. Microbiol.* **159**, 516–521 (2008)
69. Nicholson J.K., Holmes E., Wilson I.D.: Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 431–438 (2005)
70. Qin J., Wang J. i wsp.: A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, **464**, 59–65 (2010)
71. Palmer C., Bik E.M., DiGiulio D.B., Relman D.A., Brown P.O., Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* **5**, 177 (2007)
72. Peterson J., Guyer M. i wsp.: The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* **19**, 2317–2323 (2009)
73. Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S., Medzhitov R.: Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, **118**, 229–241 (2004)
74. Relman D.A., Falkow S.: The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology. *Trends Microbiol.* **9**, 206–208 (2001)
75. Relman D.A.: New technologies, human-microbe interactions, and the search for previously unrecognized pathogens. *J. Infect. Dis.* **186**, S254–258 (2002)
76. Reyes A., Haynes M., Hanson N., Angly F.E., Heath A.C., Rohwer F., Gordon J.I.: Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, **466**, 334–338 (2010)
77. Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zanon S., Matteuzzi D.: Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6150–6158 (2005)
78. Salyers A.A., West S.E., Vercellotti J.R., Wilkins T.D.: Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 529–533 (1977)
79. Savage D.C.: Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 107–133 (1977)
80. Scanlan P.D., Shanahan F., Marchesi J.R.: Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using mcrA gene analysis. *BMC Microbiol.* **8**, 79 (2008)
81. Sekirov I., Tam N.M., Jogova M., Robertson M.L., Li Y., Lupp C., Finlay B.B.: Antibiotic-induced perturbations of the intestinal microbiota alter host susceptibility to enteric infection. *Infect. Immun.* **76**, 4726–4736 (2008)
82. Sela D.A., Mills D.A.: The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 18964–18969 (2008)
83. Shade A., Handelsman J.: Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol.* doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x. (2011)
84. Stams A.J.: Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **66**, 271–294 (1994)
85. Stewart J.A., Chadwick V.S., Murray A.: Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria

- in the faecal microflora of children. *J. Med. Microbiol.* **54**, 1239–42 (2005)
86. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I.: The human microbiome project. *Nature*, **449**, 804–810 (2007)
87. Turnbaugh P.J., Bäckhed F., Fulton L., Gordon J.I.: Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell. Host. Microbe*, **3**, 213–223 (2008)
88. Turnbaugh P.J., Gordon J.I. i wsp.: A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, **457**, 480–484 (2009)
89. Uronis J.M., Mühlbauer M., Herfarth H.H., Rubinas T.C., Jones G.S., Jobin C.: Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One*, **4**, e6026 (2009)
90. Van de Merwe J.P., Stegeman J.H., Hazenberg M.P.: The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49**, 119–124 (1983)
91. Wang X., Heazlewood S.P., Krause D.O., Florin T.H.: Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 508–20 (2003)
92. Watson A.J., An overview of apoptosis and the prevention of colorectal cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **57**, 107–121 (2006)
93. Zhu B., Wang X., Li L.: Human gut microbiome: the second genome of body. *Protein Cell*, **1**, 718–725 (2010)
94. Zoetendal E.G., Akkermans A.D., De Vos W.M.: Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3854–3859 (1998)
95. Zoetendal E.G., Akkermans A.D.L., Akkermans-van Vliet W.M., de Visser J.A.G.M., de Vos W.M.: The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb. Ecol. Health. Dis.* **13**, 129–134 (2001)
96. Zoetendal E.G., Vaughan E.E., de Vos W.M.: A microbial world within us. *Mol. Microbiol.* **59**, 1639–1650 (2006)
97. <http://commonfund.nih.gov/Hmp/>

Artur Franczuk¹, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka^{1*}

¹Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego, 02-096 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

Wpłynęło w kwietniu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Podłoże genetyczne i immunologiczne CD. 2.1. Podłoże genetyczne choroby Leśniowskiego-Crohna. 2.2. Defensyny. 2.3. Nabłonkowa bariera jelitowa. 3. Rola mikroflory jelit w indukcji CD. 3.1. Zmiany dysbiotyczne. 3.2. Organizacja przestrzenna mikroorganizmów flory jelit. 4. Przyszłość metagenomiki w badaniu CD. 5. Podsumowanie

Role of microbiota in Crohn's disease induction in the light of studies of Human Microbiome Project

Abstract: Crohn's disease (CD) is an inflammatory disorder which develops as a result of dysregulated interactions between gut microbiota and immune system. Because bacterial involvement in this illness is certain and classic methods of growing microorganisms are insufficient to clarify their impact on disease induction, metagenomics, as a culture-independent technique, provides revolutionary approach. This method become pivotal tool for a large project aiming at describing whole human microbiota – Human Microbiome Project (HPM). Studies on pathologically changed gut microbiota of CD patients involving metagenomic strategy provide profound analysis of intestinal microbial structure as well microbial localization. The review article also presents various aspects of the immune system functioning – such as genetic predispositions, dysregulated defensin secretion, poor epithelial barrier integrity, which contribute to improper immunological answer and promotion of inflammation.

1. Introduction. 2. Genetic and immunological basis. 2.1. Genetic basis of CD. 2.2. Defensins. 2.3. Gut epithelial barrier. 3. Role of microbiota in CD induction. 3.1. Dysbiotic changes. 3.2. Spatial organization of gut microorganisms. 4. Future of metagenomics in studies on CD. 5. Summary.

Słowa kluczowe: metagenomika, choroba Leśniowskiego-Crohna, mikroflora, HMP, dysbioza

Key words: metagenomics, Crohn's disease, comensals, microbiota, HMP, dysbiosis, inflammation

1. Wstęp

Człowiek nie jest sam – stwierdzenie to zdaje się najlepiej potwierdzać fakt, że ciało ludzkie stanowi niezwykle bogaty i złożony układ ekologiczny, na który składa się ogromna liczba mikroorganizmów, chociaż bakterie stanowią zaledwie od 1% do 2% masy ciała człowieka. Dlatego uzasadnione jest używanie, w odniesieniu do człowieka, określenia „superorganizm”, na którego genom składają się nie tylko geny *H. sapiens*, ale również geny naszych mikroskopijnych towarzyszy (tzw. mikrobiom). Komórek ludzkich w organizmie człowieka jest dziesięć razy mniej niż komórek mikroorganizmów, a liczba genów mikroorganizmów kolonizujących organizm człowieka stokrotnie przewyższa liczbę genów genomu ludzkiego. Ogromna liczba komensali wywiera znaczący wpływ na funkcjonowanie ludzkiego organizmu, między innymi modulując działanie układu immunologicznego, wpływając na proliferację komórek nabłonkowych czy wzbogacając całkowity metabolom, co ma istotne znaczenia dla fizjologii i stanu zdrowia człowieka.

Przeszkodą, która stoi na drodze do dokładnego zbadania tych mikroorganizmów jest fakt, że większość

z nich jest niehodowlalna *ex vivo*. Rozwiązanie tego problemu przynosi metagenomika, dziedzina biologii odnosząca się do metod badań struktur i funkcji mikrobiologicznych zbiorowisk i stwarzająca możliwość bezpośredniej analizy genomów. Termin metagenomika został zaproponowany przez prof. Jo Handelsman w roku 1998 dla opisanego strategii sekwencjonowania DNA izolowanego bezpośrednio ze środowisk naturalnych [16].

Jednym z projektów metagenomowych jest HMP (Human Microbiome Project), który ma na celu dokładne zbadanie pięciu najważniejszych nisz mikroflory człowieka. Jedną z nich jest populacja mikroorganizmów bytujących w jelicie, która jest najliczniejsza i najbardziej różnorodna. Wykazano wiele korelacji pomiędzy zmianami w składzie tej mikroflory a różnymi schorzeniami, głównie chorobami zapalnymi jelita, w tym CD (Crohn's disease, choroba Leśniowskiego-Crohna), nieswoistego, przewlekłego procesu zapalnego ściany przewodu pokarmowego (zwykle końcowego odcinka jelita krętego i początkowego odcinka okrężnicy) o niezwykle złożonej etiologii. Uważa się, że do rozwoju choroby mogą przyczyniać się czynniki zakaźne, autoimmunologiczne, środowiskowe, genetyczne, alergiczne i psychosomatyczne. Obserwowane

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii UW, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

objawy kliniczne choroby to bóle brzucha, przewlekła biegunka, krwawienie oraz zaburzenia wchłaniania [30].

Obecna praca omawia rolę, jaką spełniają bakterie jelitowe w indukcji chorób zapalnych na przykładzie CD w oparciu, między innymi, o dane uzyskane z analiz metagenomowych realizowanych w ramach HMP.

2. Podłoże genetyczne i immunologiczne CD

W świetle niedawno opublikowanych danych wiadomym już jest, że wystąpienie CD jest głównie wynikiem nieprawidłowych oddziaływań pomiędzy mikroflorą jelitową a układem immunologicznym śluzówki jelit. Analizowane są dwie hipotezy opisujące to zjawisko. Pierwsza z nich za przyczynę wystąpienia objawów chorobowych uznaje nieprawidłowe funkcjonowanie systemu immunologicznego. Zwolennicy drugiej hipotezy uważają, że zmiany w składzie mikroorganizmów jelitowych powodują obniżenie tolerancji ze strony układu immunologicznego. Istotną rolę w rozwoju choroby odgrywa także obniżenie szczelności bariery nabłonkowej śluzówki [51]. Najprawdopodobniej wystąpienie zaburzeń ma wielorakie przyczyny.

2.1. Podłoże genetyczne choroby Leśniowskiego-Crohna

Wśród 71 loci predysponujących do zachorowania na CD, największe znaczenie wydają się mieć polimorfizmy w obrębie genu *NOD2/CARD15* (nucleotide-binding oligomerization caspase recruitment domain 15) [13]. Jego białkowy produkt to wewnątrzkomórkowy receptor należący do grupy PRR (pattern recognition receptor), zawierający na N-końcu dwie domeny CARD, centralnie położoną domenę NBD (nucleotide binding domain) oraz rejon bogaty w powtórzenia leucynowe, tzw. LRR (leucine rich region) [19]. Białko *NOD2* jest zaangażowane w regulację wytwarzania czynników prozapalnych zależnych od NF- κ B (nuclear factor κ B) w odpowiedzi na stymulację przez fragmenty bakteryjnego peptydoglikanu [20]. Rozpoznanie ligandu skutkuje indukcją szlaków transdukcji sygnału czego końcowym rezultatem jest aktywacja NF- κ B [23] – kluczowego czynnika transkrypcyjnego, odpowiedzialnego za uruchomienie ekspresji genów związanych z indukcją stanu zapalnego.

Zidentyfikowano trzy niezależne, jednonukleotydowe polimorfizmy *NOD2*: Arg702Trp, Gly908Arg i Leu1007fsinsC uznawane za czynniki ryzyka wystąpienia CD [17]. Polimorfizmy te znajdują się w obrębie fragmentu genu kodującego domenę LRR białka lub w jego pobliżu [18], skutkiem czego następuje nieprawidłowe rozpoznanie ligandów mikroorganizmów [21]. Wzrost ryzyka rozwoju CD dla homozygot niosących te warianty genu *NOD2* może być nawet czterdziestokrotny [62].

Z drugiej strony, niektóre dane eksperymentalne zaprzeczają znaczeniu polimorfizmów *NOD2* w indukcji CD. Wykazano podwyższoną aktywność NF- κ B w makrofagach blaszki właściwej jelita dotkniętego CD [59] a penetracja tego genu jest względnie niewielka, nawet u osób posiadających dwa zmutowane warianty *NOD2* [18].

Otrzymane dane eksperymentalne dowodzą, że SNPy (single-nucleotide polymorphism) genu *NOD2* nie są jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za wystąpienie objawów chorobowych a wyjaśnienie przyczyn tej choroby wymaga dalszych badań – zwłaszcza, że istnieje aż 71 loci predysponujących do zachorowania na CD [13].

2.2. Defensyny

W funkcjonowaniu wrodzonego układu odpornościowego bardzo istotną rolę odgrywają działające w świetle jelita defensyny będące przeciwdrobnoustrojowymi peptydami (AMP – antimicrobial peptides) wytwarzane przez różnorodne komórki wielu tkanek różnych organizmów. Defensyny są małymi (3–5 kDa) peptydami przeciwdrobnoustrojowymi o strukturze β -harmonijki, zawierającymi zwykle sześć reszt cysteinowych połączonych trzema mostkami dwusiarczkowymi. Obecnie znamy około 550 defensyn, należących do trzech klas: α -, β -, i θ -różniących się strukturą i liczbą mostków dwusiarczkowych [65]. Wystąpienie CD jest wyraźnie związane z deficytem tych małych peptydów o aktywności przeciwbakteryjnej [64]. Zarówno w typie choroby, który dotyczy jelita krętego, jak i w typie dotyczącym okrężnicy wykazano obniżony poziom aktywności antybakteryjnej ekstraktów peptydowych z biopsji [35]. Jednakże, w zależności od rejonu, w którym rozwinął się stan zapalny, deficyt ten dotyczył defensyn różnych klas [64].

Jeden z godnych uwagi modeli patogenezy CD przyjmuje, że nadmierna liczba komórek bakterii związana z obniżeniem poziomu defensyn zaburza równowagę pomiędzy mikroflorą a nabłonkiem, i skutkuje intensywnymi procesami adhezji bakterii do powierzchni nabłonka, dokonaniu inwazji i wywołaniu stanu zapalnego [64]. Mechanizm, w jaki bakterie wpływają na obniżenie poziomu produkowanych w jelicie defensyn pozostaje nadal nie całkiem wyjaśniony. Wykazano np. że *Shigella flexnerii* moduluje poziom ekspresji genów kodujących przeciwdrobnoustrojowe peptydy wykorzystując białka układu sekrecyjnego typu III [49].

2.3. Nabłonkowa bariera jelitowa

Utrzymanie właściwej homeostazy w przewodzie pokarmowym jest zależne od prawidłowego funkcjonowania nabłonkowej bariery jelitowej, która oddziela przestrzeń układu pokarmowego od tkanek gospodarza,

jednocześnie umożliwiając oddziaływania pomiędzy nimi – np. pozwalając na interakcje pomiędzy mikroorganizmami a układem immunologicznym [32].

Nabłonek jelitowy chorych na CD cechuje zwiększona przepuszczalność [39], co koresponduje z odkryciem zjawiska redystrybucji białek AJC (apical junctional complex) – istotnego regulatora funkcji bariery nabłonkowej [15].

K o s o v a c i wsp. wykazali, że obecność zmutowanego wariantu genu *NOD2* jest związana z translokacją komórek drobnoustrojów (i/lub ich składników) przez śluzówkę jelitową, objawiającą się wzmożoną aktywnością szlaku prozapalnego zależnego od NF-κB [24]. Natomiast z badań wykonanych z wykorzystaniem linii komórkowych wiemy, że stan zapalny prawdopodobnie wpływa niszcząco na jelitową barierę nabłonkową [43].

Dokonując syntezy powyższych informacji, należy zaznaczyć, że omawiane schorzenie jest wynikiem utraty regulacji odpowiedzi immunologicznej wobec komensalnych mikroorganizmów jelita grubego, na co składa się wiele czynników – nieprawidłowe rozpoznanie bakterii (dysfunkcja *NOD2*) i nieprawidłowa sekrecja defensyn prowadzą do naruszenia bariery nabłonkowej, a to z kolei promuje stan zapalny, ponieważ bakteryjne antygeny ze światła jelita dostarczane są komórkom immunologicznym i odpowiednim receptorom.

3. Rola mikroflory jelit w indukcji CD

Dane eksperymentalne otrzymane podczas realizacji pierwszych etapów projektu HMP wskazują, że kompozycja mikroorganizmów kolonizujących jelita danego osobnika jest powiązana jest z jego stanem fizjologicznym. Zmiany ilościowe, jakościowe i związane z lokalizacją poszczególnych grup bakterii wchodzących w skład mikroflory jelitowej przypuszczalnie powodują nieprawidłową stymulację układu immunologicznego. Dlatego tak istotna jest dokładna i kompleksowa analiza mikroflory jelitowej. Zgodnie z zamierzeniem HMP będzie ona przeprowadzona przy użyciu technik metagenomowych. Jednym z celów projektu HMP jest znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy dana kompozycja i proporcje drobnoustrojów kolonizujących konkretny obszar jelit determinują rozwój chorób zapalnych, takich jak CD. Wiedza zdobyta w szczegółowych badaniach składu mikroflory potencjalnie będzie mogła być wykorzystana zarówno w diagnostyce jak i terapii choroby, w projektowaniu leków w postaci pre-, pro- i synbiotyków.

3.1. Zmiany dysbiotyczne

Nieodłącznym zjawiskiem związanym z występowaniem CD oraz innych chorób zapalnych jelit są znaczące zmiany w składzie mikroflory, czyli tzw. dysbioza [22, 42, 53].

Techniki wykorzystujące sekwencje nukleotydowe genów 16S rRNA udokumentowały, że sekwencje nukleotydowe charakterystyczne dla typów *Firmicutes* i *Bacteroidetes* stanowią ponad 98% wszystkich analizowanych w tych badaniach [10]. Dalsze eksperymenty wykazały, że wystąpienie CD jest skorelowane ze spadkiem liczby Gram-dodatnich bakterii typu *Firmicutes* (szczególnie grupy *Clostridium leptum*) oraz wzrostem liczby drobnoustrojów typu *Bacteroidetes*, obejmującego bakterie Gram-ujemne [2, 61], jak również z występowaniem nowych, jak dotąd niesklasyfikowanych gatunków, których liczba przewyższała liczbę występującą w grupie kontrolnej nawet trzykrotnie [28].

Niewykluczone jest, że efektem zmniejszenia liczby bakterii Gram-dodatnich jest kompensacyjny wzrost liczby bakterii Gram-ujemnych, które silniej oddziałują na układ immunologiczny ze względu na obecność lipopolisacharydu [28]. Co więcej, metagenomowy „screening” mikroflory chorego jelita pacjentów dotkniętych CD wykazał, że zawiera ona wiele niepatogennych bakterii, które w sposób wzmożony wpływają na ludzki układ odpornościowy, np. *Bacteroides vulgatus* [27], jak również charakteryzuje się zmniejszoną liczbą bakterii „protektynnych”, wykazujących właściwości przeciwzapalne, np. *Faecalibacterium prausnitzii* (dawniej *Fusobacterium prausnitzii*) [22, 53].

Jednocześnie ze stwierdzonym spadkiem liczby przedstawicieli typu *Firmicutes*, zaobserwowano zredukowaną liczbę bakterii gatunków *Clostridium leptum* i *Clostridium coccooides*, które należą do wymienionego typu [2, 28]. Bakterie rodzaju *Clostridium* grupy XIVa i IV produkują duże ilości maślanu [3], który nie tylko pełni niezwykle ważną rolę źródła energii dla kolonocytów [41], ale wpływa także na zahamowanie aktywności czynnika NF-κB – tym samym obniżając poziom cytokin prozapalnych [44]. Co więcej, indukując produkcję mucyny i antybakteryjnych peptydów oraz wzmacniając ściśle połączenia pomiędzy komórkami nabłonka, poprawiają wydatnie stan bariery śluzówkowej [59]. Nieprawidłowe ilości maślanu rzutują również na proliferację innych gatunków drobnoustrojów u osób cierpiących na omawianą chorobę. Spadek liczby mikroorganizmów rodzaju *Clostridium* odnotowano u pacjentów z remisją CD, co sugeruje, że zmiana ta jest pierwotna i wpływa na późniejsze perturbacje mikroflory oraz na rozwój stanu zapalnego [28].

Wartym uwagi przedstawicielem grupy IV rodzaju *Clostridium* jest gatunek *Faecalibacterium prausnitzii*, którego ilościowy spadek w porównaniu do osób zdrowych, został wykryty u pacjentów z aktywną chorobą Leśniowskiego-Crohna [22, 53]. Redukcję liczby komórek tego gatunku drobnoustrojów skorelowano ze zwiększonym ryzykiem pooperacyjnego nawrotu CD obejmującego jelito kręte. Dodatkowo, bakterię tę charakteryzują dwie cechy, których brak jest koherentny

z patologią CD – *F. prausnitzii* wykazuje bowiem aktywność przeciwwapalną oraz posiada zdolność produkcji maślanu [48].

Odpowiednio wysoki poziom różnorodności mikroflory jelitowej jest niezwykle ważny, ponieważ wywołuje redundancję pełnionych przez bakterie funkcji, która gwarantuje przeprowadzanie kluczowych procesów w tym środowisku [31]. Generalnie akceptowany jest, bazujący na wynikach metagenomowych badań porównawczych, pogląd, że mikroflora osób cierpiących na choroby zapalne jelita odznacza się mniejszą różnorodnością w porównaniu do mikroflory kolonizującej jelita zdrowego człowieka. Dotyczy to zarówno mikroorganizmów fekalnych jak i tych związanych ze śluzówką, tworzących biofilm [42, 46]. W przypadku biofilmu osób cierpiących na CD, po ustaleniu jego bioróżnorodności na podstawie analiz nukleotydowych sekwencji genu 16S rRNA, wykazano, że jest on znacznie uboższy w gatunki bakterii niż biofilm pochodzący od osób zdrowych. Badacze podejrzewają, że powodem niskiego poziomu różnorodności mikroflory przylegającej do śluzówki są zakłócające równowagę mikrobiologiczną przemiany metaboliczne [36].

Porównano także stan mikrobiologiczny biopłatów pochodzących z tkanek osób zdrowych i tkanek osób chorych: tych dotkniętych stanem zapalnym oraz bez stanu zapalnego. Najwyższy poziom różnorodności mikrobiologicznej wykazuje zdrowa tkanka osoby chorej a najniższy – tkanka, w której rozwinął się stan zapalny. Sugeruje to, że wraz z rozwojem odpowiedzi immunologicznej skład mikroflory ulega zubożeniu, mimo, że pierwsze zmiany patologiczne wywoływały wzrost różnorodności mikrobiologicznej. S e p h e r i i wsp. interpretując przedzapalny etap podniesienia poziomu różnorodności, wskazują na rekrutację przejściowej populacji mikroorganizmów, które mogą mieć kluczowe znaczenie w patogenezie CD [46].

Pierwsze dane eksperymentalne wskazują na obniżenie liczby komórek także innych gatunków drobnoustrojów zaobserwowany u chorych na CD. Należą do nich: *Bacillus vulgatus*, *Bacteroides fragilis* [55], *B. uniformis* [9], *Bifidobacterium adolescentis*, *Dialister invisus* [22], *Faecalibacterium*, *Subdoligranula*, *Lachnospiraceae* [4] i niescharakteryzowane gatunki z grupy *Clostridium* XIVa [22]. Zaobserwowano także wzrost liczby bakterii przedstawicieli typów *Proteobacteria*, *Actinobacteria* [12], rodziny *Enterobacteriaceae*, oraz gatunków *Eubacterium halii*, *E. cylindroides* [53] i *Ruminococcus gnavus* [22].

Bezwzględnie, analizując zmiany dysbiotyczne mikroflory chorych na CD należy uwzględnić zmiany składu drobnoustrojów w czasie. Wykazano, że mikroflora osób chorych na CD jest mniej stabilna niż osób zdrowych. Badacze koncentrują się w szczególności na analizie zmian liczby bakterii rodzajów *Clostridium* i *Bacteroides*. Porównanie kompozycji mikroflory osób z aktywną

chorobą do składu mikroflory osób z jej remisją można ułatwić identyfikację grup bakterii mających istotny udział w rozwoju stanu zapalnego [43].

Kilka grup badawczych w sposób niezależny udokumentowało ostatnio, że rozwój CD może być związany z występowaniem niektórych szczepów gatunku *E. coli* [29, 52], co znalazło potwierdzenie w analizach metagenomowych (identyfikacja 16S rDNA *E. coli*) [4]. Analiza biopłatów okrężnicy pobranych od osób dotkniętych CD wykazała obecność wielu drobnoustrojów wewnątrz warstwy śluzówkowej, z czego ponad 50% stanowiły bakterie gatunku *E. coli* [29]. U osób zdrowych ten gatunek drobnoustrojów stanowi mniej niż 1% ogólnej mikroflory jelitowej [40]. Dodatkowo, znaczenie *E. coli* w przebiegu CD potwierdza fakt znacznie podwyższonego poziomu przeciwciał skierowanych przeciwko flagelinie tego mikroorganizmu u osób chorych [48]. *E. coli* wykrywana w tkankach pacjentów cierpiących na CD należy do grupy filogenetycznej B2 i D [25] i charakteryzuje się wieloma nietypowymi właściwościami fenotypowymi/genotypowymi. Biorąc pod uwagę nietypowe patogenne właściwości tej bakterii, nadano jej nazwę AIEC (adherent-invasive *Escherichia coli*) i uznano ją za nowy patotyp gatunku *E. coli* [5]. Komórki tego wiro/patotypu *E. coli* są zdolne do adhezji i inwazji do komórek nabłonka śluzówki na drodze makropinocytozy. W procesach adhezji i inwazyjności istotną rolę odgrywają dwa receptory komórek nabłonkowych, białko CEACAM6 (carcinoembryonic antigen-related cell-adhesion molecule) i białko opiekuńcze GP96, oraz wytwarzane pęcherzyki błony zewnętrznej OMV (outer membrane vesicles) dostarczające do komórek nabłonkowych białka bakteryjne. Nadekspresja genu kodującego CEACAM6 może być cechą predysponującą do wystąpienia CD [42]. Po indukcji lizy błony endosomu bakterie namnażają się w cytoplazmie komórek gospodarza. AIEC *E. coli* pokonuje barierę śluzówki jelit także przez komórki M kępek Peyera [40] a pierwsze uszkodzenia tkanek w CD dotyczą właśnie rejonu kępek Peyera [14]. W warstwie podśluzówkowej, komórki bakteryjne dokonują inwazji makrofagów i bez przeszkód proliferują w ich wnętrzu – zademonstrowano tę ich cechę zarówno w eksperymentach wykonanych *in vitro* [6] jak i *in vivo* [26]. Inwazja nie powoduje apoptozy wspomnianych komórek żernych, jednakże charakteryzują się one zaburzoną sekrecją cytokiny prozapalnej TNF- α (tumour necrosis factor alpha), podwyższonym poziomem wydzielania IL-23 i obniżonym IL-10. Zmiany te mogą mieć udział w wywoływaniu stanu zapalnego [7]. Szczepy AIEC prawdopodobnie odgrywają rolę w początkowych stadiach rozwoju choroby [46], można je więc uznać za pierwotny czynnik etiologiczny CD. Wielu nowych informacji dostarczyła pełna sekwencja nukleotydowa genomu AIEC, na który składa się chromosom o wielkości 4.77 Mb i plazmid

o wielkości 108 Kb. Organizacja genomu tego patotypu jest podobna do genomów innych patotypów *E. coli* – głównie do genomu szczepów APEC (avian pathogenic *E. coli*). Genom AIEC zawiera cztery wyspy patogenności (PAI I–IV), które kodują m.in. białka systemu sekrecji typu IV, białka fimbrinopodobne, adhezynę FimH, proteazy serynowe, białka wykorzystywane w procesie inwazji, czynnik specyficzny dla kępek Peyera (Peyer's patch-specific factor) oraz białka o niepoznanej funkcji [33]. Przeprowadzone ostatnio eksperymenty porównawczej genomiki dostarczyły odmiennych danych dotyczących wiotypów *E. coli* kolonizujących jelita pacjentów chorych na CD. Autorzy porównali metodami hybrydyzacji genomy trzynastu szczepów *E. coli* izolowanych od pacjentów ze stanami zapalnymi jelit (IBD – inflammatory bowel disease), w tym CD, z sekwencjami nukleotydowymi trzydziestu jeden komensalnych i patogennych *E. coli* o zsekwencjonowanych genomach. Wyniki eksperymentów wskazują na heterogenność populacji *E. coli* izolowanych od chorych, co może oznaczać trudności w identyfikacji markerów genetycznych przydatnych w diagnozie choroby [61].

Nie tylko adherento-inwazyjne szczepy *E. coli* znajdują się na liście potencjalnych czynników etiologicznych CD. Wśród innych wymienić można *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori* [11], *Chlamydia pneumoniae* [8]. Kontrowersyjne są dane eksperymentalne dotyczące udziału fakultatywnego wewnątrzkomórkowego patogenu *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* w indukcji CD. W zależności od grupy badawczej i zastosowanej techniki wykrywania patogenu stwierdzano jego obecność lub brak u osób chorych [1]. Dodać też można, że pomimo niekiedy bardzo silnych korelacji obecności *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* z występowaniem CD, terapie skierowane przeciwko tej bakterii nie przynoszą poprawy zdrowia pacjentów [58]. Z drugiej strony udokumentowano wysoki poziom przeciwciał specyficznych w stosunku do antygenów tego gatunku bakterii w surowicy chorych [34].

Pomimo wielu wnikliwych badań dotyczących dysbiozy, nadal trudno jest jednoznacznie stwierdzić, czy jest ona przyczyną stanu zapalnego, czy też jedynie wtórnym efektem zmian chorobowych [57]. Badania, wykazujące zmiany dysbiotyczne u osób zdrowych spokrewnionych z chorymi na CD [22] zdają się przechylać szalę wagi na korzyść teorii, mówiącej o dysbiozie jako przyczynie choroby i świadczą o wpływie czynników genetycznych bądź środowiskowych na jej rozwój [57], aczkolwiek pełne wyjaśnienie problemu wymaga dalszych badań. Jak dotąd udało się stwierdzić, że: a) skomplikowana, ale zrównoważona pod względem składu gatunkowego mikroflora, której kompozycja ulega zaburzeniu, wykazuje zakłócone relacje pomiędzy specyficznymi grupami bakteryjnymi; redukcja pewnej grupy bakterii pociąga za sobą wzrost liczby

bakterii innej grupy, co może mieć negatywny wpływ na zdrowie gospodarza, b) nieprawidłowe ilości (niedobór lub nadmiar) pewnych substancji produkowanych przez mikroorganizmy jelitowe mają wpływ na organizm gospodarza, c) anomalie w zwykle stabilnej kompozycji mikroflory utrudniają gospodarzowi rozpoznawanie mikroorganizmów jako „swoich”, d) zmiany dysbiotyczne charakterystyczne dla CD zdają się również dotyczyć wzrostu liczby bakterii o wzmożonej sile oddziaływania na układ immunologiczny. Jednocześnie, obserwuje się spadek liczby bakterii, które posiadają właściwości łągoczące w odniesieniu do stanu zapalnego.

Dalsze badania powinny także ustalić czy rzeczywiście konkretny patogen może indukować zmiany dysbiotyczne w normalnej mikroflorze. Najbardziej wiarygodną wydaje się hipoteza wskazująca na adherento-inwazyjne szczepy *E. coli* jako istotny czynnik etiologiczny rozwoju CD.

3.2. Organizacja przestrzenna mikroorganizmów flory jelit

Żeby dokładnie scharakteryzować mikroflorę jelitową, wiedzę o jej kompozycji warto dopełnić informacją o usytuowaniu poszczególnych grup mikroorganizmów w przestrzeni.

Techniki, które pozwalają na takie badania wymagają przeprowadzenia na próbce biopsyjnej FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), wizualizacji za pomocą barwnika DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole), fotodokumentacji i kwantyfikacji. Dzięki użyciu wielu sond specyficznie wykrywających przedstawicieli różnych grup bakteryjnych i odpowiednio przygotowanego biopłynu, można z łatwością określić miejsce bytowania danej grupy bakterii. Co więcej – równoczesne użycie dodatkowych barwników obok DAPI, daje możliwość zbadania relacji przestrzennych pomiędzy danymi grupami mikroorganizmów, jak również pozwala na porównanie ich rozmieszczenia w stosunku do makroskopowych zmian tkankowych [53, 55].

U cierpiących na CD istotne znaczenie ma analiza biofilmu, jako że bakterie tworzące biofilm bezpośrednio oddziałują z żywą tkanką. Porównanie danych eksperymentalnych otrzymanych z użyciem metody FISH ze zmianami makroskopowymi, wykazało, że integralność i grubość biofilmu wzrastały wraz ze wzrostem koncentracji bakterii śluzówkowych [52]. Ponadto, sygnały sond wykrywających przedstawicieli grupy *Bacteroides* w biofilmie stanowiły nawet do 80% wszystkich sygnałów wykrywających bakterie zaadherowane do śluzówki, z czego najczęściej pojawiającym się mikroorganizmem był gatunek *Bacteroides fragilis* [55] – mikroorganizm podejrzany o udział w wywoływaniu CD [38]. Wykazano również obecność adherentnych *E. coli*, które występowały w postaci miejscowych, niemalże

jednorodnych prążków (ang. band) – jednakże tylko u niektórych pacjentów. W obrębie biofilmu pojawiały się także w mniejszych, ale nadal znaczących ilościach takie gatunki bakterii jak *Eubacterium rectale*, *Enterococcus faecalis* i *Faecalibacterium prausnitzii* (dawniej *Fusobacterium prausnitzii*) [55].

Bazując na technice FISH, Swidsinski i wsp. odkryli wiele interesujących różnic pomiędzy dystalną a proksymalną częścią okrężnicy zdrowych myszy, co może mieć znaczenie przy badaniu chorób zapalnych jelita grubego [53]. Mikroorganizmy obu regionów różnią się między sobą przede wszystkim położeniem względem ścianki jelita. O ile w proksymalnej części okrężnicy drobnoustroje komensalne cechuje bezpośredni kontakt ze ścianką, tak w części dystalnej sytuacja jest odwrotna. Wziąwszy pod uwagę fakt, iż zapalenie jelita grubego częściej dotyka regionu dystalnego okrężnicy [21], wysunięto przypuszczenie, że owa styczność mikroorganizmów do ścianki jelita jest czynnikiem wpływającym na wytworzenie tolerancji organizmu gospodarza [53].

Skład mikroflory fekalnej i zasocjowanej ze śluzówką różni się nie tylko pod względem kompozycji jakościowej, ale również ilościowo. Technika FISH z użyciem sond uniwersalnych (wykrywających z założenia 16S rRNA wszystkich bakterii), wykazała wyższą koncentrację komórek bakteryjnych przylegających do śluzówki u pacjentów z CD w porównaniu do grupy kontrolnej [52, 55], w dodatku zwiększającą się wraz z stanem zaawansowania odczynu zapalnego [52]. Przeciwnie zjawisko, tj. zmniejszenie liczby bakterii, zaobserwowano przy szacowaniu liczby komórek bakteryjnych masy fekalnej okrężnicy [53].

4. Przyszłość metagenomiki w badaniu CD

Całościowe analizy materiału genetycznego danego środowiska, czyli metagenomika, bez wątplenia dostarczyły cennych danych dotyczących mikroflory jelit dotkniętych stanem zapalnym, a jej przyszły wkład w zrozumienie procesów indukcji choroby bez wątpienia może okazać się znaczący. Niżej podano przyszłe cele badań metagenomowych mogących przyczynić się do zrozumienia patogenezы CD [25, 37]. Obejmują one: a) zdefiniowanie na różnych poziomach rozdzielczości lokalizacji mikroorganizmów w jelitach; przeprowadzenie badań porównawczych zmian przestrzennego rozmieszczenia mikroorganizmów, b) opracowanie strategii badania ludzkiej mikroflory przeniesionej do jelit gnotobiotycznych myszy, c) przeprowadzenie systemowych analiz meta-proteomicznych, meta-transkryptomicznych i meta-metabolomicznych populacji mikroorganizmów jelita, e) przeprowadzenie badań mikroflory bliźniąt jednojajowych różniących się występowaniem nieswoistej choroby zapalnej jelita, f) identyfikacja

biomarkerów różnych stadiów CD i wykorzystanie ich w ocenie ryzyka zapadalności na CD, określaniu fazy choroby, przewidywaniu i indywidualizacji terapii.

5. Podsumowanie

Ogólnym celem badań dotyczących przebiegu patogenezы CD jest zrozumienie interakcji bakterii z gospodarzem. Istotnym elementem tych badań jest charakterystyka mikroflory w stanie dysbiozy jelitowej i połączenie tych zmian z dysfunkcją nabłonka, zaburzonym usuwaniem bakterii i zmianami genotypu gospodarza skutkującymi zachwianiem procesów immunoregulacyjnych. Należy także wyjaśnić, czy pierwotnym inicjatorem choroby są bakterie czy nieprawidłowo funkcjonujący układ immunologiczny. Innowacyjność podejścia metagenomicznego w badaniach nad patogenezą tego schorzenia polega na ucieczce od tradycyjnego zawężania uwagi do jednego gatunku bakterii (głównie patogennych), stanowiących czynnik etiologiczny danej choroby, na rzecz złożonych badań ekologicznych całej populacji mikroorganizmów. Patologiczne zmiany są bowiem wypadkową interakcji w obrębie mikroflory, obejmującej zarówno gatunki drobnoustrojów komensalnych jak i patogennych, oraz statusu immunologicznego i genetycznego gospodarza.

Poznanie sekwencji nukleotydowych materiału genetycznego jelitowych populacji mikroorganizmów nie tylko umożliwi zidentyfikowanie poszczególnych szczebli taksonomicznych prokariotów, ale również daje okazję do stworzenia katalogu genów i odpowiadającym im funkcji. Wielowymiarowość badań z pewnością poszerza możliwość skorelowania zmian dysbiotycznych z funkcjami mikroorganizmów, lokalizacją danej populacji bakterii, jak również pozwoli prowadzić badania stabilności mikroflory.

Skoro genom w całości determinuje fenotyp danego organizmu, czyż metagenomika nie stanowi idealnego klucza do niezwykle dokładnego i wszechstronnego opisu ludzkiej mikroflory? Bez cienia wątpliwości można powiedzieć, że to prawda, choć jednocześnie trzeba mieć na uwadze fakt, że dziedzina ta znajduje się dopiero na początku swej fascynującej drogi, która niewątpliwie przyczyni się do rozwoju nauki, w tym lepszego zrozumienia wpływu mikroorganizmów na stan zdrowia człowieka.

Literatura

1. Abubakar I., Myhill D., Aliyu S.H., Hunter, P. R.: Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 401–410 (2008)

2. Andoh A., Imaeda H., Aomatsu T., Inatomi O., Bamba S., Sasaki M., Saito Y., Tsujikawa T., Fujiyama Y.: Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Gastroenterol.* **46**, 479–486 (2011)
3. Barcenilla A., Pryde S.E., Martin J.C., Duncan S.H., Stewart C.S., Henderson C., Flint H.J.: Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1654–1661 (2000)
4. Baumgart M., K.W. Simpson i wsp.: Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of *Clostridiales* in Crohn's disease involving the ileum. *Isme J.* **1**, 403–418 (2007)
5. Boudeau J., Glasser A.L., Masseret E., Joly B., Darfeuille-Michaud A.: Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect. Immun.* **67**, 4499–4509 (1999)
6. Bringer M.A., Glasser A.L., Tung C.H., Meresse S., Darfeuille-Michaud A.: The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. *Cell Microbiol.* **8**, 471–484 (2006)
7. Campos N., Sarmento A. i wsp.: Macrophages from IBD patients exhibit defective tumour necrosis factor- α secretion but otherwise normal or augmented pro-inflammatory responses to infection. *Immunobiology*, **216**, 961–970 (2011)
8. Chen W., Li D., Wilson I., Chadwick V.S.: Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 987–993 (2002)
9. Dicksved J., Halfvarson J., Rosenquist M., Järnerot G., Tysk C., Apajalahti J., Engstrand L., Jansson J.K.: Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *Isme J.* **2**, 716–727 (2008)
10. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **308**, 1635–1638 (2005)
11. Fava F., Danese S.: Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: Friend of foe? *World J. Gastroenterol.* **17**, 557–566 (2011)
12. Frank D.N., St Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R.: Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13780–13785 (2007)
13. Franke A., M. Parkes i wsp.: Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* **42**, 1118–1125 (2010)
14. Fujimura Y., Kamoi R., Iida M.: Pathogenesis of aphthoid ulcers in Crohn's disease: correlative findings by magnifying colonoscopy, electron microscopy, and immunohistochemistry. *Gut*, **38**, 724–732 (1996)
15. Gassler N., Rohr C., Schneider A., Kartenbeck J., Bach A., Obermüller N., Otto H.F., Autschbach F.: Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**, 216–228 (2001)
16. Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J., Goodman R.M.: Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* **5**, 245–249 (1998)
17. Hugot J.P., Thomas G. i wsp.: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, **411**, 599–603 (2001)
18. Hugot J.P., Parkes M. i wsp.: Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am. J. Gastroenterol.* **102**, 1259–1267 (2007)
19. Inohara N., Nunez G.: NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 371–382 (2003)
20. Inohara N., Ogura Y., Chen F.F., Muto A., Nunez G.: Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* **276**, 2551–2554 (2001)
21. Isbister W.H.: Colonoscopy: how far is enough? *Aust. N.Z.J. Surg.* **65**, 44–47 (1995)
22. Joossens M., Huys G., Cnockaert M., De Preter V., Verbeke K., Rutgeerts P., Vandamme P., Vermeire S.: Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut*, **60**, 631–637 (2011)
23. Kobayashi K.S., Chamaillard M., Ogura Y., Henegariu O., Inohara N., Nuñez G., Flavell R.A.: Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, **307**, 731–734 (2005)
24. Kosovac K., Brenmoehl J., Holler E., Falk W., Schoelmerich J., Hausmann M., Rogler G.: Association of the NOD2 genotype with bacterial translocation via altered cell-cell contacts in Crohn's disease patients. *Inflamm. Bowel Dis.* **16**, 1311–1321 (2010)
25. Kotlowski R., Bernstein C.N., Sepehri S., Krause D.O.: High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut*, **56**, 669–675 (2007)
26. Liu Y., van Kruiningen H.J., West A.B., Cartun R.W., Cortot A., Colombel J.F.: Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology*, **108**, 1396–1404 (1995)
27. Mangin, Doré J. i wsp.: Molecular inventory of faecal microflora in patients with Crohn's disease. *FEMS Microbiol. Ecol.* **50**, 25–36 (2004)
28. Manichanh C., Doré J. i wsp.: Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, **55**, 205–211 (2006)
29. Martin H.M., Campbell B.J., Hart C.A., Mpofu C., Nayar M., Singh R., Englyst H., Williams H.F., Rhodes J.M.: Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*, **127**, 80–93 (2004)
30. Maśliński S., Ryzewski J., Patofizjologia dla studentów medycyny. Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa, 1998 s. 733–739 i 777
31. McCann K. S. The diversity-stability debate. *Nature*, **405**, 228–233 (2000).
32. McGuckin M.A., Eri R., Simms L.A., Florin T.H., Radford-Smith G.: Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 100–113 (2009)
33. Miquel S., Darfeuille-Michaud A. i wsp.: Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS One*, **5**, 12714 (2010)
34. Naser S.A., Hulten K., Shafran I., Graham D.Y., El-Zaatari F.A.: Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* **77**, 497–504 (2000)
35. Nuding S., Fellermann K., Wehkamp J., Stange E.F.: Reduced mucosal antimicrobial activity in Crohn's disease of the colon. *Gut*, **56**, 1240–1247 (2007)
36. Ott S.J., Musfeldt M., Wenderoth D.F., Hampe J., Brant O., Fölsch U.R., Timmis K.N., Schreiber S.: Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, **53**, 685–693 (2004)

37. Peterson D.A., Frank D.N., Pace N.R., Gordon J.I.: Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell. Host. Microbe*, **3**, 417–427 (2008)
38. Rabizadeh S., Rhee K.J., Wu S., Huso D., Gan C.M., Golub J.E., Wu X., Zhang M., Sears C.L.: Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a potential instigator of colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 1475–1483 (2007)
39. Resnick R.H., Royal H., Marshall W., Barron R., Werth T.: Intestinal permeability in gastrointestinal disorders. Use of oral [^{99m}Tc]DTPA. *Dig. Dis. Sci.* **35**, 205–211 (1990)
40. Rhodes J.M.: The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*, **56**, 610–612 (2007)
41. Roediger W.E.: The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet*, **2**, 712–715 (1980)
42. Rolhion N., Hofman P., Darfeuille-Michaud A.: The endoplasmic reticulum stress response chaperone: Gp96, a host receptor for Crohn disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, **2**, 115–119 (2011)
43. Scanlan P.D., Shanahan F., O'Mahony C., Marchesi J.R.: Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3980–3988 (2006)
44. Schmitz H., Fromm M., Bentzel C.J., Scholz P., Detjen K., Mankertz J., Bode H., Epple H.J., Riecken E.O., Schulzke J.D.: Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J. Cell Sci.* **112**, 137–146 (1999)
45. Segain J.P., Raingeard de la Blétière D., Bourreille A., Leray V., Gervois N., Rosales C., Ferrier L., Bonnet C., Blottière H.M., Galliche J.P.: Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, **47**, 397–403 (2000)
46. Sephiri S., Khafipour E., Bernstein C.N., Coombes B.K., Pilar A.V., Karmali M., Ziebell K., Krause D.O.: Characterization of *Escherichia coli* isolated from gut biopsies of newly diagnosed patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 1451–1463 (2011)
47. Sephiri S., Kotlowski R., Bernstein C.N., Krause D.O.: Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 675–683 (2007)
48. Sitaraman S.V., Klapproth J.M., Moore D.A., Landers C., Targan S., Williams I.R., Gewirtz A.T.: Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **288**, 403–406 (2005)
49. Sokol H., P. Langella i wsp.: *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 16731–16736 (2008)
50. Sperandio B., Regnault B., Guo J., Zhang Z., Stanley S.L. Jr, Sansonetti P.J., Pédrón T.J.: Virulent *Shigella flexneri* subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. *Exp. Med.* **205**, 1121–1132 (2008)
51. Strober W., Fuss I., Mannon P.: The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* **117**, 514–521 (2007)
52. Swidsinski A., Lochs H. i wsp.: Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**, 44–54 (2002)
53. Swidsinski A., Loening-Baucke V., Lochs H., Hale L.P.: Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J. Gastroenterol.* **11**, 1131–1140 (2005)
54. Swidsinski A., Loening-Baucke V., Vaneechoutte M., Doerffel Y.: Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 147–161 (2008)
55. Swidsinski A., Weber J., Loening-Baucke V., Hale L.P., Lochs H.: Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3380–3389 (2005)
56. Takaishi H., Hibi T. i wsp.: Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 463–472 (2008)
57. Tamboli C.P., Neut C., Desreumaux P., Colombel J.F.: Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*, **53**, 1–4 (2004)
58. Thomas G.A., Swift G.L., Green J.T., Newcombe R.G., Braniff-Mathews C., Rhodes J., Wilkinson S., Strohmeyer G., Kreuzpainter G.: Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study. *Gut*, **42**, 497–500 (1998)
59. Uehara A., Yang S., Fujimoto Y., Fukase K., Kusumoto S., Shibata K., Sugawara S., Takada H.: Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramylpeptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol.* **7**, 53–61 (2005)
60. Vanhoutvin S.A., Troost F.J., Hamer H.M., Lindsey P.J., Koek G.H., Jonkers D.M., Kodde A., Venema K., Brummer R.J.: Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa. *PLoS One*, **4**, 6759 (2009)
61. Vejborg R.M., Hancock V., Petersen A.M., Krogfelt K.A., Klemm P.: Comparative genomics of *Escherichia coli* isolated from patients with inflammatory bowel disease. *BMC Genomics*, **12**, 316 (2011)
62. Vermeire S.: NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 569–575 (2004)
63. Walker A.W., Sanderson J.D., Churcher C., Parkes G.C., Hudspith B.N., Rayment N., Brostoff J., Parkhill J., Dougan G., Petrovska L.: High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol.* **11**, 7 (2011)
64. Wehkamp J., Stange E.F., Fellermann K.: Defensin-immunology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **33** Suppl 3, 137–144 (2009)
65. Żyłowska M., Wszyńska A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Defensyny – peptydy o aktywności przeciwbakteryjnej. *Post. Mikrobiol.* **50**, 223–234 (2011)

Aleksandra Nowak^{1*}, Stefan Tyski^{1,2}

¹Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa

²Zakład Antybiotyków i Mikrobiologii, Narodowy Instytut Leków, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Wpłynęło w maju 2012

1. Wstęp. 2. Budowa, sposób działania i autoregulacja dwuskładnikowych systemów regulacyjnych (TCS). 3. TCS a biofilm. 3.1. Biofilm paciorkowców. 3.1.1. System VicRK *S. mutans*. 3.1.2. System ComDE *S. mutans*. 3.1.3. System HK11/RR11 (LiaSR) *S. mutans*. 3.1.4. System CiaRH *S. mutans*. 3.1.5. System CovRS (CsrRS) paciorkowców grup A, B, C. 3.1.6. System BfrAB *S. gordonii*. 3.2. Biofilm gronkowców. 3.2.1. System ArlRS *S. aureus*. 3.2.2. System GraRS *S. aureus*. 3.2.3. System WalKR *S. aureus*. 3.2.4. System LytSR *S. aureus*. 3.2.5. System SaeRS *S. aureus* oraz *S. epidermidis*. 3.3. Biofilm enterokoków. 3.3.1. System FsrABC *E. faecalis*. 3.3.2. System EtaSR *E. faecalis*. 4. Podsumowanie

The role of two-component regulatory systems of Gram-positive cocci in biofilm formation

Abstract: Two-component systems (TCS) are common in bacterial cells and play an important role in response to various signals coming from environment. The simplest TCS consists of two elements: a membrane sensor protein, which receives signals and the other – a regulatory protein that modulates target gene expression in response to the stimulus. The recent studies have shown that biofilm formation is dependent on many genetic factors, including the two-component regulatory systems. The bacterial cells living in biofilm communities are very vital and resistant to many antibiotics and antimicrobial agents. Therefore, in-depth knowledge of TCS involved in biofilm formation seems to be necessary to combat the growing resistance of bacteria.

1. Introduction. 2. Structure, organization and autoregulation of two-component regulatory systems. 3. TCS and the biofilm. 3.1. Streptococcal biofilm. 3.1.1. The VicRK system of *S. mutans*. 3.1.2. The ComDE system of *S. mutans*. 3.1.3. The HK11/RR11 (LiaSR) system of *S. mutans*. 3.1.4. The CiaRH system of *S. mutans*. 3.1.5. The CovRS (CsrRS) system of grup A, B, C streptococci. 3.1.6. The BfrAB system of *S. gordonii*. 3.2. Staphylococcal biofilm. 3.2.1. The ArlRS system of *S. aureus*. 3.2.2. The GraRS system of *S. aureus*. 3.2.3. The WalKR system of *S. aureus*. 3.2.4. The LytSR system of *S. aureus*. 3.2.5. The SaeRS system of *S. aureus* and *S. epidermidis*. 3. Enterococcal biofilm. 3.3.1. The FsrABC system of *E. faecalis*. 3.3.2. The EtaSR system of *E. faecalis*. 4. Summary

Słowa kluczowe: dwuskładnikowe systemy regulacyjne, biofilm, ziarenkowce Gram-dodatnie

Key words: two-component systems, biofilm, Gram-positive cocci

1. Wstęp

Rok 1986 przyjmuje się za początek badań nad zjawiskiem transdukcji sygnału u bakterii. W tym czasie Nixon i wsp. po raz pierwszy użyli określenia dwuskładnikowy system regulacyjny (two-component system, TCS) [56]. Również w roku 1986 Nifani i Magasanik wykazali, że dwuskładnikowy system regulacyjny poprzez fosforylację białek może kontrolować asymilację azotu u bakterii [55]. Te dwa odkrycia, pierwsze dotyczące wysokiej konserwatywności sekwencji aminokwasowych oraz drugie dotyczące fosforylacji białek w TCS zapoczątkowały ogromne zainteresowanie tematyką dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, które trwa do dnia dzisiejszego [9]. W piśmiennictwie prócz wymienionego skrótu TCS można spotkać także określenia TCSTS (two component signal transduction system), jak również systemy dwuskładnikowe czy dwuskładnikowe systemy regulacyjne. Obecnie wiadomo

już, że TCS u bakterii występują powszechnie i odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi na różnego rodzaju sygnały docierające z otoczenia. Dwuskładnikowe systemy regulacyjne zaangażowane są w wiele procesów życiowych bakterii m.in. wirulencję, kompetencję, koniugację oraz tworzenie biofilmu. Wykazano również udział TCS w regulacji licznych szlaków metabolicznych a także transporcie jonów i substancji odżywczych. Mimo, iż znana jest budowa i sposób działania wielu TCS, to wciąż pozostaje szereg niejasności w tej dziedzinie, głównie w obszarze różnorodności sygnałów przez nie odbieranych, roli TCS w patogenezie zakażeń oraz wzajemnych zależności pomiędzy różnymi dwuskładnikowymi systemami regulacyjnymi [35, 36, 75].

Zsekwencjonowanie licznych genomów bakteryjnych znacznie ułatwiło oszacowanie potencjalnej liczby genów kodujących białka sensorowe i regulatorowe wchodzące w skład TCS. Analizy proteomów wielu bakterii, w tym kilku gatunków ziarenkowców Gram-dodatnich

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego ul. Oczki 3, 02-007 Warszawa, tel.: 22- 628-08-22; tel./fax: 22 621 13 51; e-mail: olanowak1@gmail.com

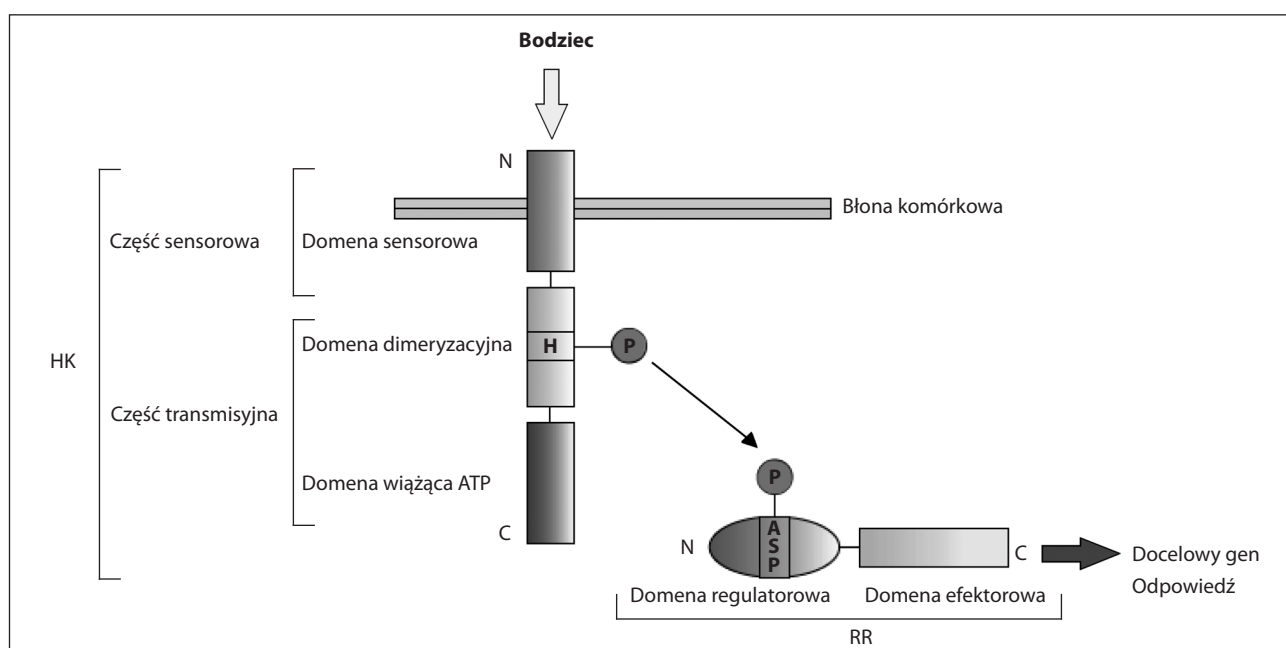
wykazały, że *Streptococcus mutans* i *Streptococcus pneumoniae* posiadają 13 TCS [2, 13] natomiast *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* oraz *Enterococcus faecalis* po 17 TCS [16, 28, 84]. Okazuje się również, że bakterie o większym genomie kodują zazwyczaj większą liczbę białek tworzących układy dwuskładnikowe. Także genomy bakterii bytujących w zróżnicowanych środowiskach kodują więcej TCS niż genomy drobnoustrojów żyjących w środowiskach jednolitych (dogodnych). Jest to szczególnie zauważalne u bakterii chorobotwórczych [7].

2. Budowa, sposób działania oraz autoregulacja TCS

Prototypowy, modelowy dwuskładnikowy system regulacyjny składa się z błonowego białka sensorowego, którym jest kinaza histydynowa (HK), odbiera ona sygnał ze środowiska oraz cytoplazmatycznego białka regulatorowego – regulatora odpowiedzi (RR), zaś RR po zmianie konformacji wynikającej z odebrania sygnału, reguluje ekspresję docelowego genu. W przypadku budowy kinazy histydynowej wyróżnić można dwa elementy składowe: tzw. część sensorową, którą tworzy domena sensorowa oraz część transmisyjną, którą stanowią domena dimeryzacyjna o enzymatycznej aktywności kinazy histydynowej wraz z domeną wiążącą ATP. Część sensorowa zlokalizowana jest w błonie komórkowej, z kolei część transmisyjna znajduje się w przestrzeni cytoplazmatycznej. Oczywiście kinazy histydynowe mogą budową nieznacznie odbiegać od modelu prototypowego i ich część sensorowa może

być zakotwiczona w cytoplazmie. Wykazano, iż model budowy kinazy histydynowej zależy w głównej mierze od rodzaju działającego bodźca. Białko regulatorowe z kolei tworzą dwie domeny: domena regulatorowa (posiadająca konserwowaną resztę kwasu asparaginowego Asp) oraz domena efektorowa oddziałująca z DNA (Rys. 1). Należy podkreślić, że schemat budowy oraz ogólna zasada działania TCS u różnych grup bakterii są podobne [7, 10, 22].

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne są tak skonstruowane, że pozwalają doskonale połączyć bodziec oraz reakcję na ten bodziec. Mechanizm działania TCS, choć złożony, umożliwia drobnoustrojom wykrywanie i odpowiednie reagowanie na zmiany warunków otoczenia. Wśród czynników, które mogą być odbierane przez TCS wyróżniono wiele sygnałów chemicznych i fizycznych, takich jak: stężenie jonów (np. Fe^{3+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}), stężenie związków odżywczych, temperatura, pH, zawartość tlenu, osmolarność, potencjał redoks, a także kontakt z komórkami gospodarza. Bodziec odbierany przez dwuskładnikowy system regulacyjny przekształcany jest w sygnał komórkowy na drodze autofosforylacji silnie konserwowanej reszty histydynowej białka sensorowego. Sygnał ze środowiska zewnętrznego wychwytywany jest przez część N-końcową białka sensorowego (domena sensorowa) a następnie przekazywany na część C-końcową, gdzie zlokalizowana jest domena dimeryzacyjna. W kolejnym etapie przekazania sygnału reszta fosforanowa przenoszona jest na kwas asparaginowy domeny regulatorowej zlokalizowanej w części N-końcowej białka regulatorowego. Etap



Rys. 1. Schemat budowy prototypowego układu dwuskładnikowego. Za zgodą [79]

HK – kinaza histydynowa, RR – regulator odpowiedzi, H – reszta histydynowa białka sensorowego, ASP – reszta kwasu asparaginowego, P – reszta fosforanowa N – N-koniec białka, C – C-koniec białka

końcowy z kolei obejmuje modulację ekspresji docelowych genów przez domenę efektorową zlokalizowaną na części C-końcowej.

Droga transdukcji sygnału w prostym układzie dwuskładnikowym obejmuje zazwyczaj trzy reakcje:

1. Autofosforylację: $HK-His + ATP = HK-His \sim P + ADP$
2. Fosfotransfer: $HK-His \sim P + RR \sim Asp = HK-His + RR-Asp \sim P$
3. Defosforylację: $RR-Asp \sim P + H_2O = RR-Asp + P_i$

Silnie konserwowana reszta histydynowa białka sensorowego działa jak „przełącznik” przenosząc sygnał na resztę kwasu asparaginowego białka regulatorowego dlatego dwuskładnikowe systemy regulacyjne są idealnie skonstruowane do pełnienia funkcji przełącznika i „przetwornika” sygnałów docierających ze środowiska. Błonowa lokalizacja białka sensorowego oraz wysoki stopień specyficzności pomiędzy sensorem i regulatorem pozwala na skuteczną transdukcję sygnału, której efektem jest fizjologiczna lub strukturalna odpowiedź na dany bodziec [7, 19, 51, 72].

Wiele dwuskładnikowych systemów pozytywnie reguluje ekspresję własnych genów. Operony kodujące te systemy posiadają, co najmniej dwa promotory: 1) promotor konstytutywny, odpowiadający za syntezę wystarczającej liczby białek sensorowych i regulatorowych w celu detekcji sygnału i uruchomienia właściwej dla niego odpowiedzi oraz 2) promotor autoregulowany odpowiadający, za ekspresję dodatkowych kopii sensora oraz białka regulatorowego. Autoregulacja zapewnia niejako „pamięć” poprzednich spotkań z sygnałem, gdyż nawet po jego zaniku poziom stężenia białka sensorowego w komórce pozostaje na wysokim poziomie [8]. Okazało się, że bakterie, które uprzednio poddane były działaniu czynnika stresowego, którym był niedobór fosforu, ponownie wystawione na działanie tego samego czynnika, zareagowały znacznie szybciej. Dzieje się tak, dlatego, że w komórce bakteryjnej nawet po zaniku sygnału pozostaje podwyższony poziom białka sensorowego jak i regulatorowego, co zapewnia swego rodzaju pamięć z pierwszego spotkania. Autoregulacja umożliwia również hierarchiczną organizację ekspresji genów danego regulonu. Ekspresja pewnych genów jest zależna od białka regulatorowego ekspresjonowanego z promotora konstytutywnego, podczas gdy inne są ściśle zależne od białek regulatorowych ekspresjonowanych z promotora autoregulacyjnego [8, 34, 38, 65].

3. TCS a biofilm

Tworzenie biofilmu przez bakterie, w tym ziarenkowce Gram-dodatnie, jest procesem złożonym i ściśle kontrolowanym. Obecnie wiadomo już, że na prawidłowy przebieg tego procesu wpływa wiele czynników,

wśród których dużą rolę przypisuje się dwuskładnikowym systemom regulacyjnym (Tab. I) [35, 36, 72].

Bakterie rosną i funkcjonują, przylegając prawie do każdej powierzchni biotycznej i abiotycznej, tworząc niezwykłą pod względem architektonicznym społeczność zwaną biofilmem. Najprościej biofilm można zdefiniować jako społeczność drobnoustrojów rosnącą w wielokomórkowych agregatach, związaną z powierzchnią, otoczoną zewnątrzkomórkową macierzą składającą się z polisacharydów, białek oraz DNA (tzw. eDNA). Co ciekawe, domniemane mikrokolonie biofilmu zidentyfikowano już w skamieniałościach pochodzących sprzed ok. 3,3–3,4 miliardów lat. Istnieją liczne dowody potwierdzające, że zdolność do tworzenia biofilmu jest prastarą cechą prokariotycznego cyklu życiowego przez miliony lat niezwykle konserwowaną i niezbędną do przeżycia w zróżnicowanych środowiskach [1, 5, 27, 47].

Budowa biofilmu bywa różna i zależy od kilku czynników, głównie od warunków panujących w danym środowisku oraz własności tworzących go drobnoustrojów. Powstawanie biofilmu jest procesem złożonym, ściśle kontrolowanym, obejmującym kilka etapów (Rys. 2). Pierwszy etap, tzw. wstępna adhezja ma charakter odwracalny i uzależniona jest od kilku czynników tj. temperatury, sił Van der Waalsa czy oddziaływań sił elektrostatycznych. Druga faza, nazywana trwałą adhezją, jest z kolei nieodwracalna. Kluczową rolę w przypadku tego etapu odgrywają specyficzne oddziaływania adhezyn różnego typu zlokalizowanych na powierzchni komórek. Kolejne etapy powstawania warstwy biologicznej to dojrzewanie oraz uwolnienie komórek (dyspersja). W fazie dojrzewania dochodzi do ostatecznego uformowania w pełni funkcjonalnego biofilmu. W fazie tzw. dyspersji z kolei następuje odrywanie się fragmentów biofilmu lub uwolnienia komórek potomnych, które mogą przemieszczać się w poszukiwaniu nowych korzystnych nisz życiowych [18]. Mechanizm molekularny sterujący tworzeniem biofilmu może różnić się między gatunkami, a nawet pomiędzy różnymi szczepami tego samego gatunku. Zdolność bakterii do formowania biofilmu stwarza możliwość ochrony podczas wzrostu i rozwoju komórek, warunkuje oporność na wiele antybiotyków i innych związków przeciwbakteryjnych, umożliwiając przetrwanie w niekorzystnym środowisku, a także zdobywanie nowych nisz ekologicznych [1, 27, 47].

Biofilm wpływa na wiele aspektów ludzkiego życia, ale przede wszystkim przyczynia się do rozwoju wielu groźnych dla człowieka zakażeń bakteryjnych. Większość z nich powodowanych jest przez drobnoustroje występujące w postaci biofilmu, dlatego tak ważne wydaje się opracowanie skutecznych metod jego zwalczania [1, 5, 27, 47]. Zwłaszcza biofilm ziarenkowców Gram-dodatnich ma ogromne znaczenie w chorobotwórczości, a może powstawać zarówno na powierzchniach tkanek jak również implantowanych wyrobów

Tabela I

Dwuskładnikowe systemy regulacyjne ziarenkowców Gram-dodatnich uczestniczące w tworzeniu biofilmu

Drobno-ustrój	TCS	Ogólna funkcja	Effekt inaktywacji genów TCS na biofilm	Piśmienictwo
<i>S. mutans</i>	VicRK	Wzrost komórek, adhezja, formowanie biofilmu , genetyczna kompetencja	Odbiegający od typowego dla szczepu dzikiego: szorstki, kłaczkowaty i z mniejszą liczbą komórek	[81]
<i>S. mutans</i>	ComDE	Formowanie biofilmu , genetyczna kompetencja, synteza bakteriocyny, odpowiedź na warunki stresowe	Odbiegający od typowego dla szczepu dzikiego: zmiany w strukturze, odnotowano także znaczny spadek biomasy	[5, 45, 46]
<i>S. mutans</i>	LiaSR HK/RR11	Odpowiedź na warunki stresowe m.in. stres termiczny, oksydacyjny, formowanie biofilmu	Odbiegający od typowego dla szczepu dzikiego: zmniejszenie gęstości komórek, spadek biomasy	[44, 46, 58]
<i>S. mutans</i>	CiaRH	Odpowiedź na niekorzystne warunki panujące w środowisku, synteza bakteriocyny (mutacyny I), genetyczna kompetencja tworzenie biofilmu	Odbiegający od typowego dla szczepu dzikiego: inaktywacja genu <i>ciaH</i> skutkowałą redukcją biomasy. Inaktywacja <i>ciaR</i> nie wykazywały znaczących różnic w strukturze	[33, 42, 50, 82]
Paciorkowce grupa A, B, C	CovRS (CsrRS)	Rozwój, patogenezę, tworzenie biofilmu	Inaktywacja genu <i>covR</i> spowodowała niezdolność szczepu do formowania biofilmu	[14, 11, 43, 75]
<i>S. gordonii</i>	BfrAB	Formowanie biofilmu	Odbiegający od typowego dla szczepu dzikiego: wyraźny spadek biomasy, zmniejszona adhezja do apatytu sHA	[84, 86]
<i>S. aureus</i>	ArlRS	Wirulencja, formowanie biofilmu	Zwiększona zdolność szczepu do tworzenia biofilmu , ale zmniejszona zdolność do przylegania w porównaniu ze szczepem dzikim	[77]
<i>S. aureus</i>	GraRS	Oddziaływania międzykomórkowe oraz tworzenie biofilmu w obecności cytrynianu	Zaobserwowano podwyższony poziom formowania biofilmu w porównaniu do szczepu dzikiego bez obecności cytrynianu	[68]
<i>S. aureus</i>	WalKR	Metabolizm ściany komórkowej, formowanie biofilmu	Ogólne zaburzenia w tworzeniu biofilmu	[16]
<i>S. aureus</i>	LytSR	Śmierć oraz liza komórek (autoliza) podczas formowania biofilmu	Biofilm szczepu z mutacją w genie <i>lytS</i> cechował się większą grubością oraz biomasa w porównaniu do szczepu dzikiego	[26, 63, 69]
<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	SaeRS	Wirulencja, formowanie biofilmu	Zwiększenie zdolności do tworzenia biofilmu	[31, 48]
<i>E. faecalis</i>	FsrABC	Wirulencja, formowanie biofilmu	Zmniejszona zdolność do tworzenia biofilmu	[28, 29, 60]
<i>E. faecalis</i>	EtaSR	Stres komórkowy, wirulencja, formowanie biofilmu	Niewielkie zmiany w strukturze biofilmu	[76]

medycznych. Dlatego niezwykle interesującym jest uzyskanie pełnego wglądu w udział TCS w tworzeniu struktury biofilmu tych drobnoustrojów.

3.1. Biofilm paciorkowców

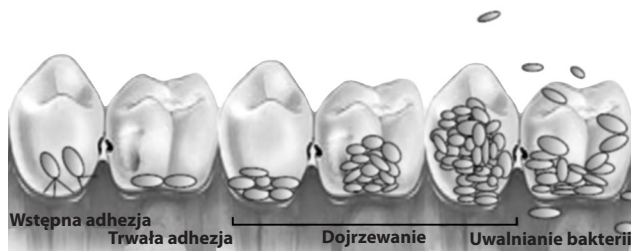
Bakterie z rodzaju *Streptococcus* są częstymi patogenami człowieka. Niektóre z nich mogą powodować zakażenia oportunistyczne np. próchnicę zębów wywołaną głównie przez *S. mutans* oraz *S. sobrinus* [14]. Opisano siedem gatunków paciorkowców izolowanych od ludzi i zwierząt należących do grupy „mutans” są to: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. crireti*, *S. rattii*, *S. ferus*, *S. macacae* i *S. downei* [73, 78]. Szczepy paciorkowców kolonizujących jamę ustną, zwłaszcza z gatunku *S. mutans* odpowiedzialne są za tworzenie biofilmu w postaci płytki nazębnej – istotnej struktury sprzyjającej powsta-

waniu próchnicy i stanów zapalnych w obrębie dziąseł (Rys. 2). Jama ustna stanowi złożony ekosystem, który zasiedla bardzo zróżnicowana mikroflora składająca się z około 500 gatunków drobnoustrojów [39]. Liczne oddziaływania pomiędzy nimi stanowią dobrą podstawę do formowania złożonej społeczności biofilmu.

Inne paciorkowce jak *S. pneumoniae* odpowiadający głównie za zapalenia płuc, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, czy *S. pyogenes* związany z zapaleniem gardła, anginą a nawet zapalenia stawów czasami także wykazują zdolność do tworzenia biofilmu w przebiegu wyżej wymienionych infekcji.

3.1.1. System VicRK u *S. mutans*

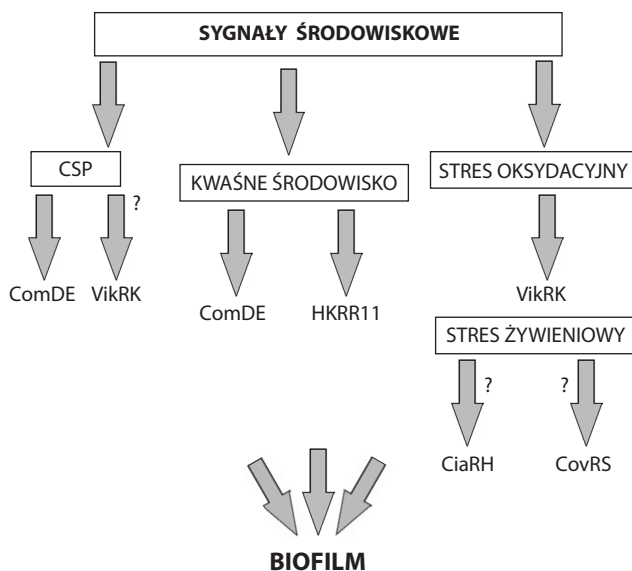
Dwuskładnikowy system regulacyjny VicRK jest jednym z 13 zidentyfikowanych u *S. mutans* UA159. Schemat budowy tego układu nie odbiega od prototy-



Rys. 2. Etapy powstawania biofilmu na przykładzie płytki nazębnej

powego, zatem operon *vicRXX* koduje, odpowiednio, błonową kinazę histydynową VicK oraz wewnątrzkomórkowy modulator odpowiedzi VicR jego główną rolą jest udział w adaptacji komórki bakteryjnej do zmian zachodzących w otoczeniu (Rys. 3). Inaktywacja genów *vicK* oraz *vicR* wykazała, że ich produkty uczestniczą w prawidłowym wzroście komórek, adhezji, formowania biofilmu oraz tzw. genetycznej kompetencji. Zjawisko to polega na naturalnej zdolności niektórych bakterii, w tym *Streptococcus* sp. do pobierania heterologicznego DNA, i jak wykazano, jest to proces niezwykle powszechny w społeczności biofilmu [66, 81].

W porównaniu ze szczepem dzikim *S. mutans* UA159, szczepy z mutacją zarówno w genie *vicK* jak i *vicR* tworzą odbiegający od typowego dla *S. mutans* UA159 biofilm. Biofilm szczepu dzikiego jest gładki i równy, podczas gdy biofilm szczepów zmutowanych szorstki, kłaczkowaty i z mniejszą liczbą komórek [66, 81]. Zidentyfikowano także trzeci gen wchodzący w skład operonu *vicRXX*. Produkt genu *vicX* jest niezbędny do prawidłowego wzrostu komórek, adhezji i kompetencji. Aby określić jak produkt genu *vicX* wpływa na architekturę biofilmu oraz sam proces jego kształtowania, badano szczep z mutacją w genie *vicX*. Analiza porównawcza w elektronowym mikro-

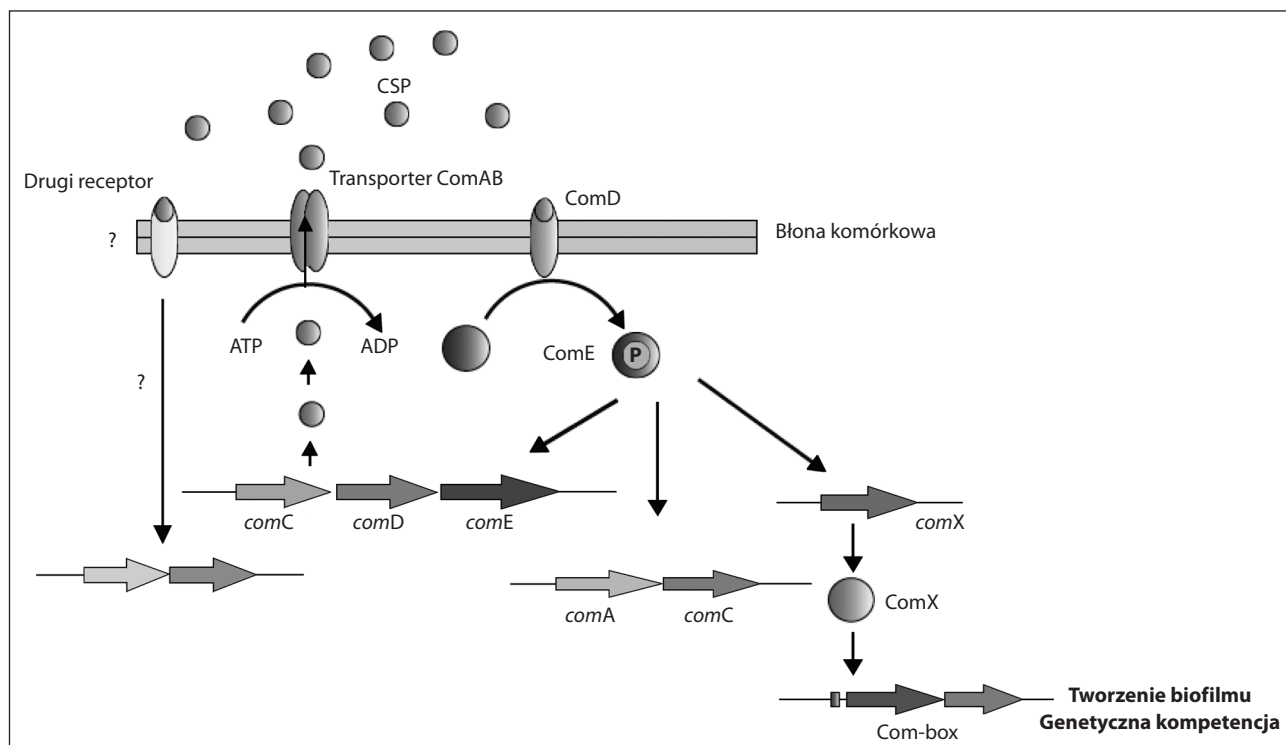


Rys. 3. Przykłady sygnałów środowiskowych aktywujących TCS i wpływających na biofilm *S. mutans*. Za zgodą [65]

skopie skaningowym, (SEM), biofilmu zmutowanego szczepu z inaktywowanym genem *vicX* oraz dzikiego rosnącego na podłożu płynnym uzupełnionym glukozą (12 nM) lub sacharozą (6 nM) wykazały znaczne różnice architektoniczne w budowie [67].

3.1.2. System ComDE *S. mutans*

Kolejnym zaangażowanym w tworzenie biofilmu u *S. mutans* dwuskładnikowym systemem regulacyjnym jest ComDE [45, 46]. Geny systemu ComDE wchodzą w skład operonu *comCDE*, a jego produktami są: prekursor CSP, kinaza histydynowa – białko sensorowe rozpoznające CSP oraz regulator odpowiedzi, który koordynuje ekspresję genów *comAB*, *comCDE* oraz *comX*. System ComDE odgrywa również kluczową rolę w tzw. genetycznej kompetencji, syntezie bakteriocyny oraz odpowiedzi na warunki stresowe [46]. Operon *comCDE* wraz z operonem *comAB* kodują geny odpowiadające za zjawisko wyczuwania liczebności (QS, Quorum Sensing), w którym cząsteczką sygnałową jest białko CSP (Competence Stimulating Protein). Quorum Sensing stanowi pewną odmianę transdukcji sygnału różniącą się od klasycznego dwuskładnikowego systemu rodzajem odbieranego bodźca. System QS zaangażowany jest w regulację wielu procesów takich jak: wirulencja, produkcja metabolitów wtórnych, bioluminescencja, koniugacja, transformacja czy tworzenie biofilmu. Mechanizm tego zjawiska związany jest z syntezą mediatorów chemicznych, których stężenie rośnie w miarę zagęszczania się populacji, aż do osiągnięcia pewnej gęstości krytycznej, powyżej której związanie mediatora z receptorem powierzchniowym (ComD) stanowi sygnał dla komórki. Bakterie reagują na sygnały wysyłane przez własne komórki co znacznie ułatwia im monitorowanie zagęszczenia populacji oraz dostosowanie ekspresji genów do fazy wzrostu. Zjawisko quorum sensing wymaga aktywności sześciu genów kodowanych przez dwa operony, *comAB* oraz *comCDE*. Produkty pierwszego budują transporter typu ABC, niezbędny do eksportu CSP na zewnątrz komórki bakteryjnej, drugi omówiono powyżej. Poziom ekspresji genów uzależniony jest od poziomu ComX, który jest alternatywną podjednostką sigma polimerazy RNA. Gen *comC*, kodujący prekursor CSP oraz operon *comAB* kodujący system sekrecji CSP, w głównej mierze odpowiadają za syntezę i transport aktywnego CSP (Rys. 4). Inaktywacja któregoś z nich znacznie ogranicza zdolność do genetycznej kompetencji *S. mutans*. Dodatkowo mutanty w genie *comC* wykazują zmiany w strukturze biofilmu, ale ich biomasa był porównywalna z szczepem dzikim *S. mutans*. Dodanie syntetycznego CSP powoduje powrót do struktury biofilmu, charakterystycznej dla szczepu dzikiego. Z kolei inaktywacja genów *comD* i *comE* powoduje zmiany w strukturze, biofilm staje się znacznie cieńszy, a także odnotowuje się znaczny spadek



Rys. 4. Schemat transdukcji sygnału z udziałem dwuskładnikowego systemu ComDE zaangażowanego w tworzenie biofilmu oraz tzw. genetyczną kompetencję *S. mutans*. Za zgodą [45, 65].

biomasy (ok. 70%) w porównaniu do szczepu dzikiego. Warto podkreślić, że krzywe wzrostu obu mutantów mają podobny przebieg, co wskazuje na to, że inaktywacja jednego z genów kodujących TCS w tym samym stopniu oddziałuje na wzrost i gęstość komórek. Wykazano także, że dodanie syntetycznego CSP do płynnej hodowli mutantów nie może przywrócić biomasy biofilmu na poziomie szczepu dzikiego, co dodatkowo potwierdza, że dwuskładnikowy system regulacyjny ComDE odgrywa bardzo ważną rolę w wykrywaniu i transdukcji sygnału z udziałem CSP. Mutanty *S. mutans* w genie *comX* formują biofilm bardzo podobny do biofilmu mutantów w genach *comD* i *comE*. Uzyskane wyniki w przypadku tych czterech mutantów, dwa rodzaje biofilmu – pierwszy z defektem w strukturze (*comC*) oraz drugi zarówno z defektem w strukturze jak i redukcją biomasy (*comD*, *comE*, *comX*) sugerują istnienie drugiego receptora wykrywającego peptyd CSP, ale aktywującego inny mechanizm odpowiedzi. W celu potwierdzenia tej hipotezy skonstruowano potrójnego mutantu *comCDE*. Szczep ten formował biofilm o obniżonej biomasy podobnie jak mutanty w genach *comD* i *ComE*, ale wykazywał defekt w strukturze podobnie jak *comC*. Okazało się również, że dodanie syntetycznego CSP do hodowli takiego szczepu zmutowanego spowodowało częściowe przywrócenie struktury jaką wykazywał biofilm szczepu dzikiego, co z kolei umocniło hipotezę o istnieniu kolejnego receptora dla peptydu CSP [5, 45, 46].

3.1.3. System LiaSR (HK11/RR11) u *S. mutans*

Powyższy dwuskładnikowy system regulacyjny zidentyfikowany w genomie *S. mutans* UA159 przez Li i wsp. [44], nazwany początkowo HK11/RR11 obecnie zyskał nową nazwę LiaSR nadaną mu przez Chong i wsp., ze względu na dużą homologię do systemu LiaRS *B. subtilis* [12]. System HK11/RR11 zaangażowany jest w proces segregacji komórek oraz odpowiedź na warunki stresowe m.in. stres termiczny oraz oksydacyjny i, jak wykazano, odgrywa on istotną rolę w formowaniu biofilmu *S. mutans*. Analiza porównawcza między szczepem zmutowanym w genie *rr11* (*liaR*), a szczepem dzikim *S. mutans* UA159 pozwoliła wytypować aż 174 geny zależne do białka regulatorowego RR11 (LiaR) zaangażowane w formowanie biofilmu [58]. Wykazano, że delecja w genach *hk11* oraz *rr11* skutkuje defektem w strukturze biofilmu, zmniejszeniem jego gęstości, przylegania do podłoża biofilmu, ponadto zaobserwowano spadek biomasy biofilmu zmutowanych szczepów w porównaniu ze szczepem dzikim *S. mutans*. W celu stwierdzenia, czy TCS kodowany przez *hk11/rr11* mógłby funkcjonować jako tzw. druga ścieżka przekazywania sygnału, dodano syntetyczny CSP do hodowli mutantów. Okazało się jednak, że w tym przypadku dodanie CSP nie miało znaczącego wpływu na biofilm [44, 58]. W celu obniżenia wirulencji oraz zdolności próchnicotwórczych szczepów *S. mutans* stworzono podwójnego mutantu w dwóch systemach regulacyjnych ComCDE oraz HK11/RR11 [46]. Uzyskane wyniki wskazują, że jednoczesna inaktywacja

obu TCS obniża wirulencję oraz zdolność *S. mutans* do tworzenia zmian próchnicowych w stopniu wyższym niż inaktywacja tylko jednego z systemów. Szczep zmutowany w genach *comCDE* oraz *hk11/rr11* wykazywał defekt w zdolności do tzw. genetycznej kompetencji, zdolności do wzrostu na podłożu o pH 5,0 oraz tworzył biofilm zdeformowany o obniżonej biomacie. Eksperymenty z udziałem zwierząt wskazują, że mutanty te cechuje obniżona zdolność do kolonizacji jamy ustnej, a nawet samej inicjacji procesu próchnicotwórczego. Badania te stanowią dobrą podstawą do opracowania strategii mających na celu profilaktykę lub leczenie zakażeń powodowanych przez *S. mutans* [46].

3.1.4. System CiaRH u *S. mutans*

Dwuskładnikowy system regulacyjny CiaRH *S. mutans* zaangażowany jest w tworzenie biofilmu, syntezę bakteriocyny (mutacyny I), genetyczną kompetencję oraz odpowiedź na niekorzystne warunki panujące w danym środowisku. Okazało się, że system ten występuje dość powszechnie u paciorkowców, u których bierze udział w procesie patogenezy oraz odpowiedzi na warunki stresowe [82]. Po przebadaniu mutantów *S. pneumoniae* w genach *cia* wskazano na możliwy udział systemu CiaRH w utrzymaniu integralności ściany komórkowej [50]. Intensywne badania TCS CiaRH *S. mutans* wykazały na jego wyjątkowe właściwości. Różni się on bowiem od systemów CiaRH zidentyfikowanych u innych paciorkowców dodatkowym białkiem CiaX, kodowanym przez pierwszy gen operonu *ciaXRH* [82]. Inaktywacja genu *ciaH* skutkuje zwiększeniem tolerancji na stres oksydacyjny u *S. mutans*, zahamowaniem syntezy mutacyny I, redukcją zdolności szczepu do tzw. naturalnej kompetencji oraz wzrostem tolerancji na kwaśne pH. Delecja *CiaH* skutkuje także redukcją biomasy biofilmu oraz zmniejszeniem rozmiarów komórek, co może sugerować udział dwuskładnikowego systemu CiaRH w regulacji wzrostu i/lub podziału komórek *S. mutans*. Z kolei mutanty w genie *ciaR* nie wykazywały znaczących różnic w strukturze biofilmu w porównaniu do szczepu dzikiego *S. mutans* UA140. Określono również wpływ inaktywacji genu *ciaX* kodowanego na operonie *ciaXRH*. Okazało się, że mutanty w tym genie także wykazują defekty w strukturze biofilmu [33, 42].

3.1.5. System CovRS (CsrRS) paciorkowców grup A, B, C

Dwuskładnikowy system regulacyjny CovRS znany również pod nazwą CsrRS po raz pierwszy został zidentyfikowany w genomach szczepów GAS (Group A Streptococci). U tych szczepów odgrywa on istotną rolę w rozwoju, patogenezie oraz w tworzeniu biofilmu [43]. Dwuskładnikowy system CovRS reguluje ekspresję ok. 15% genów GAS wśród nich m.in. operonu *has* (hyaluronic acid capsule synthesis) oraz genów: *ska* (streptokinase), *sagA* (streptolysin S), *speB* (cysteine protease B)

[14]. Wykazano iż inaktywacja genu *covR* spowodowała niezdolność szczepu do formowania biofilmu w przeciwieństwie do inaktywacji *covS*. Uzyskane wyniki sugerowały zależny od szczepu wpływ kinazy histydynowej CovS na formowanie biofilmu GAS. W celu potwierdzenia tej hipotezy przeprowadzono badania z wykorzystaniem różnych szczepów GAS mających inaktywowany gen *covS*. Wyniki potwierdziły zależny od właściwości szczepu mechanizm regulacji [11, 75]. Wykazano także, że białko CovR jest wymagane do ekspresji genów związanych z wirulencją paciorkowców grupy B oraz grupy C [14].

3.1.6. System BfrAB u *S. gordonii*

Dwuskładnikowy system regulacyjny BfrAB (Biofilm Formation Related) został zidentyfikowany poprzez przeszukiwanie integracyjnej biblioteki plazmidów w genomie *Streptococcus gordonii* V288. System ten jest zaangażowany w tworzenie biofilmu [84]. Gen *bfrA* koduje białko regulatorowe o masie cząsteczkowej ok. 25,7 kDa, a z kolei gen *bfrB* kinazę histydynową o masie cząsteczkowej 32,9 kDa. W porównaniu ze szczepem dzikim *S. gordonii* V288, szczep zmutowany w systemie *bfr* wykazuje nieprawidłowości w tworzeniu biofilmu, ma niższą biomasę oraz zmniejszoną adhezję do apatytu sHA (saliva-coated hydroxyapatite). Ponadto, osiadłe i planktonowe komórki tworzące tzw. wczesny biofilm na sHA wykazują wyższy poziom ekspresji genów *bfr* niż komórki wolnożyjące, sugerując istotną rolę dwuskładnikowego systemu regulacyjnego BfrAB we wczesnych etapach rozwoju biofilmu *S. gordonii* [84].

Według dostępnych danych system BfrAB reguluje ekspresję genów *bfrCD*, *bfrEFG*, kodujących białka systemu transportu ABC oraz ekspresję genu *bfrH*, kodującego CAAX amino-terminalną proteazę. Wykazano, że oczyszczona domena wiążąca DNA białek BfrA wiąże się do regionów promotorowych *bfrCD*, *bfrEFG* oraz *bfrH*, co sugeruje, że system BfrAB *S. gordonii* może kontrolować tworzenie biofilmu poprzez regulację systemów transportu typu ABC [86].

3.2. Biofilm gronkowców

Proces powstawania biofilmu gronkowców, pod względem genetycznym i molekularnym jest niezwykle złożony. W tworzeniu biofilmu gronkowcowego istotną rolę odgrywa polisacharydowa adhezyna międzykomórkowa (PIA, polysaccharide intercellular adhesin), będąca produktem operonu *icaADBC*. Ekspresja operonu *ica* modulowana jest przez różnego typu sygnały i prawdopodobnie znajdują się pod kontrolą SigB. Wiadomo również, że może być włączana i wyłączana przez sekwencje insercyjne (IS). Innymi białkami zaangażowanymi w tworzenie biofilmu gronkowców są także AAP (accumulation-associated protein), ClfA (clum-

ping factor A), białko **Bap** (biofilm associated protein) oraz **SSP1** (staphylococcal surface protein). W genomie *S. aureus* zidentyfikowano 17 TCS [4, 24]. Poniżej przedstawiono kilka najważniejszych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych, zaangażowanych w tworzenie biofilmu gronkowcowego.

3.2.1. System ArlRS u *S. aureus*

Operon *arlRS* koduje dwuskładnikowy system regulacyjny ArlRS. Produktem genu *arlS* jest kinaza histydynowa, z kolei *arlR* regulator odpowiedzi wykazujący podobieństwo do rodziny białek OmpR-PhoP. Mutacja w systemie ArlRS zwiększa zdolność szczepu *S. aureus* do tworzenia biofilmu, jednak mechanizm tego procesu jak dotąd nie został poznany. Ponadto mutanty *arlRS* cechowały się zwiększoną zdolnością do autolizy i zmniejszoną aktywnością hydrolaz peptydoglikanu. Badano także strukturę biofilmu z zastosowaniem konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy) i wykazano że, biofilm tworzony przez komórki zmutowane był obfitszy ale cechowało go zmniejszone przyleganie do powierzchni abiotycznej [77].

3.2.2. System GraRS u *S. aureus*

Początkowo dwuskładnikowemu systemowi regulacyjnemu **GraRS** (Glycopeptide Resistance Associated) przypisano wraz z pompą efflux *VraFG* udział w oporności na wankomycynę [68]. Obecnie stwierdzono udział systemu **GraRS** w oddziaływaniach komórkowych oraz tworzeniu biofilmu gronkowców w obecności niskich stężeń cytrynianu. Jednak mechanizm tego procesu pozostaje jak dotąd nieznan. Wiadomo natomiast, że mutanty w systemie GraRS nie tworzą agregatów w obecności cytrynianu. Dla tych szczepów zaobserwowano także podwyższony poziom formowania biofilmu w porównaniu do szczepu dzikiego hodowanego bez obecności cytrynianu. Niedawno wykazano także, że mutacja w genach *graRS* prowadzi do wzrostu całkowitego ujemnego ładunku na powierzchni komórek. Okazało się bowiem, że system GraRS pozytywnie reguluje ekspresję genu *dlt*, którego produkt jest niezbędny do wytwarzania cząsteczek kwasu lipotejchowego na powierzchni komórek. Mutanty w locus *dlt* cechował podwyższony poziom ładunków ujemnych na powierzchni komórki oraz tworzenie biofilmu. Jest zatem możliwe, że wzrost formowania biofilmu na powierzchni abiotycznej przejawiany przez mutanty *graRS* bez obecności cytrynianu związany jest z obniżonym stężeniem białka Dlt w komórce. Prowadzi to do zwiększenia zdolności gronkowców do przylegania do powierzchni [68].

3.2.3. System WalKR u *S. aureus*

Silnie konserwowany WalKR, znany także pod nazwą *YycGF*, dwuskładnikowy system regulacyjny jest

charakterystyczny dla bakterii Gram-dodatnich o małej zawartości par GC w genomie. Wykazano obecność tego typu systemu m.in. w przypadku *S. aureus* [17], [49], *B. subtilis* [20, 21], *E. faecalis* [30], *L. monocytogenes* [37], *S. pneumoniae* [40] i *S. mutans* [66]. System WalKR kodowany jest przez operon *yycFG*, którego dwa pierwsze geny kodują odpowiednio kinazę histydynową WalK oraz regulator odpowiedzi WalR [16]. Wykazano, że system ten odgrywa istotną rolę w metabolizmie ściany komórkowej, bierze również udział w tworzeniu biofilmu. Wykazano, że inaktywacja WalKR prowadzi do powstania fenotypu charakteryzującego się brakiem oporności na środki powierzchniowo czynne tj. Triton X-100, brakiem agregacji komórek oraz zaburzeniami w tworzeniu biofilmu [16].

3.2.4. System LytSR u *S. aureus*

Operon *lytSR* *S. aureus* koduje dwuskładnikowy system regulacyjny LytSR. Inaktywacja *lytSR* powoduje zmianę aktywności hydrolaz mureiny wytwarzanych przez komórki tego patogenu oraz zaburzenia w spontanicznej ich lizie. Po odpowiedniej stymulacji komponent sensorowy LytS oddziałuje z regulatorem odpowiedzi LytR, który z kolei aktywuje ekspresję genów znajdujących się pod jego kontrolą. Jednym z miejsc docelowych systemu LytSR jest operon *lrgAB*, który wraz z operonem *cidAB* kontroluje śmierć oraz lizę komórkową [26, 63]. Gen *cidA* koduje białko podobne do holiny, które jest aktywatorem hydrolaz mureiny i lizy komórek *S. aureus*, podczas gdy *lrgA* koduje antyholinę pełniącą rolę inhibitora wspomnianych procesów [26]. Ostatnie badania wskazują, że biologiczną funkcją operonów *cid* oraz *lrg* jest kontrola śmierci komórek oraz ich lizy podczas rozwoju biofilmu *S. aureus* [3, 62, 70, 80]. Produkt genu *cidA* jest pozytywnym efektem lizy komórek i uwalniania pozakomórkowego DNA z biofilmu podczas gdy operon *lrg* jest inhibitorem lizy. W celu zbadania wpływu dwuskładnikowego systemu regulacyjnego LytSR na rozwój biofilmu, inaktywowano operon *lytSR* klinicznego szczepu *S. aureus* UAMS-1 i wykazano, że jest on niezbędny do rozwoju prawidłowego biofilmu tego szczepu [69].

3.2.5. System SaeRS u *S. aureus* oraz *S. epidermidis*

System SaeRS początkowo został zidentyfikowany w genomie *S. aureus*. Wykazano jego udział w syntezie adhezyn [32] oraz γ -hemolizyny [83]. U gronkowca złożonego operon *sae* koduje cztery geny *saePQRS*, spośród których gen *saeR* koduje białko regulatorowe a gen *saeS* kinazę histydynową [23]. Funkcja dwóch pozostałych genów jak dotąd nie została poznana, jednakże upatruje się ich roli w regulacji zależnej od operonu [57]. Dwuskładnikowy system regulacyjny SaeRS, będący jednym z 17 zidentyfikowanych w genomie tego patogenu, zaangażowany jest w wirulencję oraz tworzenie

biofilmu. Wykazano także, że delecja *saeR* powoduje zaburzenia wzrostu w warunkach beztlenowych oraz zmniejszenie zdolności do asymilacji azotu. Ponieważ udziału systemu SearRS w formowaniu biofilmu i autolizie *S. epidermidis* pozostawał kwestią sporną, utworzono mutantą zarówno w genie *seaR* jak i *saeS*. Okazało się, że delecja *saeRS* powoduje zwiększenie zdolności do tworzenia biofilmu oraz stężenia eDNA w macierzy zewnątrzkomórkowej. Komórki zmutowanego szczepu cechowała także zwiększona zdolność do autolizy oraz zmniejszona żywotność zarówno w postaci planktonowej jak i w formie biofilmu [31, 48].

3.3. Biofilm enterokoków

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* uważane są za patogeny oportunistyczne. *Enterococcus faecalis* jest jednym z najczęściej występujących gatunków enterokoków u ludzi i odpowiada za ok. 80–90% zakażeń. *E. faecalis* oraz *E. faecium* wykazują zdolność do tworzenia biofilmu. Białkami zaangażowanymi w tworzenie biofilmu enterokoków są m.in. **Esp** (Enterococcal surface protein), **Fsr** (*E. faecalis* regulator), **GelE**, **Epa** (Enterococcal polysaccharide antigen), **Atn**, **EtaR**, **SalB** (Secretory antigen-like B), **SalA** (Secretory antigen – like A), **DltA**, **Bop** (Biofilm on plastic surface), **EbpABC** (Endocarditis and biofilm-associated pili), **EbpR**, **Bee** (Biofilm enhancer in *Enterococcus*), **SrtC** [52].

W genomie *E. faecalis* V583 zidentyfikowano 17 dwuskładnikowych systemów regulacyjnych oraz pojedyncze białko regulatorowe, które odgrywają rolę w tworzeniu biofilmu [28].

3.3.1. System FsrABC u *E. faecalis*

Wśród zidentyfikowanych w genomie *E. faecalis* V583 systemów – system FsrABC może mieć wpływ na tworzenie biofilmu [29]. Operon *fsr* koduje trzy geny *fsrA*, *farB*, *fsrC*. FsrC to kinaza histydynowa, z kolei FsrA to regulator odpowiedzi. Produkty operonu *fsr* są niezbędne do syntezy dwóch proteaz sekrecyjnych, żelatynazy (GalE) oraz proteazy serynowej (SprE) [60]. Liczne badania nad systemem FsrABC wykazały, że kontroluje on rozwój biofilmu *E. faecalis* poprzez syntezę żelatynazy. Spośród 18 regulatorów odpowiedzi zidentyfikowanych w genomie tego patogenu jedynie inaktywacja genu *fsrA* powodowała znaczne ograniczenie zdolności do tworzenia biofilmu na polistyrenowych płytkach przez zmutowany szczep. Ponieważ gen *fsrA* jest jednym z trzech kodowanych na operonie *fsrABC*, odpowiadającym za syntezę GelE oraz SprE, badano także wpływ inaktywacji genów *fsrB*, *fsrC*, *gelE*, *sprE* na tworzenie biofilmu przez *E. faecalis* V583. Analiza mutantów w wyżej wymienionych genach wykazała, że z wyjątkiem genu proteazy serynowej *sprE*, wszystkie zmutowane szczepy cechowała zmniejszona zdolność do tworzenia biofilmu [28].

3.3.2. System EtaSR *E. faecalis*

Kolejnym dwuskładnikowym systemem zidentyfikowanym w genomie *E. faecalis* V583 jest EtaSR. Składa się on z regulatora odpowiedzi EtaR, wykazującego duże podobieństwo do LisR *L. monocytogenes* (77%) i do białka regulatorowego CsrR *S. pyogenes* (70%) oraz kinazy histydynowej EtaS, która w 53% jest homologiczna do LisK *L. monocytogenes*, a w 54% do CsrS *S. pyogenes*. System ten okazuje się być zaangażowany w odpowiedź na stres komórkowy oraz wirulencję *E. faecalis*. W warunkach *in vitro* szczep z mutacją w systemie *etaSR* cechuje większa wrażliwość na niskie pH oraz większa odporność na wysoką temperaturę (55°C) w porównaniu do szczepu dzikiego *E. faecalis* V583. Stwierdzono także udział EtaSR w tworzeniu biofilmu. Jednak szczep z mutacją w genie *etaR* wykazywał niewielkie zmiany w strukturze biofilmu [76].

4. Podsumowanie

Liczba wykrytych dwuskładnikowych systemów regulacyjnych związanych z tworzeniem biofilmu wzrosła w ostatnich latach głównie ze względu na duży postęp w dziedzinie genomiki i proteomiki. Mimo iż znanych jest wiele czynników biorących udział w tworzeniu biofilmu niezbędne są dodatkowe badania i eksperymenty aby umożliwić lepsze zrozumienie regulacji procesu powstawania biofilmu. Oceniono, że około 95% mikroorganizmów żyjących w naturze tworzy biofilmy [74]. Komórki bakteryjne takiej społeczności cechuje duża żywotność oraz odporność na wiele stosowanych antybiotyków, dlatego dogłębne poznanie funkcjonowania TCS zaangażowanych w tworzenie biofilmu wydają się konieczne do walki z wciąż rosnącą opornością bakterii.

Piśmiennictwo

1. Abee T., Kovács A.T., Kuipers O.P., van der Veen S.: Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 172–179 (2011)
2. Ajdic, D., McShan W.M., McLaughlin R.E., Savic G., Chang J., Carson M.B., Primeaux C., Tian R., Kenton S., Jia H., Lin S., Qian Y., Li S., Zhu H., Najjar F., Lai H., White J., Roe B.A., Ferretti J.J.: Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14434–14439 (2002)
3. Allesen-Holm M., Barken K.B., Yang L., Klausen M., Webb J.S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T.: A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* **59**, 1114–1128 (2006)
4. Aparna M. S., Yadav S.: Biofilms: microbes and disease. *Braz. J. Infect. Dis.* **12**, 526–530 (2008)
5. Baj J., Markiewicz Z. (red.): *Biologia molekularna bakterii*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa – 2006
6. Balaban N., Goldkorn T., Gov Y., Hirshberg M., Koyfman N., Matthews H.R., Nhan R.T., Singh B., Uziel O.: Regulation of

- Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNA III activating protein (TRAP). *J. Biol. Chem.* **276**, 2658–2667 (2001)
7. Beier, D., Gross R.: Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 143–152 (2006)
 8. Bijlsma J.J., Groisman E.A.: Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends Microbiol.* **11**, 359–366 (2003)
 9. Bourret R.B., Silversmith R.E.: Two-component signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 113–115 (2010)
 10. Cheung J., Hendricksom W.A.: Sensor domains of two-component regulatory systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 116–123 (2010)
 11. Cho K.H., Caparon M.G.: Patterns of virulence gene expression differ between biofilm and tissue communities of *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* **57**, 1545–1556 (2005)
 12. Chong P., Drake L., Biswas I.: LiaS regulates virulence factor expression in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **76**, 3093–3099 (2008)
 13. Cvitkovitch D.G., Li Y.H., Ellen R.P.: Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J. Clin. Invest.* **112**, 1626–1632 (2003)
 14. Dmitriev A., Mohapatra S.S., Chong P., Neely M., Biswas S., Biswas I.: CovR-controlled global regulation of gene expression in *Streptococcus mutans*. *PLoS One*, **6**, 1–11 (2011)
 15. Dubrac S., Bisicchia P., Devine K.M., Msadek T.: A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Mol. Microbiol.* **70**, 1307–1322 (2008)
 16. Dubrac S., Boneca I.G., Poupel O., Msadek T.: New insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**, 8257–8269 (2007)
 17. Dubrac S., Msadek T.: Identification of genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**, 1175–1181 (2004)
 18. Dunne W.M.: Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 155–166 (2002)
 19. Eguchi Y., Utsumi R.: Introduction to bacterial signal transduction networks. *Adv. Exp. Med. Biol.* **631**, 1–6 (2008)
 20. Fabret, C., Hoch J.A.: A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J. Bacteriol.* **180**, 6375–6383 (1998)
 21. Fukuchi K., Kasahara Y., Asai K., Kobayashi K., Moriya S., Ogasawara N.: The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **146**, 1573–1583 (2000)
 22. Galperin M.Y.: Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 150–159 (2010)
 23. Giraud, A.T., Calzolari A., Cataldi A.A., C. Bogno, Nagel R.: 1999. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 15–22
 24. Gotz F.: *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* **43**, 1367–1378 (2002)
 25. Gov Y., Borovok I., Korem M., Singh V.K., Jayaswal R.K., Wilkinson B.J., Rich S.M., Balaban N.: Quorum sensing in staphylococci is regulated via phosphorylation of three conserved histidine residues. *J. Biol. Chem.* **279**, 14665–14672 (2004)
 26. Groicher K.H., Firek B.A., Fujimoto D.F., Bayles K.W.: The *Staphylococcus aureus* *lrgAB* operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* **182**, 1794–1801 (2000)
 27. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004)
 28. Hancock L., Perego M.: Two-component signal transduction in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **184**, 5819–5825 (2002)
 29. Hancock L., Perygo M.: The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.* **186**, 5629–5639 (2004)
 30. Hancock L., Perego M.: Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis* V583. *J. Bacteriol.* **186**, 7951–7958 (2004)
 31. Handke L.D., Rogers K.L., Olson M.E., Somerville G.A., Jerrells T. J., Rupp M.E., Dunman P.M., Fey P.D.: *Staphylococcus epidermidis* *saeR* is an effector of anaerobic growth and a mediator of acute inflammation. *Infect. Immun.* **76**, 141–152 (2008)
 32. Harraghy N., Kormanec J., Wolz C., Homerova D., Goerke C., Ohlsen K., Qazi S., Hill P., Herrmann M.: *sae* is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology*, **151**, 1789–1800 (2005)
 33. He X., Wu C., Yarbrough D., Sim L., Niu G., Merritt J., Shi W., Qi F.: The *cia* operon of *Streptococcus mutans* encodes a unique component required for calcium-mediated autoregulation. *Mol. Microbiol.* **70**, 112–126 (2008)
 34. Hoffer S.M., Westerhoff H.V., Hellingwerf K.J., Postma P.W., Tommassen J.: Autoamplification of a two-component regulatory system results in “learning” behavior. *J. Bacteriol.* **183**, 4914–4917 (2001)
 35. Jaworski A., Serweciński L., Stączek P.: Quorum sensing – komunikowanie się komórek w populacji bakterii przy udziale chemicznych cząstek sygnałowych. *Post. Biol. Kom.* **32**, 231–256 (2005)
 36. Juda M., Dadas E., Malm E.: Rola dwuskładnikowych systemów regulacyjnych w chorobotwórczości i lekooporności bakterii. *Post. Mikrobiol.* **46**, 237–248 (2007)
 37. Kallipolitis B.H., Ingmer H.: *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 111–115 (2001)
 38. Kato A., Tanabe H., Utsumi R.: Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in *Escherichia coli* K-12: identification of extracellular Mg²⁺-responsive promoters. *J. Bacteriol.* **181**, 5516–5520 (1999)
 39. Kroes I., Lepp P.W., Relman D.A. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14547–14552 (1999)
 40. Lange R., Wagner C., de Saizieu A., Flint N., Molnos J., Stieger M., Caspers P., Kamber M., Keck W., Amrein K.E.: Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*, **237**, 223–234 (1999)
 41. Lembke C., Podbielski A., Hidalgo-Grass C., Jonas L., Hanski E., Kreikemeyer B.: Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2864–2875 (2006)
 42. Lévesque C.M., Mair R.W., Perry J.A., Lau P.C., Li Y.H., Cvitkovitch D.G.: Systemic inactivation and phenotypic characterization of two-component systems in expression of *Streptococcus mutans* virulence properties. *Let. Appl. Microbiol.* **45**, 398–404 (2007)
 43. Levin J.C., Wessels M.R. : Identification of *csrR/csrS*, a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in group A Streptococcus. *Mol. Microbiol.* **30**, 209–219 (1998)
 44. Li Y.H., Lau P.C., Tang N., Svensäter G., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G.: Novel two-component regulatory system involved in

- biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **184**, 6333–6342 (2002)
45. Li Y.H., Tang N., Aspiras M.B., Lau P.C., Lee J.H., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G.: A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **184**, 2699–2708 (2002)
 46. Li Y.H., Tian X.L., Layton G., Norgaard C., Sisson G.: Additive attenuation of virulence and cariogenic potential of *Streptococcus mutans* by simultaneous inactivation of the ComCDE quorum-sensing system and HK/RR11 two-component regulatory system. *Microbiology*, **154**, 3256–3265 (2008)
 47. López D., Vlamakis H., Kolter R.: Biofilms. *Cold Spring Harbour Perspect. Biol.* **2**, 1–11 (2010)
 48. Lou Q., Zhu T., Hu J., Ben H., Yang J., Yu F., Liu J., Wu Y., Fischer A., Francois P., Schrenzel J., Qu D.: Role of the SaeRS two-component regulatory system in *Staphylococcus epidermidis* autolysis and biofilm formation. *BMC Microbiol.* **11**, 1–15 (2011)
 49. Martin P.K., Li T., Sun D., Biek D.P., Schmid M.B.: Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **181**, 3666–3673 (1999)
 50. Mascher T., Zähner D., Merai M., Balmelle N., de Saizieu A.B., Hakenbeck R.: The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J. Bacteriol.* **185**, 60–70 (2003)
 51. Mitrophanov A.Y., Groisman E.A.: Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes. Dev.* **22**, 2601–2611 (2008)
 52. Mohamed J.A., Huang D.B.: Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1581–1588 (2007)
 53. Nakayama J., Cao Y., Horii T., Sakuda S., Akkermans A.D., de Vos W.M., Nagasawa H.: Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **41**, 145–154 (2001)
 54. Nakayama J., Tanaka E., Kariyama R., Nagata K., Nishiguchi K., Mitsuhashi R., Uemura Y., Tanokura M., Kumon H., Sonomoto K.: Siamycin attenuates *fsr* quorum sensing mediated by a gelatinase biosynthesis-activating pheromone in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **189**, 1358–1365 (2007)
 55. Ninfa A.J., Magasanik B.: Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5909–5913 (1986)
 56. Nixon B.T., Ronson C.W., Ausubel F.M.: Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7850–7854 (1986)
 57. Novick R.P., Jiang D.: The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiology*, **149**, 2709–2717 (2003)
 58. Perry J.A., Lévesque C.M., Suntharalingam P., Mair R.W., Bu M., Cline R.T., Peterson S.N., Cvitkovitch D.G.: Involvement of *Streptococcus mutans* regulator RR11 in oxidative stress response during biofilm growth and in the development of genetic competence. *Lett. Appl. Microbiol.* **47**, 439–444 (2008)
 59. Peterson M.M., Mack J.L., Hall P.R., Alsup A.A., Alexander S.M., Sully E.K., Sawires Y.S., Cheung A.L., Otto M., Gresham H.D.: Apolipoprotein B Is an innate barrier against invasive *Staphylococcus aureus* infection. *Cell Host Microbe*, **4**, 555–566 (2008)
 60. Qin X., Singh K.V., Weinstock G.M., Murray B.E.: Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J. Bacteriol.* **183**, 3372–3382 (2001)
 61. Qin Z., Zhang J., Xu B., Chen L., Wu Y., Yang X., Shen X., Molin S., Danchin A., Jiang H., Qu D.: Structure-based discovery of inhibitors of the YycG histidine kinase: new chemical leads to combat *Staphylococcus epidermidis* infections. *BMC Microbiol.* **10**, 96 (2006)
 62. Rice K.C., Bayles K. W.: Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 85–109 (2008)
 63. Rice K.C., Firek B.A., Nelson J.B., Yang S.J., Patton T.G., Bayles K.W.: The *Staphylococcus aureus* *cidAB* operon: evaluation of its role in regulation of murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J. Bacteriol.* **185**, 2635–2643 (2003)
 64. Rice L.B.: Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 183–187 (2001)
 65. Senadheera D., Cvitkovitch D.G.: Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **631**, 178–188 (2008)
 66. Senadheera M.D., Guggenheim B., Spatafora G.A., Huang Y.C., Choi J., Hung D.C., Treglown J.S., Goodman S.D., Ellen R.P., Cvitkovitch D.G.: A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gpbB*, and *fff* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J. Bacteriol.* **187**, 4064–4076 (2005)
 67. Senadheera M.D., Lee A.W., Hung D.C., Spatafora G.A., Goodman S.D., Cvitkovitch D.G.: The *Streptococcus mutans* *vicX* gene product modulates *gtfB/C* expression, biofilm formation, genetic competence, and oxidative stress tolerance. *J. Bacteriol.* **189**, 1451–1458 (2007)
 68. Shanks R.M., Meehl M.A., Brothers K.M., Martinez R.M., Donegan N.P., Graber M.L., Cheung A.L., O’Toole G.A.: Genetic evidence for an alternative citrate-dependent biofilm formation pathway in *Staphylococcus aureus* that is dependent on fibronectin binding proteins and the GraRS two-component regulatory system. *Infect. Immun.* **76**, 2469–2477 (2008)
 69. Sharma-Kuinkel B.K., Mann E.E., Ahn J.S., Kuechenmeister L.J., Dunman P.M., Bayles K.W.: The *Staphylococcus aureus* LytSR two-component regulatory system affects biofilm formation. *J. Bacteriol.* **191**, 4767–4775 (2009)
 70. Spoering A.L., Gilmore M.S.: Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 133–137 (2006)
 71. Steinhuber A., Goerke C., Bayer M.G., Doring G., Wolz C.: 2003. Molecular architecture of the regulatory locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* **185**: 6278–6286
 72. Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N.: Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 183–215 (2000)
 73. Strużycka I., Radziejewska M., Rucińska K.: Epidemiologia bakterii z grupy *Streptococcus mutans* w różnych populacjach. *Nowa Stomatologia*, 1/2001, 20–23
 74. Strużycka I., Stępień I.: Biofilm nowy sposób rozumienia mikrobiologii. *Nowa Stomatologia* 3/2009, 85–89
 75. Sugareva V., Arlt R., Fiedler T., Riani C., Podbielski A., Kreikemeyer B.: Serotype – and strain- dependent contribution of the sensor kinase CovS of the CovRS two-component system to *Streptococcus pyogenes* pathogenesis. *BMC Microbiol.* **10**, 10–34 (2010)
 76. Teng F., Wang L., Singh K.V., Murray B.E., Weinstock G.M.: Involvement of PhoP-PhoS homologs in *Enterococcus faecalis* virulence. *Infect. Immun.* **70**, 1991–1996 (2002)
 77. Toledo-Arana A., Merino N., Vergara-Irigaray M., Débarbouillé M., Penadés J.R., Lasa I.: *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *J. Bacteriol.* **187**, 5318–5329 (2005)

78. Vos P, Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W.B: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. II Edycja. Vol. 3: The Firmicutes. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York – 2009 s. 662–663
79. West A.H., Stock A.M.: Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 369–376 (2001)
80. Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S.: Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, **295**, 1487 (2002)
81. Winkler M.E., Hoch J.A.: Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **190**, 2645–2648 (2008)
82. Wu C., Ayala E.A., Downey J.S., Merritt J., Goodman S.D., Qi F.: Regulation of *ciaXRRH* operon expression and identification of the CiaR regulon in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **192**, 4669–4679 (2010)
83. Yamazaki K., Kato F., Kamio Y., Kaneko J.: Expression of gamma-hemolysin regulated by *sae* in *Staphylococcus aureus* strain Smith 5R. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**, 174–180 (2006)
84. Zhang Y., Lei Y., Khammanivong A., Herzberg M.C.: Identification of a novel two-component system in *Streptococcus gordonii* V288 involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* **72**, 3489–3494 (2004)
85. Zhang Y.Q., Ren S.X., Li H.L., Wang Y.X., Fu G., Yang J., Qin Z.Q., Miao Y.G., Wang W.Y., Chen R.S., Shen Y., Chen Z., Yuan Z.H., Zhao G.P., Qu D., Danchin A., Wen Y.M.: Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol.* **49**, 1577–1593 (2003)
86. Zhang Y., Whiteley M., Kreth J., Lei Y., Khammanivong A., Evavold J.N., Fan J., Herzberg M.C.: The two-component system BfrAB regulates expression of ABC transporters in *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus sanguinis*. *Microbiology*, **155**, 165–173 (2009)

Elżbieta Anna Trafny*

Zakład Mikrobiologii, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Czy komórki nabłonkowe i limfoidalne migdałków stanowią rezerwuár patogenów wywołujących nawracające zakażenia górnych dróg oddechowych (GDO) i ucha? 3. Adhezyny umożliwiające przyleganie patogenów GDO do komórek gospodarza. 3.1. Adhezyny bakterii Gram-ujemnych. 3.2. Adhezyny ziarenkowców Gram-dodatnich. 3.3. Wpływ niskiej temperatury na ekspresję genów kodujących adhezyny u patogenów GDO. 4. Mechanizmy internalizacji patogenów do komórek gospodarza. 5. Sposoby przetrwania patogenów GDO wewnątrz komórek ssaków. 6. Wrażliwość wewnątrzkomórkowych patogenów GDO na antybiotyki i chemioterapeutyki.

Intracellular opportunistic bacteria in upper respiratory tract and ear infections

Abstract: The pathogens commonly causing the upper respiratory tract infections: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* are able to exist within host cells in human upper respiratory tract. They may be found both in homogenates of the adenoids and tonsils and inside epithelial and monocyte/macrophage cells isolated from these tissues. The bacteria also invade epithelium of middle ear mucosa. They are alive and can multiply in the cytoplasm. Numerous adhesins are responsible for a tight attachment of bacterial cells to epithelial and endothelial cells as well as to lymphocytes. These adhesins mediate bacterial internalization by human cells. Some bacteria, e.g. *S. aureus*, are able to persist viable within host cell compartments for several days in high numbers. Bacterial persistence in the cellular interior allows evading immunological defences and bactericidal activity of antimicrobials, thereby creating an intercellular reservoir of pathogenic and/or opportunistic bacteria. Antibacterial agents, even when are applied in doses exceeding the MIC values, do not eradicate these bacteria from the intracellular compartment. This feature of intracellular bacteria resembles the characteristic attributes of biofilms, i.e. their increased tolerance to bactericidal antimicrobials.

1. Introduction. 2. Do epithelial and lymphoid cells constitute a reservoir of pathogens causing recurrent infections of upper respiratory tract (URT) and ear? 3. Adhesins that facilitate attachment of UTR pathogens to host cells. 3. Adhesins of Gram-negative bacteria. 3.2. Adhesins of Gram-positive coccal bacteria. 3.3. The effect of low temperature on the expression of the genes encoding adhesins of URT pathogens. 4. The internalization mechanisms of URT pathogens into host cells. 5. Bacterial strategies to persist within mammalian cells. 6. Susceptibility of the intracellular URT pathogens toward antibiotics.

Słowa kluczowe: wewnątrzkomórkowe bakterie, przetrwanie, wrażliwość na antybiotyki

Key words: intracellular bacteria, persistence, antibiotic susceptibility

1. Wprowadzenie

Górne drogi oddechowe (GDO) obejmują jamy nosowe, zatoki przynosowe oraz gardło. U zdrowych ludzi zatoki przynosowe i ucho środkowe nie są skolonizowane przez drobnoustroje i uznaje się, że w warunkach zdrowia stanowią one przestrzenie jałowe. Nabłonek pokrywający pozostałe miejsca anatomiczne górnych dróg oddechowych pozostaje w nieustannym kontakcie z drobnoustrojami przenoszonymi drogą powietrzną (w postaci bioaerozoli) lub drogą kontaktową (najczęściej na skórze rąk). Pomimo, że liczne mechanizmy obronne zarówno strukturalne (np. rzęski nabłonka migawkowego), jak i immunologiczne (odporność nieswoista i swoista) warunkują względną odporność GDO na zakażenia bakteryjne, to jednak często dochodzi do przełamania tych barier i rozwoju

pełnoobjawowego zapalenia. Wówczas zespół chorobotwórczych cech drobnoustrojów, umożliwiających im namnażanie i przetrwanie w organizmie gospodarza, niesprawność mechanizmów obrony immunologicznej chorego a także nieprawidłowy sposób leczenia lub zbyt późna decyzja o rozpoczęciu terapii mogą stanowić czynniki sprzyjające rozwojowi przewlekłej i nawracającej postaci zakażenia, niepodatnej na leczenie za pomocą antybiotyków i chemioterapeutyków.

Spośród wielu gatunków bakterii wywołujących zakażenia GDO najczęściej izoluje się szczepy *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Moraxella catarrhalis* [23]. Gatunki te wchodzą w skład flory fizjologicznej człowieka i są potencjalnie chorobotwórcze. W ostatnich latach zaczął przeważać pogląd, że *M. catarrhalis* jest bezwzględny patogenem układu

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, ul. Kozielska 4, 01-163 Warszawa, e-mail: e.trafny@wihe.waw.pl

oddechowego człowieka [19]. W najwyższym odsetku z wymazów z migdałków podniebiennych u dzieci izolowane są pałeczki *H. influenzae*. Częstość izolacji tego gatunku bakterii sięga 40% wymazów, wobec obecności β -hemolizujących paciorkowców z grupy A w 13%, a gronkowca złocistego i *M. catarrhalis* w 6% wymazów. Wyniki te otrzymano w randomizowanych badaniach 300 dzieci z zapaleniami gardła (do trzech epizodów w ciągu roku) i umiarkowanym przerostem migdałka gardłowego [46]. Badania wykonane za pomocą techniki PCR na skrawkach migdałków podniebiennych i gardłowego pozyskanych od dzieci poddanych adenoidektomii i tonsillektomii (n = 55) wykazały obecność *S. pyogenes* (u 67,3% chorych), *M. catarrhalis* i *H. influenzae* (54,5%), *Mycoplasma pneumoniae* (10,9%) oraz materiału genetycznego adenowirusów (18,2%) w badanych tkankach [65]. Od dzieci z wysiękowym zapaleniem ucha środkowego izolowane są często lekooporne szczepy *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *H. influenzae* a także *Pseudomonas aeruginosa* [97]. Do zapalenia ucha środkowego dochodzi zazwyczaj na skutek powikłań stanów zapalnych w obrębie nosogardła.

Często wyniki posiewów wymazów z nosogardła wskazują na jednoczesną kolonizację nabłonków kilkoma gatunkami bakterii potencjalnie chorobotwórczych. Wykonane ostatnio badania u dzieci z przewlekłym zapaleniem ucha środkowego za pomocą techniki pirosekwencjonowania fragmentów genów 16S rRNA pokazały, że w uchu środkowym przeważają liczbowo bakterie z rodziny *Pseudomonaceae* (82,7%), natomiast flora migdałków podniebiennych zdominowana jest liczbowo przez ziarenkowce z rodziny *Streptococcaceae* (69,2%). Najbardziej różnorodna flora występuje w migdałku gardłowym; wśród bakterii wyróżnić można rodziny *Pseudomonaceae*, *Streptococcaceae*, *Fusobacteriaceae* i *Pasteurellaceae* [51]. Drobnoustroje te mogą ze sobą współzawodniczyć, eliminując się nawzajem z danej niszy lub też zmieniać własności molekularne ścian komórek sąsiadującego gatunku, tak aby usposobić je na oddziaływanie czynników obrony humoralnej. Szczepy *S. pneumoniae* wydzielają enzym neuraminidazę A, która hydrolizuje reszty kwasu sialowego i przez to redukuje liczbę reszt tego kwasu związanych z liposacharydami ściany komórkowej pałeczek *H. influenzae* i *Neisseria meningitidis*. W ten sposób komórki tych gatunków drobnoustrojów stają się bardziej podatne na działanie układu dopełniacza [73]. Interakcje pomiędzy *H. influenzae* i *S. pneumoniae* prowadzą do wydajniejszego tworzenia biofilmu przez pneumokoki [92]. Wzajemne relacje ilościowe i jakościowe pomiędzy różnymi gatunkami drobnoustrojów zasiedlającymi nabłonek nosogardła mogą ulegać zmianom pod wpływem celowanej terapii lub swoistych szczepionek. W prospektywnych badaniach kohortowych przeprowadzonych z udziałem 212 zdrowych dzieci w wieku od 6 do 36 miesięcy stwierdzono,

że eliminacja bakterii z gatunków *S. pneumoniae* lub *H. influenzae* może zwiększać ryzyko zakażenia GDO szczepami *S. aureus* [64].

Istotny wpływ na wyniki dotyczące częstości izolacji poszczególnych gatunków potencjalnych patogenów GDO ma sposób pozyskania materiału do badań. Izolaty *H. influenzae* są istotnie częściej wyosabniane z posiewów wymazów z tylnej części gardła niż z wymazów powierzchni migdałków podniebiennych. Natomiast β -hemolizujące paciorkowce z grupy A (GABHS) znacznie częściej izolowane są z wymazów z migdałków podniebiennych niż z wymazów z tylnej części gardła [89]. *M. catarrhalis* znajdowana jest w posiewach wymazów gardła od około 4% starszych dzieci i dorosłych, natomiast odsetek izolacji tych bakterii wzrasta w trakcie ostrych zakażeń wirusowych górnych dróg oddechowych. Jedną z możliwych interpretacji tego zjawiska jest przyjęcie hipotezy o bytowaniu tych drobnoustrojów w tkance limfoidalnej, niedostępnej do badania metodą wymazów [19].

2. Czy komórki nabłonkowe i limfoidalne migdałków stanowią rezerwuar patogenów wywołujących nawracające zakażenia GDO i ucha?

Uczeni już w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku zwrócili uwagę na zdolność przeżycia patogenów GDO wewnątrz komórek gospodarza: komórek nabłonkowych oraz wielojądrzastych neutrofilii, monocytów i makrofagów. St Geme i Falkow [81] pokazali, że komórki klinicznego nietypującego się szczepu *H. influenzae* (NTHi) nie tylko przylegają, ale też wnikają do ludzkich komórek nabłonka linii Chang (ATCC CCL 20.2). Pałeczki te wykazują także zdolność do przeżycia i namnażania się w makrofagach o fenotypie CD14⁺, które zlokalizowane są pod nabłonkiem pokrywającym migdałek gardłowy u dzieci z zapaleniem ucha środkowego lub przerostem migdałka gardłowego [24]. Spośród 33 klinicznych izolatów NTHi 82% wykazywało zdolność przeżycia w znacznej liczbie (2×10^4 CFU) w ciągu co najmniej 24 godzin w mysich komórkach makrofagalnych linii J774 [17]. Otoczkowe szczepy *H. influenzae* typu b nie wnikają do komórek nabłonka linii komórkowej HEp-2, HeLa, ani też do psich komórek nerkowych Madin-Darby'ego [96].

Podobnie szczepy *S. pyogenes* znaleziono wewnątrz komórek tkanki migdałków gardłowych, pobranych od dorosłych chorych z bakteryjnymi infekcjami gardła (*tonsillopharyngitis*), za pomocą immunochemicznego barwienia skrawków badanej tkanki. Częstość występowania szczepów GABHS wewnątrz komórek migdałka wynosiła 3 na 29 badanych próbek. Izolaty te były wirulentne [66]. Kolejną przesłanką mogącą wskazywać na występowanie GABHS nie tylko na powierzchni nabłonków było wykazanie obecności DNA paciorkowców za

pomocą techniki RT-PCR w wycinkach tkanki migdałków podniebiennych. Zjawisko to zaobserwowano u 35 na ogólną liczbę 130 chorych poddanych zabiegowi przycięcia migdałków ze wskazań medycznych. U siedmiu chorych DNA paciorkowców wykryto jedynie w wycinkach tkanki migdałków a nie w wymazach, co wskazuje na możliwość istnienia rezerwuaru patogenów w tkance limfoidalnej gardła [47]. Liczne żywe bakterie pozyskano też z homogenatów tkanki migdałka gardłowego. W 79,3% homogenatów migdałków gardłowych pobranych od 410 dzieci poniżej 14 lat zaobserwowano występowanie w najwyższym odsetku pałeczek *H. influenzae* (28,5%) a następnie *S. pneumoniae* (21,7%), *S. pyogenes* i *Staphylococcus aureus* (15,6%). Częstość izolacji tych gatunków bakterii z homogenatów migdałków gardłowych była wprost proporcjonalnie zależna od chorobowych zmian w zatokach nosowych u operowanych dzieci [74]. Znacznie wyższy odsetek (60%) izolacji *S. aureus* uzyskano z posiewów homogenatów tkanki migdałków podniebiennych, pozyskanych od dzieci z przerostem migdałków (n = 33) [20].

Żywe i hodowlalne Gram-ujemne dwoinki *M. catarrhalis* pozyskano z tkanki limfoidalnej migdałków gardłowego i podniebiennych po posiewie homogenatu tkanek oraz zidentyfikowano metodą FISH (fluorescence in situ hybridization) w skrawkach tkanki limfoidalnej migdałków jako specyficznie wyznakowane komórki bakteryjne powiązane z makrofagami o fenotypie CD14⁺ i CD68⁺. Zastosowanie mikroskopii konfokalnej (CLSM) pozwoliło na stwierdzenie, że żywe pałeczki *Moraxella* znajdują się w cytozolu makrofagów [34].

Przez pewien czas hipoteza zakładająca istnienie wewnątrzkomórkowego rezerwuaru potencjalnych patogenów GDO postrzegana była jako alternatywna w stosunku do hipotezy uznającej wzrost w postaci biofilmu jako podstawową strategię przetrwania drobnoustrojów w organizmie gospodarza [31, 32]. Natomiast w ostatnich latach wielu badaczy donosi o jednoczasowej obserwacji tych samych gatunków bakterii, występujących w biofilmach na powierzchni, jak i wewnątrz komórek nabłonka błony śluzowej. Badania wykonane za pomocą CLSM i techniki FISH na bioptatach błony śluzowej ucha środkowego pobranych od dzieci z przewlekłym zapaleniem ucha z wysiękiem lub z nawracającym ostrym zapaleniem ucha środkowego (n = 20) wykazały obecność *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* i *S. aureus* zarówno w biofilmach na powierzchni błony śluzowej, jak i w komórkach nabłonka. Biofilm na powierzchni błony śluzowej badanych bioptatów obserwowano w 64% próbek, natomiast obecność wewnątrzkomórkowych, aktywnie metabolizujących bakterii – w 71% próbek [36]. W oparciu o te obserwacje coraz szerzej jest akceptowany pogląd, że zarówno wzrost bakterii w postaci biofilmu, jak też ich występowanie w komórkach gospodarza przyczyniają się w podobnym stopniu do rozwoju zakażeń GDO i ucha, a także

zwiększają prawdopodobieństwo przetrwania drobnoustrojów [40]. Analiza obrazów mikroskopowych badanych bioptatów błony śluzowej ucha środkowego wykazała obecność wewnątrzkomórkowych agregatów bakterii, które były bardzo podobne do wewnątrzkomórkowych populacji uropatogennych szczepów *E. coli* rosnących w postaci biofilmów w komórkach nabłonka pęcherza moczowego u kobiet z przewlekłym zapaleniem pęcherza [85]. Zatem patogeny GDO i ucha mogą prawdopodobnie rosnąć w postaci biofilmu zarówno na powierzchni, jak i wewnątrz komórek gospodarza, co może przejawiać się m.in. zwiększoną tolerancją na środki przeciwbakteryjne [39, 55].

3. Adhezyny umożliwiające przyleganie patogenów GDO do komórek gospodarza

Obecny pogląd na rozwój zakażeń GDO zakłada pewną sekwencję zdarzeń podczas inwazji drobnoustrojów do tkanek nosogardła. Za pierwszy i podstawowy etap rozwoju zakażenia przebiegającego z udziałem wewnątrzkomórkowych bakterii uważana jest adhezja do komórek nabłonka. Adhezja ta zachodzi przy udziale makrocząsteczek – adhezyn bakteryjnych, które oddziałują ze specyficznymi receptorami eksponowanymi na powierzchni komórek nabłonka. Kolejnym etapem w rozwoju zakażenia GDO jest internalizacja bakterii do komórek nabłonka wyściełającego górne drogi oddechowe, a następnie ich translokacja do tkanki podnabłonkowej. W tkance podnabłonkowej żywe i dzielące się bakterie są wykrywane także w komórkach żernych układu immunologicznego gospodarza.

Adhezja bakterii do komórek eukariotycznych jest już stosunkowo dobrze poznany proces. Aktualnie prowadzone badania tego zjawiska wskazują, że oprócz swoistych receptorów dla poszczególnych adhezyn patogenów GDO mogą istnieć też charakterystyczne molekularne struktury w błonach cytoplazmatycznych komórek ssaków, które uczestniczą w adhezji oportunistycznych bakterii niezależnie od ich gatunku. Jednymi z takich struktur są powierzchniowe glikoproteiny tetraspaniny, które zbudowane są z czterech domen zakotwiczonych w błonie cytoplazmatycznej i z dwóch domen (dużej i małej) eksponowanych na powierzchni komórki. Tworzą one homo- i heterodimery, a także wiążą się z wybranymi cząsteczkami adhezyjnymi, takimi jak integryny i białka z nadrodziny immunoglobulin. W postaci wysokocząsteczkowych kompleksów tworzą w błonie cytoplazmatycznej mikrodomeny, do których przyłączają się komórki *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica*, *S. pneumoniae* i *S. aureus*. Wiązanie to można zahamować z wykorzystaniem swoistych przeciwciał przeciwko białkom z rodziny tetraspanin, a także za pomocą rekombinowanej domeny zewnątrzkomórkowej tych białek [30].

3.1. Adhezyny bakterii Gram-ujemnych

Gram-ujemne bakterie izolowane od chorych z zapaleniami GDO, takie jak *H. influenzae* i *M. catarrhalis* posiadają szereg adhezyn właściwych dla gatunku. Mogą one też przylegać do tych samych makrocząsteczek eksponowanych na powierzchni komórek ssaków jako docelowych miejsc ich adhezji.

U *H. influenzae* poznano już wiele adhezyn, takich jak fimbrie (kodowane w locus *hif*), lipooligosacharydy, wysokocząsteczkowe adhezyny kodowane przez geny *hmw1* i *hmw2*, białka błony zewnętrznej (Hap, P2, P5 i P6) i lipoproteina PCP [22]. Podobnie jak u większości drobnoustrojów przylegających do nabłonka GDO bakteryjne struktury powierzchniowe szczepów *H. influenzae* podlegają zmienności fazowej. Oznacza to, że w jednorodnej hodowli pałeczek z rodzaju *Haemophilus* mogą współwystępować komórki o różnym fenotypie, np. te, które niosą na swojej powierzchni cząsteczki fosfatydylocholino (PCho), przyłączone do cząsteczek lipooligosacharydów (PCho⁺), jak i te, które nie posiadają PCho (PCho⁻). Fenotyp PCho⁺ jest niezwykle istotny podczas tworzenia i formowania dojrzałej struktury biofilmu tego drobnoustroju – tylko komórki o tym fenotypie zdolne są do wytworzenia prawidłowej trójwymiarowej struktury biofilmu *in vivo* na modelu zakażenia ucha środkowego u szynszyli [37]. Fenotyp PCho⁺ u szczepów NTHi odpowiada też za proces wydajnej adhezji do komórek ssaków, takich jak komórki nabłonka lub śródbłonka [25]. Jednakże cząsteczki fosfatydylocholino związane z LOS nie odgrywają istotnej roli w przyleganiu komórek NTHi do komórek makrofagów płucnych, co zaobserwowano porównując wielkość adhezji komórek typu dzikiego o fenotypie PCho⁺ i komórek mutanta, pozbawionego reszt fosfatydylocholino w błonie zewnętrznej [53].

Fimbrie NTHi uczestniczą w przyleganiu komórek bakteryjnych do reszt sialowych glikosfingolipidów (laktozyloceramidów), cząsteczek wchodzących w skład błony cytoplazmatycznej komórek nabłonka GDO. Geny kodujące te fimbrie (stanowiące elementy składowe operonu *hif*) występują istotnie częściej w genomach szczepów NTHi uzyskanych z gardła niż izolatów od chorych z zapaleniem ucha środkowego [13].

U pałeczek *M. catarrhalis* wyróżniono też szereg specyficznych adhezyn, a wśród nich białka błony zewnętrznej, takie jak UspAs, MID/Hag, McaP, Omp CD i białka Mha oraz fimbrie typu IV i cząsteczki lipooligosacharydów [19]. Pałeczki te są zdolne też do przylegania do urzęsionych komórek nabłonka za pośrednictwem adhezyny Mid/Hag o masie cząst. 200 kDa, zbudowanej z 10 odcinków łańcucha polipeptydowego o strukturze beta, zakotwiczonego w błonie komórkowej oraz globularnej, N-końcowej domeny, która bezpośrednio uczestniczy w procesie adhezji oraz wiąże cząsteczki immunoglobuliny D (IgD) [9]. Adhezyny UspAs (ubiquitous

surface protein A proteins) są białkami, które ze względu na znaczną masę cząsteczkową (250–300 kDa) można oglądać za pomocą mikroskopu elektronowego jako rozproszoną warstwę o grubości 60 nm na powierzchni komórek drobnoustroju. Geny kodujące te adhezyny podlegają zjawisku zmienności fazowej, co wyraża się jednoczesnym występowaniem wielu fenotypów pałeczek *Moraxella* [11]. Adhezyny UspA oddziałują swoiście z fibronektyną, lamininą, witronektyną oraz cząsteczkami adhezyjnymi z nadrodziny immunoglobulin CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1), znajdującymi się na powierzchni komórek nabłonka, śródbłonka i limfocytów.

Zajmujące tą samą niszę ekologiczną na nabłonkach GDO pałeczki *H. influenzae*, a także *Neisseria gonorrhoeae* i *N. meningitidis*, przylegają za pośrednictwem swoistych adhezyn, odpowiednio białek P5 i Opa, do CEACAM1, tego samego rodzaju cząsteczek adhezyjnych, do których przylegają dwiokni *M. catarrhalis*. Specyficzność wiązania adhezyn wymienionych powyżej gatunków z ludzkimi cząsteczkami CEACAM1 jest wysoka; nie zaobserwowano oddziaływań tych białek z cząsteczkami CEACAM1 pozyskanymi z innych gatunków ssaków [91]. Warstwa komórek nabłonkowych, do których przylegają *H. influenzae*, *M. catarrhalis* lub *N. gonorrhoeae* za pośrednictwem cząsteczek adhezyjnych CEACAM1 nie ulega złuszczeniu nawet po wnikięciu patogenów do cytozolu. Zjawisko złuszczenia nabłonka zostaje zahamowane w ciągu trzech do ośmiu godzin od zakażenia w wyniku zwiększonej ekspresji białka CD105, receptora TGF- β 1 na powierzchni komórek nabłonka. Za pośrednictwem białka CD105 zwiększa się siła wiązania komórek nabłonka do macierzy pozakomórkowej tkanek [56]. Białko błony zewnętrznej P5 pałeczek *H. influenzae* jest istotnym czynnikiem zjadliwości tego patogenu. Tylko pałeczki posiadające to białko, poprzez swoiste wiązanie z cząsteczkami adhezyjnymi CEACAM1, CEACAM5 i CEACAM6, mogą wywołać zakażenie ucha środkowego u szynszyli po donosowym zakażeniu zwierząt. Sprzyja temu zdolność pałeczek przylegających do receptorów CEACAM do internalizacji w komórkach nabłonka i następnie przeniknięcia do tkanki podnabłonkowej [12].

3.2. Adhezyny ziarenkowców Gram-dodatnich

Liczne adhezyny występujące na powierzchniach komórek Gram-dodatnich zaliczane są głównie do grupy białek określanых akronimem MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules), czyli są białkami swoiście rozpoznającymi glikoproteiny macierzy pozakomórkowej tkanek. Wiele glikoprotein macierzy pozakomórkowej tkanek (extracellular matrix, ECM) występuje zarówno w postaci rozpuszczalnych białek globularnych w suro-

wicy i innych płynach ciała, a także w postaci nierozpuszczalnej, jako elementy budulcowe tkanek. Spośród tych białek fibronektyna, laminina i witronektyna często pełnią rolę cząsteczek pomostowych podczas wiązania się ziarenkowców z receptorami na powierzchni komórek gospodarza.

S. pyogenes wytwarza 11 białek wiążących fibronektynę (m.in. białko M, Sfb1, SfnII, Lbp, F2 i Shr), cztery białka wiążące plazminogen (białko M, enolazę, Pam, Plr), trzy – lamininę lub fibrynogen (m.in. białka Lbp, Lsp, SpeB i Fbp54) oraz jedno białko wiążące kolagen (Cpa). Większość tych adhezyn uczestniczy w przyleganiu paciorkowców do komórek gospodarza [59]. GABHS posiadają też dwie adhezyny białkowe, które umożliwiają wystąpienie zjawiska mimikry molekularnej. Białka te, oznaczone jako Scl1 i Scl2 w regionie centralnym swoich cząsteczek mają sekwencję aminokwasową Gly-Xaa-Yaa, która przyjmuje konformację ściśle upakowanej potrójnej helisy, analogiczną do struktury cząsteczek kolagenu u ssaków. Adhezyny te bezpośrednio wiążą się z nierozpuszczalnymi, występującymi na powierzchni błony komórek gospodarza fibronektyną i lamininą, a przez to umożliwiają internalizację paciorkowców z grupy A do komórek nabłonka [14].

Adhezyny *S. pneumoniae*, zaliczane do białek MSCRAMM są stosunkowo mniej poznane niż u *S. pyogenes*. Wśród nich wyróżniono białko PavA wiążące fibronektynę i białko PfbA, o masie cząsteczkowej 120 kDa, oddziałujące swoiście z fibrynogenem i plazminogenem, które uczestniczą w przyleganiu pneumokoków do komórek nabłonka [61]. Innymi adhezynami tego drobnoustroju są białka PspC i PsaA. Adhezyna PspC wiąże się z receptorem immunoglobulinowym – pIgR (human polymeric immunoglobulin receptor), którego ektodomena eksponowana jest na powierzchni ludzkich komórek nabłonka wyściełającego drogi oddechowe i w zależności od dostępności wewnątrzkomórkowej puli jonów wapnia może uczestniczyć w internalizacji pneumokoków do komórek gospodarza [8]. Białko PsaA, będące podjednostką transportera typu ABC wiążącego jony manganu, łączy się z E-kadheryną na powierzchni komórek nabłonka [6].

GABHS i pneumokoki przylegają też do komórek nabłonka jamy nosowo-gardłowej i komórek śródbrzońki za pomocą fimbrii, długich, cienkich i eksponowanych do środowiska zewnętrznego białkowych struktur, zbudowanych z pilin, odpowiednio u *S. pyogenes* – RrgB, natomiast u *S. pneumoniae* – Spy. W odróżnieniu od fimbrii bakterii Gram-ujemnych, fimbrie bakterii Gram-dodatnich zbudowane są z podjednostek białka piliny połączonych wiązaniem kowalencyjnym [67]. Fimbrie *S. pneumoniae* są zbudowane ze 100–200 tandemowo połączonych cząsteczek białka RrgB [63]. W procesie tworzenia ostatecznej struktury fimbrii biorą udział sortazy, enzymy o aktywności transpeptydaz cysteinowych. Enzymy te zakotwiczą fimbrie w ścianie komórkowej

bakterii poprzez trawienie wiązania pomiędzy resztami aminokwasowymi treoniny i glicyny w obrębie sekwencji LPXTG i utworzenie wiązania amidowego pomiędzy grupą karboksylową reszty treoniny a grupą aminową w cząsteczce peptydoglikanu ściany komórkowej. Katalizują one także składanie podjednostek fimbrii – cząsteczek piliny w ostateczną strukturę fimbrii [43]. Wykazano, że fimbrie uczestniczą w przyleganiu *S. pyogenes* do nabłonka pokrywającego migdałki gardłowe i wiążą komórki *S. pneumoniae* z nabłonkiem oddechowym i komórkami śródbrzońki [42]. Istotny udział fimbrii w przyleganiu do tkanek gospodarza stwierdzono też u enterokoków [83].

Spośród licznych adhezyn *S. aureus* z grupy MSCRAMM następujące białka biorą udział w procesie przylegania bakterii do powierzchni komórek gospodarza: dwa białka wiążące fibronektynę FnBPA i FnBPB i dwa białka wiążące fibrynogen ClfA i ClfB [33]. Gronkowiec złocisty przylega też do komórek nabłonka jamy nosowej za pośrednictwem białek z rodziny Sdr, takich jak SdrC i SdrD oraz białka Pls, wiążących lipidy i glikolipidy błony komórkowej. W wiązaniu gronkowców do nabłonka nozdrzy przednich biorą jednocześnie udział, poza adhezynami z rodziny Sdr, adhezyna ClfB oraz białko IsdA, którego transkrypcja podlega regulacji przez operon Fur i jest zależna od dostępności jonów żelaza w środowisku wzrostu. Mutanty pozbawione genów kodujących wymienione powyżej cztery adhezyny nie przylegały do komórek nabłonka GDO [16]. Adhezja *S. aureus* do komórek nabłonka w nozdrzach przednich uważana jest za jeden z czynników sprzyjających wystąpieniu zakażenia tym drobnoustrojem.

U gronkowca złocistego wyróżniono też inną grupę białek uczestniczących w adhezji do glikoprotein macierzy pozakomórkowej tkanek i/lub do komórek gospodarza. Grupę tych białek oznaczono akronimem SERAM (Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules). Ich cechą charakterystyczną jest to, że oprócz udziału w procesach adhezji aktywnie interferują one w szlaki sygnałowe prowadzące do aktywacji przeciwbakteryjnej obrony gospodarza [15]. Spośród tych adhezyn w przyleganiu *S. aureus* do komórek gospodarza uczestniczy białko Eap (extracellular adherence protein) o masie cząsteczkowej 60–70 kDa. Wiąże ono fibronektynę, fibrynogen, witronektynę, które mogą pełnić rolę cząsteczek pomostowych w wiązaniu bakterii do integrzyn w błonie cytoplazmatycznej komórek gospodarza oraz współdziałać z adhezynami FnBPA i FnBPB w internalizacji do komórek nabłonka i śródbrzońki [27].

3.3. Wpływ niskiej temperatury na ekspresję genów kodujących adhezyny u patogenów GDO

W krajach o klimacie umiarkowanym szczyt zachorowań na zapalenia górnych dróg oddechowych przypada na miesiące jesienno-zimowe. W takich warunkach,

podczas długotrwałego przebywania w ujemnej temperaturze powietrza dochodzi do wychłodzenia nabłonka pokrywającego GDO i, w konsekwencji, do narażenia drobnoustrojów zasiedlających te nabłonki na stres temperaturowy. W doświadczeniach wykonanych w warunkach laboratoryjnych zaobserwowano wzmożoną syntezę białek adhezyn UpsA (UpsA1 i UpsA2) dwoiniek *M. catarrhalis* po ich inkubacji w temperaturze 26°C w ciągu 2 godzin, a następnie ich zwiększoną adhezję do fibronektyny. Wykazano też, że obniżenie temperatury prowadzi do zwiększonej ekspresji genów *tbpA* i *tbpB* oraz *lbpA* i *lbpB*, których produkty biorą udział w pozyskaniu jonów żelaza z transferryny i laktoferyny, zwiększając przez to szybkość namnażania bakterii tego gatunku [80].

Podobne zjawisko zaobserwowano po poddaniu szczepu UAMS1 *S. aureus* inkubacji w temperaturze 10°C w ciągu 30 min. [5]. Wielkość ekspresji genów kodujących białka badanego szczepu gronkowca oceniano za pomocą mikromacierzy „Affymetrix *S. aureus* Gene-Chips” i weryfikowano z użyciem techniki RT-PCR. Stwierdzono, że 46 genów uległo wzmożonej transkrypcji, wśród nich gen kodujący białko szoku zimna Csp (cold shock proteins) (ponad 1000-krotny wzrost stężenia transkryptu) a także trzy geny: *seo*, *lip* i *srtA*, kodujące czynniki zjadliwości tego drobnoustroju, odpowiednio enterotoksynę, lipazę i sortazę [5].

Zmianę ekspresji genów pod wpływem inkubacji w temperaturze 23°C wykazano z użyciem mikromacierzy także dla szczepu *Escherichia coli* K-12. Ponad 7% całego genomu (około 297 genów) uległo wzmożonej transkrypcji w porównaniu z poziomem transkrypcji genów tego drobnoustroju w hodowli prowadzonej w temperaturze 37°C. Wśród tych białek dominowały białka związane z ogólną odpowiedzią stresową, regulowaną przez RpoS, białka szoku zimna a także białka biorące udział w tworzeniu biofilmu [93].

Powyższe obserwacje mogą sugerować istotny wpływ przejściowego obniżenia temperatury na wielkość ekspresji genów kodujących czynniki zjadliwości względnie chorobotwórczych bakterii człowieka i wskazywać, że bodźce płynące ze środowiska mogą stanowić jeden z czynników sprzyjających rozwojowi zakażenia [1].

4. Mechanizmy internalizacji patogenów GDO do komórek gospodarza

Większość z wymienionych powyżej adhezyn patogenów GDO bierze udział w procesie internalizacji bakterii do komórek ssaków. W inwazji szczepów NTHi do komórek nabłonka biorą udział lipooligosacharydy eksponowane na powierzchni ściany komórkowej bakterii. Oddziałują one z receptorem dla czynnika aktywującego płytki krwi (platelet-activating factor, PAF)

[84]. W eksperymentach z użyciem cytochalazyny B wykazano, że dwa inne zjawiska są równie istotne dla efektywnej fagocytozy komórek szczepów NTHi przez makrofagi: aktywny udział białek cytoszkieletu oraz obecność cząsteczek cholesterolu w błonie cytoplazmatycznej makrofagów w obrębie tzw. raftów lipidowych, bogatych w cholesterol i sfingolipidy [53]. Wnikanie NTHi do komórek gospodarza jest procesem, w którym główną rolę odgrywa szlak sygnałowy 3-kinazy fosfatydilinozytolu, którego cząsteczką efektorową jest kinaza Akt. Proces ten rozpoczyna się od utworzenia mikrokolonii na powierzchni komórek nabłonka przez pałeczki *Haemophilus* [54]. Mechanizm internalizacji NTHi różni się zatem od sposobu wnikania Gram-ujemnych pałeczek, posiadających system sekrecji białek typu III, np. *P. aeruginosa* [82]. Analogiczne doświadczenia z użyciem cytochalazyny B wykazały podobny mechanizm fagocytozy komórek *S. pyogenes* przez makrofagi – udział białek cytoszkieletu w reorganizacji błony cytoplazmatycznej, prowadzącej do powstania długich wypustek otaczających grona paciorkowców przed ich wchłonięciem. Podobny mechanizm fagocytozy, tzw. „looping phagocytosis” opisano też dla *Francisella tularensis*, pałeczki nosacizny [35].

Komórki nabłonka i śródbłonka także ulegają zakażeniu przez *S. pyogenes*. Internalizacja paciorkowców jest procesem wymagającym reorganizacji włókien aktywnych w cytoszkielecie komórek nabłonka. W procesie tym istotne są bezpośrednie lub pośrednie, przy udziale cząsteczek ECM (najczęściej fibronektyny wiążącej się z białkiem FbaB), oddziaływania GABHS z cząsteczkami integryn, a następnie udział białek z rodziny Rho w transdukcji sygnału [4]. Wiązanie paciorkowców z cząsteczkami integryn $\alpha 5 \beta 1$ za pośrednictwem fibronektyny, pełniącej rolę cząsteczki pomostowej, prowadzi do grupowania (klasteryzacji) integryn w błonie cytoplazmatycznej komórek gospodarza w obrębie raftów lipidowych, bogatych w cząsteczki cholesterolu. Internalizacja komórek GABHS może też zachodzić przy udziale klatryny w procesie endocytozy klatrynozależnej za pośrednictwem mechanizmu „zamka błyskawicznego”. Komórki bakterii zostają otoczone wypustkami błony komórkowej i wchłonięte do cytoplazmy. Streptolizyna O, cytolizyna zależna od cząsteczek cholesterolu, uwalniana jest przez wewnątrzkomórkowe GABHS i tworzy pory w błonach wakuol, uwalniając zamknięte w nich po procesie internalizacji bakterie. Streptolizyna O wytwarzana pozakomórkowo może zapobiegać endocytozie komórek *S. pyogenes* przez komórki nabłonka jamy nosowo-gardłowej [52]. W procesie klatrynozależnej endocytozy wchłaniane są także komórki gronkowca złocistego, na drodze analogicznego jak wyżej mechanizmu „zamka błyskawicznego” przez komórki nieprofesjonalnych komórek fagocytycznych [90]. Podobnie dwoinki *M. catarrhalis* wnikają

do komórek nabłonka z udziałem cząsteczek klatryny i mechanizmu „zamka błyskawicznego” po związaniu się z błoną cytoplazmatyczną poprzez specyficzne oddziaływanie adhezyny UspA1 i cząsteczek fibronektyny, jako cząsteczek pomostowych w procesie adhezji do cząsteczek integryn $\alpha 5\beta 1$ [79].

S. pneumoniae penetrują keratynocyty oraz komórki nabłonka i śródbłonka za pośrednictwem pomostowego wiązania z inną glikoproteiną ECM – witronektyną. Pneumokoki oddziałują z domeną wiążącą heparynę w cząsteczce witronektyny i za pośrednictwem tej glikoproteiny przyłączają się do cząsteczek integryn $\alpha v\beta 3$. Pobudzone są wówczas szlaki sygnałowe, w których biorą udział kinazy serynowo-treoninowe: JLK (integrin-like kinase), PI3K (kinaza fosfatydoinozytolu) i kinaza białkowa Akt. Wskutek dynamicznych zmian cytoszkieletu komórek gospodarza dochodzi do internalizacji pneumokoków [10]. Podobny mechanizm internalizacji, z witronektyną jako cząsteczką pomostową, występuje u *S. pyogenes*, a także u bakterii Gram-ujemnych kolonizujących błony śluzowe GDO, takich jak *M. catarrhalis*, *H. influenzae* i *N. gonorrhoeae* [10].

W zakażeniu komórek nabłonka przez *S. pneumoniae* bierze udział adhezyna PscC [8]. Białko PspC wiążące cholinę, przez wielu badaczy uważane za najważniejszą adhezynę tego gatunku bakterii, oddziałuje specyficznie z ludzkim receptorem immunoglobulinowym pIgR. Receptor ten w warunkach fizjologicznych uczestniczy w transporcie cząsteczek immunoglobulin IgA i IgM od powierzchni podstawno-bocznych (bazolateralnych) do powierzchni szczytowych (apikalnych) komórek nabłonka, po czym cząsteczki wydzielniczego IgA (sIgA) oraz fragmentu wydzielniczego (SC) są wydzielane na powierzchnię błon śluzowych. Wówczas cząsteczki receptora immunoglobulinowego powracają w kierunku powierzchni podstawno-bocznych. Zjawisko ma miejsce także po związaniu pneumokoków z receptorem immunoglobulinowym pIgR i prowadzi do efektywnej późniejszej transcytozy bakterii przez warstwę komórek nabłonka do tkanki podnabłonkowej. W zjawisku tym uczestniczą kinazy tyrozynowe z rodziny Src oraz inne kinazy z rodziny MAPK: ERK i kinaza c-Jun NH₂-końca [7].

Inwazja zarówno nieprofesjonalnych komórek fagocytujących, jak i profesjonalnych fagocytów przez *S. aureus* zachodzi za pośrednictwem cząsteczek fibronektyny jako cząsteczek pomostowych. Dwie adhezyny gronkowca wiążące fibronektynę FnBPA i FnBPB posiadają odpowiednio 11 i 10 miejsc wiążących fibronektynę, z których sześć w każdej z adhezyn oddziałuje z tym białkiem z wysokim powinowactwem. Prawdopodobnie wiązanie kilku cząsteczek fibronektyny z jedną cząsteczką adhezyny na powierzchni komórek gronkowca umożliwia jednoczesną interakcję z wieloma cząsteczkami integryn typu $\alpha 5\beta 1$ i ich klasteryzację w błonie

cytoplazmatycznej komórek gospodarza [21]. Obie adhezyny uzupełniają się wzajemnie w procesie przylegania *S. aureus* do komórek gospodarza, chociaż białko FnBPA pełni dominującą rolę w tym procesie. Ponad 70% klinicznych izolatów gronkowca posiada geny kodujące oba białka [75]. Mechanizm wnikania *S. aureus* do komórek gospodarza przypomina omawiany już powyżej mechanizm „zamka błyskawicznego”, który prowadzi do aktywacji szlaków sygnałowych kinaz tyrozynowych z rodziny src. Co ciekawe adhezyna Pls, występująca na powierzchni szczepów MRSA (kodowana przez gen zlokalizowany w gronkowcowej kasecie chromosomalnej mec1, SCCmec1) może hamować inwazję bakterii do komórek gospodarza, prawdopodobnie stanowiąc przeszkodę steryczną dla zjawiska adhezji [77].

Gronkowiec złocisty przenika przez warstwę komórek nabłonka do tkanek podnabłonkowych na drodze parazytozy. Powierzchniowe białko A tego drobnoustroju poprzez wiązanie z receptorem dla TNF- α i aktywację receptora dla EGF pobudza szlaki sygnałowe białek z rodziny Rho, co prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu. Jednocześnie aktywowana zostaje wewnątrzkomórkowa, wapniozależna proteaza cysteinowa z rodziny kalpain, co prowadzi do proteolizy białek okładyny i E-kadheryny, występujących w ścisłych połączeniach międzykomórkowych komórek nabłonka, umożliwiając parazytozę bakterii [78]. W tkance podnabłonkowej prawdopodobnie dochodzi do inwazji komórek profesjonalnych leukocytów przez patogeny GDO.

5. Sposoby przetrwania patogenów GDO wewnątrz komórek ssaków

W komórkach linii monocytarno-makrofagalnej, jak i w nieprofesjonalnych komórkach fagocytujących zachodzi wiele procesów ukierunkowanych na eliminację patogenów, takich jak wytwarzanie wolnych rodników, synteza lizosomalnych enzymów hydrolitycznych oraz przejściowe zakwaszanie zawartości fagosomów. Obecnie szeroko akceptowany jest pogląd, że przeżycie wewnątrzkomórkowych patogenów jest związane z realizacją jednej z bakteryjnych strategii, takich jak modulacja procesu powstawania fagolizosomu, adaptacja do kwaśnego środowiska fagolizosomu lub ucieczka z fagolizosomu do cytoplazmy. Równie istotna zdaje się być zdolność patogenów do zahamowania procesów apoptozy lub nekrozy komórek gospodarza i możliwość namnażania w cytoplazmie [72]. Dotychczas najwięcej naukowych danych zebrano na temat strategii przetrwania wewnątrzkomórkowych populacji gronkowca złocistego.

Gronkowiec złocisty może przeżyć w kwaśnym środowisku wakuoli fagocytarnych komórek nabłonka lub śródbłonka przez kilka dni (*in vitro* nawet do dwóch

tygodni), a komórki niektórych szczepów tego gatunku są zdolne do ucieczki z fagolizosomu [45]. Początkowo rozważano udział α -toksyny (hemolizyny α) w tym procesie. Jednakże badania z wykorzystaniem mutantu *Staphylococcus carnosus*, do którego genomu wprowadzono gen *hla* kodujący α -toksynę i który następnie uległ efektywnej ekspresji w fagolizosomach dowiodły, że wytwarzanie i aktywność tej toksyny nie są wystarczające dla efektywnej ucieczki bakterii do cytoplazmy [28]. Kolejne badania pokazały, że u komórek szczepów gronkowca zdolnych do ucieczki z fagolizosomu jest aktywny system quorum sensing *agr* (accessory gene regulator). Gen kodujący jedną z cytolizyn tego drobnoustroju – δ -toksyny transkrybowany jest wraz z genem kodującym efektorową cząsteczkę RNAIII systemu quorum sensing u gronkowców. Toksyna δ wraz z β -toksyną (o aktywności sfingomielinazy C) biorą udział w uszkodzeniach błony fagolizosomu, umożliwiając efektywną ucieczkę bakterii do cytoplazmy [29]. Natomiast w ludzkich makrofagach krwi obwodowej żywe komórki *S. aureus* szczepu Newman bytowały w fagosomach w ciągu 3–4 dni, zanim dochodziło do ich ucieczki do cytoplazmy i późniejszej lizy komórek gospodarza. Izogenne mutanty tego szczepu z mutacją w genach kodujących α -toksynę, metaloproteazę aureolizynę, białko A i enzym sortazę A były w tym czasie efektywnie zabijane przez makrofagi [44].

Długotrwałej obecności gronkowców w cytoplazmie komórek gospodarza może też sprzyjać ich lekooporność, aczkolwiek mechanizm tego zjawiska nie został jeszcze wyjaśniony. Szczep MRSA oporny na teikoplaninę wnikał do komórek nabłonka z czterokrotnie większą wydajnością w porównaniu do szczepu izogenicznego mutantu wrażliwego na teikoplaninę. Szczep oporny na teikoplaninę był też zdolny w warunkach *in vitro* do namnażania się wewnątrzkomórkowo; w ciągu 24 godzin koinkubacji z komórkami nabłonka liczba hodowalnych komórek opornego szczepu *S. aureus* była 11-krotnie wyższa niż szczepu izogenicznego wrażliwego mutantu [68].

Wewnątrzkomórkowe środowisko wzrostu sprzyja też indukcji odmiennego fenotypu komórek gronkowca, tzw. wariantów małych kolonii (small colony variants, SCV). Komórki bakteryjne o tym fenotypie charakteryzują się brakiem aktywności systemu quorum sensing *agr*, mają określone wymagania odżywcze (rosną w obecności menadionu, heminy lub tymidyny), na stałych podłożach tworzą kolonie dziesięciokrotnie mniejsze od kolonii typu dzikiego. Komórki te są także dobrze przystosowane do przetrwania wewnątrz komórek gospodarza; wytwarzają charakterystyczny dla populacji biofilmu polisacharydowy antygen PIA (polysaccharide intercellular antigen), produkt ekspresji operonu *icaADBC*, a także są zdolne do przeżycia w fagolizosomach. Przejawiają też wzmoczoną ekspresję genów

kodujących wiążące białka ECM adhezyny Clf1, FnBPA i FnBPB, co pozwala na wnikanie ich z wysoką wydajnością do komórek nabłonka i śródbłonka [72]. Badania z wykorzystaniem mikromacierzy Gene Chip Human Genome U133 Plus 2,0 (firmy Affymetrix) pokazały, że inwazja komórek śródbłonka przez *S. aureus* o fenotypie dzikim prowadziła do rozwoju odpowiedzi zapalnej i redukcji liczby wewnątrzkomórkowych bakterii. Natomiast w tych samych warunkach bakterie o fenotypie SCV bytujące w ciągu kilku dni w znacznej liczbie w cytoplazmie komórek śródbłonka nie prowokowały odpowiedzi zapalnej [87].

Bezpośrednio (w ciągu pierwszych sześciu godzin) po zakażeniu komórek nabłonka linii A549 (ATCC CCL-185) przez niewykazujący aktywności cytotoksycznej szczep *S. aureus* 6850, w komórkach bakteryjnych zachodzą znaczne zmiany w poziomie ekspresji szeregu genów; obniżona zostaje ekspresja genów kodujących białka uczestniczące w procesach metabolicznych, natomiast zachodzi wzmoczona synteza białek warunkujących chorobotwórczość, w tym enzymów odpowiedzialnych za neutralizację wolnych rodników oraz pozyskiwanie jonów żelaza. Dopiero po sześciu godzinach od zakażenia ponownie rozpoczyna się transkrypcja genów, których produkty uczestniczą w metabolizmie. W tym czasie dochodzi też do rozpoczęcia procesu replikacji wewnątrzkomórkowych bakterii [26]. Narastająca liczba naukowych dowodów wskazujących na możliwość przeżycia komórek *S. aureus* w ludzkich makrofagach krwi obwodowej może wskazywać na efektywność takiej strategii w wydajnym rozprzestrzenianiu się patogenu do odległych wtórnych miejsc zakażenia [86].

Dostępne w piśmiennictwie dane wskazują na, podobną jak u gronkowca złocistego, zdolność innych istotnych patogenów GDO do bytowania wewnątrz komórek gospodarza. Komórki GABHS w makrofagach aktywnie wpływają na zaburzenie poprawnego przebiegu procesu fuzji fagosomu z lisosomami. Wewnątrzkomórkowe przeżycie tego gatunku bakterii uzależnione jest od obecności białka M1 na powierzchni komórek. Białko to wpływa na zahamowanie sygnałów prozapalnych, które stymulują makrofagi do zwalczania patogenów wewnątrzkomórkowych (obserwowane jest istotne pięciokrotne obniżenie poziomu ekspresji TNF- α po zakażeniu makrofagów) [35].

Internalizacja komórek *S. pyogenes* w komórkach nabłonka może prowadzić do ich śmierci na drodze apoptozy w wyniku wytwarzania reaktywnych form tlenu i zaburzenia prawidłowej funkcji mitochondriów [3]. Komórki GABHS, które wniknęły do makrofagów są zdolne do namnażania się, ucieczki z fagolizosomu do cytoplazmy w ciągu sześciu godzin od zakażenia i ponownego zakażenia innych, zdrowych dotychczas komórek makrofagów. Wnikanie *S. pyogenes* do makrofagów obserwowane jest w ostrych zakażeniach tkanek

miękkich. Ten sposób bytowania komórek GABHS może przyczyniać się do ich rozsiewu i postępu w uszkodzeniach tkanek chorego [35]. Ponad połowa szczepów GABHS (n = 150), pozyskanych od chorych z paciorkowcowym przewlekłym zapaleniem błony śluzowej gardła nie była w eksperymentach *in vitro* efektywnie zabijana za pomocą penicyliny po wnikięciu do komórek nabłonka, nawet wówczas gdy stężenie penicyliny było dziesięciokrotnie wyższe niż minimalne stężenie hamujące (MIC) dla siostrzanych komórek w hodowli płynnej [60].

W wyniku fagocytozy komórek klinicznego izolatu NTHi przez mysie komórki makrofagalne linii J774.A w komórkach bakteryjnych dochodzi do wzmożonej ekspresji genu *rpoE*, który koduje podjednostkę sigma^E polimerazy RNA, uczestniczącą w odpowiedzi stresowej również u innych patogenów, takich jak *Mycobacterium tuberculosis* i *Salmonella enterica* serowar Typhimurium. Patogeny te również przejawiają zdolność przetrwania w komórkach makrofagalnych. Szczepy NTHi bytują też w komórkach nabłonka nie namnażając się, ale zachowując aktywność metaboliczną i są zdolne do przetrwania wewnątrz komórek nabłonka w ciągu co najmniej 28 godzin od zakażenia [54]. Wydaje się, że szczepy NTHi kolonizują GDO w sposób niezauważalny dla systemu obrony immunologicznej gospodarza.

Na obecność wewnątrzkomórkowych patogenów, jako potencjalnego rezerwuaru chorobotwórczych bakterii wskazują też badania wycinków migdałków pozyskanych od chorych z zapaleniem migdałków podniebiennych lub zapaleniem ucha środkowego. W posiewach lizatów komórek tkanki migdałków podniebiennych (po eradykacji zewnątrzkomórkowych bakterii za pomocą antybiotyków) obserwowano liczne kolonie *S. aureus* [96]. Obserwacje za pomocą mikroskopu konfokalnego i techniki FISH pokazały, że w komórkach tkanki migdałka gardłowego można wyróżnić gęsto upakowane wewnątrzkomórkowe populacje bakterii, aktywnie metabolizujących. W skład tych populacji wchodziły m.in. *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* i *S. aureus*, które były otoczone substancją polisacharydową, przypominającą macierz pozakomórkową biofilmów zewnątrzkomórkowych [57]. Stąd po zabiegu adenoidektomii stan kliniczny chorych z przewlekłymi lub nawracającymi zakażeniami ucha środkowego może ulec wyraźnej poprawie ze względu na usunięcie źródła zakażenia [62].

6. Wrażliwość wewnątrzkomórkowych patogenów na antybiotyki i chemioterapeutyki

Narastająca lekooporność klinicznych izolatów bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich [94] wraz ze stosunkowo dobrze udokumentowaną zdolnością

patogenów GDO do wzrostu wewnątrz komórek ssaków i w postaci biofilmu nasuwają pytanie o skuteczność leczenia tych zakażeń za pomocą antybiotyków i chemioterapeutyków. Pomijając w tych rozważaniach dobrze znane zjawisko zwiększonej tolerancji biofilmu na środki bójcze, należy uwzględnić fakt, że antybiotyki i chemioterapeutyki w różnym stopniu przenikają do wnętrza komórek eukariotycznych. Przeciwbakteryjna aktywność leków w komórkach gospodarza może zależeć także od ich rozmieszczenia w wewnątrzkomórkowych kompartmentach (przedziałach), biodostępności leku, sposobu dawkowania, wielkości dawek i czasu leczenia. Fluorochinolony, makrolidy i streptograminy uznane są za środki przeciwbakteryjne efektywnie wnikające i wydajnie akumulujące się w cytozolu, zatem aktywne wobec wewnątrzkomórkowych bakterii. W badaniach *in vivo* na mysim modelu zapalenia otrzewnej stwierdzono jednak niską korelację pomiędzy akumulacją antybiotyków w cytozolu a ich aktywnością bójczą wobec wewnątrzkomórkowych szczepów *S. aureus* [70]. Do dzisiaj wiedza dotycząca efektywności leków przeciwbakteryjnych wobec patogenów GDO bytujących wewnątrz komórek gospodarza jest jeszcze uboga. Natomiast większość z opublikowanych dotychczas wyników badań wskazuje na brak aktywności najczęściej stosowanych w leczeniu zakażeń GDO antybiotyków β-laktamowych w zwalczaniu patogenów wewnątrz komórek nabłonka, śródbłonka i komórek żernych.

Badania wykonane *in vitro* pokazały, że spośród pięciu badanych środków przeciwbakteryjnych: ampicyliny, ciprofloksacyny, klarytromycyny, telitromycyny i chinupristiny/dalfopristiny ten ostatni antybiotyk w najniższych stężeniach (8 µg/ml) umożliwił zabicie ponad 99% komórek klinicznego izolatu NTHi wewnątrz ludzkich komórek linii nabłonka linii A-549 (ATCC CCL 185). Najniższą aktywność wobec wewnątrzkomórkowych bakterii tego gatunku zaobserwowano dla ampicyliny; zastosowanie tego antybiotyku w stężeniu przekraczającym 64 µg/ml pozwoliło na eliminację 99% komórek badanego izolatu NTHi [2]. Analizie poddano też bójczą aktywność ampicyliny, cefkapenu, lewofloksacyny, klarytromycyny i azytromycyny w stężeniach 1 mg/l wobec wewnątrzkomórkowych szczepów NTHi o fenotypie BLNAR. Szczepy o tym fenotypie są klinicznie odporne na ampicylinę, amoksycylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym, ampicylinę z sulbaktamem, cefaklor, cefprozil, cefuroksym, cefetamet i piperacylinę z tazobaktamem [95]. Najwyższą aktywność wobec wewnątrzkomórkowych szczepów NTHi o fenotypie BLNAR zaobserwowano dla lewofloksacyny w stężeniu osmiokrotnie wyższym od wartości MIC dla tego chemioterapeutyku – obserwowano wówczas zabicie 99% bakterii. Aktywność ta była istotnie wyższa od innych badanych leków, takich jak antybiotyki z grupy

makrolidów (azytromycyny i klarytromycyny) lub cefalosporyn III generacji (cefkapenu) [71].

Cyprofloksacyna i moksyflokscyna, chemioterapeutyki z grupy fluorochinolonów wnikają do komórek ssaków i akumulują się w cytozolu, osiągając nawet dziesięciokrotnie wyższe stężenia od ich stężeń zewnątrzkomórkowych. Wówczas ograniczają inwazję i przeżycie bakterii z gatunków *S. pneumoniae* i *S. aureus* (moksyflokscyna) oraz *P. aeruginosa* i *H. influenzae* (cyprofloksacyna). Obecność tych fluorochinolonów wewnątrz komórek nabłonka oddechowego, pozyskanego z tkanki wyciętych polipów nosa i hodowanych w trójwymiarowej hodowli umożliwiła przeżycie od 42 do 76% komórek w hodowli, zakażonej wymienionymi powyżej gatunkami bakterii potencjalnie wywołującymi zakażenia GDO. W próbach kontrolnych (bez fluorochinolonów) przeżywalność komórek w zakażonej hodowli wynosiła od 0 do 38% [88].

Znaczną aktywność makrolidu – azytromycyny względem wewnątrzkomórkowych izolatów NTHi pozyskanych od chorych z nawracającym zapaleniem ucha środkowego wykazano po zakażeniu ludzkich komórek nabłonka gardła linii Detroit 562 (ATCC CCL-138). Stężenie azytromycyny podanej zewnątrzkomórkowo w stężeniu co najmniej 10 µg/ml narastało w czasie w cytoplazmie komórek gospodarza, osiągając stężenie 16 µg/ml po ośmiu godzinach inkubacji. Wówczas, gdy w środowisku wzrostu komórek nabłonka znajdowała się azytromycyna w stężeniu 100 µg/ml nie obserwowano ani zjawiska inwazji, ani też penetracji pałeczek NTHi przez warstwę komórek nabłonka *in vitro* [38].

Aktywność szeregu antybiotyków aktywnych wobec gronkowca złocistego, takich jak ryfampicyna, linezolid, kwas fusydowy, wankomycyna, daptomycyna, chinupristina/dalfopristina i oritawancyna badano wobec czterech szczepów *S. aureus* o obniżonej wrażliwości na wankomycynę (MIC 1–4 mg/l) i daptomycynę (MIC 1–4 mg/l) wewnątrz ludzkich komórek linii monocytarnej THP-1 (ATCC TIB-202). Spośród tych antybiotyków jedynie chinupristina/dalfopristina i oritawancyna w stężeniach odpowiadającym maksymalnym stężeniom w surowicy wykazały skuteczność wobec badanych szczepów, redukując liczebność wewnątrzkomórkowych bakterii o średnio dwa rzędy wielkości [48]. Antybiotyki te przejawiają też aktywność (redukcja liczby żywych komórek o dwa rzędy wielkości) wobec wariantów małych kolonii *S. aureus* [58]. W kolejnych eksperymentach ta sama grupa badaczy określiła aktywność innych leków: kotrimoksazolu, klindamycyny, linezolidu i moksyflokscyny wobec 12 izolatów gronkowca złocistego z przypadków zakażeń pozaszpitalnych i dwóch klinicznych szczepów MRSA. Najwyższą skuteczność przeciwbakteryjną (redukcja liczby bakterii o dwa, trzy rzędy wielkości) obserwowano dla moksyflokscyny, ale tylko dla tych wewnątrzkomórkowych

szczepów, dla których wartość MIC tego fluorochinolonu była $\leq 0,125$ mg/l [49]. W obu opisanych powyżej badaniach zaobserwowano, że niezależnie od linii ludzkich komórek, które zakażano gronkowcem złocistym (komórki linii monocytarnej lub keratynocyty) i niezależnie od rodzaju skutecznego wobec wewnątrzkomórkowych bakterii antybiotyku lub chemioterapeutyku zawsze pozostawała niewielka frakcja żywych bakterii (około 1% populacji) wewnątrz komórek gospodarza. Zjawisko to przypomina powstawanie frakcji komórek przetrwałych w biofilmach poddanych działaniu antybiotyków [18].

Dotychczas wykonane badania skuteczności leków wobec wewnątrzkomórkowej populacji *S. aureus*, porównujące ich aktywność wobec szczepu typu dzikiego i szczepu o fenotypie SCV, dotyczyły w zasadzie dwóch antybiotyków: dikloksacyliny – półsyntetycznego antybiotyku beta-laktamowego i linezolidu. Nie wykazano dla tych antybiotyków wystarczającej aktywności bójczej dla eradykacji wewnątrzkomórkowych patogenów *in vitro* na linii ludzkich komórek monocytarnych THP-1. Leki te powodowały redukcję liczby bakterii obu badanych fenotypów o jedynie 1–1,5 log₁₀ CFU w stosunku do liczby bakterii obecnych w ludzkich komórkach niepoddanych działaniu antybiotyków [69].

Ostatnio bardzo ciekawe zjawisko zaobserwowali Zautner i wsp. [96]. Wewnątrzkomórkowe izolaty *S. aureus*, wyosobnione z migdałków podniebiennych od chorych z nawracającym zapaleniem migdałków były znacznie bardziej wrażliwe na antybiotyki niż szczepy tego drobnoustroju pozyskane z wymazów od chorych niehospitalizowanych. Jest zatem bardzo prawdopodobne, że wzrost bakterii wewnątrz komórek gospodarza, czyli w środowisku niedostępnym dla niektórych antybiotyków, sprzyja zmniejszeniu presji selekcyjnej i promowaniu genotypu (i fenotypu) wrażliwych bakterii.

8. Podsumowanie

W pracy omówiono wyniki badań poświęconych internalizacji, bytowaniu i namnażaniu się względnie chorobotwórczych patogenów górnych dróg oddechowych w komórkach gospodarza. Wnioski płynące z tych badań wskazują na możliwość istnienia wewnątrzkomórkowego rezerwuaru bakterii, które potencjalnie może stanowić źródło reinfekcji po zaprzestaniu terapii za pomocą antybiotyków/chemioterapeutyków lub podczas zaburzeń prawidłowej odpowiedzi immunologicznej. Na podstawie analizy wielu mechanizmów prowadzących do wydajnej adhezji, przenikania i przeżycia w komórkach gospodarza względnie chorobotwórczych drobnoustrojów, takich jak *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *H. influenzae* i *M. catarrhalis* można stwierdzić, że występuje wiele wspólnych cech tych

procesów niezależnych od gatunków bakterii. Wymienić tu można zbliżone mechanizmy adhezji z wykorzystaniem białek pomostowych ECM, internalizację z udziałem raftów lipidowych, cząsteczek z nadrodziny immunoglobulin oraz aktywację szlaków sygnałowych kinaz tyrozynowych i serynowo-treoninowych. Interferencja w prawidłowy przebieg tych zjawisk może stać się istotnym celem podczas rozwoju nowych leków i strategii terapeutycznych. Jednocześnie rodzi się wiele nowych pytań, dotyczących między innymi odpowiedzi komórek gospodarza na inwazję bakterii. Dotychczasowe obserwacje wskazują na istotne zmiany w ekspresji genów w komórkach nabłonka, indukcję szlaków prozapalnych i prowadzących do apoptozy [50]. Badania molekularnych mechanizmów przetrwania względnie chorobotwórczych bakterii wewnątrz komórek gospodarza w trakcie zakażenia zwalczanego za pomocą antybiotyków lub chemioterapeutyków są niezbędne dla poznania przyczyn braku skuteczności leczenia i utrzymania się lub nawracania infekcji GDO.

Piśmiennictwo

- Aebi C.: *Moraxella catarrhalis* – pathogen or commensal? *Adv. Exp. Med. Biol.* **697**, 107–116 (2011)
- Ahrén I.L., Karlsson E., Forsgren A., Riesbeck K.: Comparison of the antibacterial activities of ampicillin, ciprofloxacin, clarithromycin, telithromycin and quinupristin/dalfopristin against intracellular non-typeable *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 903–906 (2002)
- Aikawa C., Nozawa T., Maruyama F., Tsumoto K., Hamada S., Nakagawa I.: Reactive oxygen species induced by *Streptococcus pyogenes* invasion trigger apoptotic cell death in infected epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **12**, 814–830 (2010)
- Amelung S., Nerlich A., Rohde M., Spellerberg B., Cole J.N., Nizet V., Chhatwal G.S., Talay S.R.: The FbaB-type fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* promotes specific invasion into endothelial cells. *Cell. Microbiol.* **13**, 1200–1211 (2011)
- Anderson K.L., Roberts C., Disz T., Vonstein V., Hwang K., Overbeek R., Olson P.D., Projan S.J., Dunman P.M.: Characterization of the *Staphylococcus aureus* heat shock, cold shock, stringent, and SOS responses and their effects on log-phase mRNA turnover. *J. Bacteriol.* **188**, 6739–6756 (2006)
- Anderton J.M., Rajam G., Romero-Steiner S., Summer S., Kowalczyk A.P., Carlone G.M., Sampson J.S., Ades E.W.: E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.* **42**, 225–236 (2007)
- Agarwal V., Asmat T.M., Dierdorf N.I., Hauck C.R., Hammerschmidt S.: Polymeric immunoglobulin receptor-mediated invasion of *Streptococcus pneumoniae* into host cells requires a coordinate signaling of SRC family of protein-tyrosine kinases, ERK, and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* **285**, 35615–35623 (2010)
- Asmat T.M., Agarwal V., Räh S., Hildebrandt J.P., Hammerschmidt S.: *Streptococcus pneumoniae* infection of host epithelial cells via polymeric immunoglobulin receptor transiently induces calcium release from intracellular stores. *J. Biol. Chem.* **286**, 17861–17869 (2011)
- Balder R., Krunkosky T.M., Nguyen C.Q., Feezel L., Lafontaine E.R.: Hag mediates adherence of *Moraxella catarrhalis* to ciliated human airway cells. *Infect. Immun.* **77**, 4597–4608 (2009)
- Bergmann S., Lang A., Rohde M., Agarwal V., Rennemeier C., Grashoff C., Preissner K.T., Hammerschmidt S.: Integrin-linked kinase is required for vitronectin-mediated internalization of *Streptococcus pneumoniae* by host cells. *J. Cell. Sci.* **122**(Pt 2), 256–267 (2009)
- Brooks M.J., Sedillo J.L., Wagner N., Laurence C.A., Wang W., Attia A.S., Hansen E.J., Gray-Owen S.D.: Modular arrangement of allelic variants explains the divergence in *Moraxella catarrhalis* UspA protein function. *Infect. Immun.* **76**, 5330–5340 (2008)
- Bookwalter J.E., Jurcisek J.A., Gray-Owen S.D., Fernandez S., McGillivray G., Bakaletz L.O.: A carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 homologue plays a pivotal role in nontypeable *Haemophilus influenzae* colonization of the chinchilla nasopharynx via the outer membrane protein P5-homologous adhesin. *Infect. Immun.* **76**, 48–55 (2008)
- Buchinsky F.J., Forbes M.L., Hayes J.D., Shen K., Ezzo S., Compliment J., Hogg J., Hiller N.L., Hu F.Z., Post J.C., Ehrlich G.D.: Virulence phenotypes of low-passage clinical isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* assessed using the chinchilla laniger model of otitis media. *BMC Microbiol.* **14**, 56 (2007)
- Caswell C.C., Oliver-Kozup H., Han R., Lukomska E., Lukomski S.: Scl1, the multifunctional adhesin of group A *Streptococcus*, selectively binds cellular fibronectin and laminin, and mediates pathogen internalization by human cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **303**, 61–68 (2010)
- Chavakis T., Wiechmann K., Preissner K.T., Herrmann M.: *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial “secretable expanded repertoire adhesive molecules” (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb. Haemost.* **94**, 278–285 (2005)
- Corrigan R.M., Miajlovic H., Foster T.J.: Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiol.* **9**, 22 (2009)
- Craig J.E., Cliffe A., Garnett K., High N.J.: Survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 55–61 (2001)
- Dawson C.C., Intapa C., Jabra-Rizk M.A.: “Persisters”: survival at the cellular level. *PLoS Pathog.* **7**:e1002121 (2011)
- de Vries S.P., Bootsma H.J., Hays J.P., Hermans P.W.: Molecular aspects of *Moraxella catarrhalis* pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 389–406 (2009)
- Dobroś W., Pacura B., Fraczek W., Klisowski T., Potempa J., Kozieł J.: Identification of *Staphylococcus aureus* in homogenates of hypertrophic adenoid (a preliminary report). *Przegl. Lek.* **67**, 355–356 (2010)
- Edwards A.M., Potts J.R., Josefsson E., Massey R.C.: *Staphylococcus aureus* host cell invasion and virulence in sepsis is facilitated by the multiple repeats within FnBPA. *PLoS Pathog.* **6**, e1000964 (2010)
- Erwin A.L., Smith A.L.: Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol.* **15**, 355–362 (2007)
- Fekete-Szabo G., Berenyi I., Gabriella K., Urban E., Nagy E.: Aerobic and anaerobic bacteriology of chronic adenoid disease in children. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **74**, 1217–1220 (2010)
- Forsgren J., Samuelson A., Ahlin A., Jonasson J., Rynnel-Dagö B., Lindberg A.: *Haemophilus influenzae* resides and multiplies intracellularly in human adenoid tissue as demonstrated by in situ hybridization and bacterial viability assay. *Infect Immun.* **62**, 673–679 (1994)

25. Fujita K., Hirano T., Kodama S., Suzuki M.: Prognostic impact of phosphorylcholine expression in nontypeable *Haemophilus influenzae* in otitis media with effusion. *Acta Otolaryngol.* **129**, 832–838 (2009)
26. Garzoni C., J. Schrenzel i wsp.: A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC Genomics*, **14**, 171 (2007) (Praca jest dziełem 12 autorów).
27. Garzoni C., Kelley W.L.: *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.* **17**, 59–65 (2009)
28. Giese B., Dittmann S., Paprotka K., Levin K., Weltrowski A., Biehler D., Lâm T.T., Sinha B., Fraunholz M.J.: Staphylococcal alpha-toxin is not sufficient to mediate escape from phagolysosomes in upper-airway epithelial cells. *Infect. Immun.* **77**, 3611–3625 (2009)
29. Giese B., Glowinski F., Paprotka K., Dittmann S., Steiner T., Sinha B., Fraunholz M.J.: Expression of δ -toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of β -toxin. *Cell. Microbiol.* **13**, 316–329 (2011)
30. Green L.R., Monk P.N., Partridge L.J., Morris P., Gorringer A.R., Read R.C.: Cooperative role for tetraspanins in adhesion-mediated attachment of bacterial species to human epithelial cells. *Infect. Immun.* **79**, 2241–2249 (2011)
31. Hall-Stoodley L., Kerschner J.E. i wsp.: Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* **296**, 202–211 (2006) (Praca jest dziełem 15 autorów).
32. Hall-Stoodley L., Stoodley P.: Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* **11**, 1034–1043 (2009)
33. Heilmann C.: Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv. Exp. Med. Biol.* **715**, 105–123 (2011)
34. Heiniger N., Spaniol V., Troller R., Vischer M., Aebi C.: A reservoir of *Moraxella catarrhalis* in human pharyngeal lymphoid tissue. *J. Infect. Dis.* **196**, 1080–1087 (2007)
35. Hertzén E., Johansson L., Wallin R., Schmidt H., Kroll M., Rehn A.P., Kotb M., Mörgelin M., Norrby-Teglund A.: M1 protein-dependent intracellular trafficking promotes persistence and replication of *Streptococcus pyogenes* in macrophages. *J. Innate Immun.* **2**, 534–45 (2010)
36. Hoa M., Tomovic S., Nistico L., Hall-Stoodley L., Stoodley P., Sachdeva L., Berk R., Cotichia J.M.: Identification of adenoid biofilms with middle ear pathogens in otitis-prone children utilizing SEM and FISH. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **73**, 1242–1248 (2009)
37. Hong W., Pang B., West-Barnette S., Swords W.E.: Phosphorylcholine expression by nontypeable *Haemophilus influenzae* correlates with maturation of biofilm communities in vitro and in vivo. *J. Bacteriol.* **189**, 8300–8307 (2007)
38. Hotomi M., Yamanaka N. i wsp.: Nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated from intractable acute otitis media internalized into cultured human epithelial cells. *Auris Nasus Larynx*. **37**, 137–144 (2010) (Praca jest dziełem 11 autorów).
39. Izano E.A., Shah S.M., Kaplan J.B.: Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. *Microb. Pathog.* **46**, 207–213 (2009)
40. Johnjuly W.K., Fuge L.H., Srivastava S., Post C.: Clinical application of treating biofilms-associated infections in family medicine. *South Med. J.* **105**, 30–35 (2012)
41. Johnson P.D., Oppedisano F., Bennett-Wood V., Gilbert G.L., Robins-Browne R.M.: Sporadic invasion of cultured epithelial cells by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* **64**, 1051–1053 (1996)
42. Kline K.A., Fälker S., Dahlberg S., Normark S., Henriques-Normark B.: Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe*, **18**, 580–592 (2009)
43. Kreikemeyer B., Gámez G., Margarit I., Giard J.C., Hamerschmidt S., Hartke A., Podbielski A.: Genomic organization, structure, regulation and pathogenic role of pilus constituents in major pathogenic Streptococci and Enterococci. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 240–251 (2011)
44. Kubica M., J. Potempa i wsp.: A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS One*, **3**, e1409 (2008) (Praca jest dziełem 12 autorów).
45. Lâm T.T., Giese B., Chikkaballi D., Kühn A., Wolber W., Pané-Farré J., Schäfer D., Engelmann S., Fraunholz M., Sinha B.: Phagolysosomal integrity is generally maintained after *Staphylococcus aureus* invasion of nonprofessional phagocytes but is modulated by strain 6850. *Infect. Immun.* **78**, 3392–3403 (2010)
46. Le T.M., Rovers M.M., van Staa B.K., van den Akker E.H., Hoes A.W., Schilder A.G.: Alterations of the oropharyngeal microbial flora after adenotonsillectomy in children: a randomized controlled trial. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **133**, 969–972 (2007)
47. Lee J.H., Uhl J.R., Cockerill F.R. 3rd, Weaver A.L., Orvidas L.J.: Real-time PCR vs standard culture detection of group A beta-hemolytic streptococci at various anatomic sites in tonsillectomy patients. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **134**, 1177–1181 (2008)
48. Lemaire S., Kosowska-Shick K., Julian K., Tulkens P.M., Van Bambeke F., Appelbaum P.C.: Activities of antistaphylococcal antibiotics towards the extracellular and intraphagocytic forms of *Staphylococcus aureus* isolates from a patient with persistent bacteraemia and endocarditis. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 766–777 (2008)
49. Lemaire S., Kosowska-Shick K., Appelbaum P.C., Glupczynski Y., Van Bambeke F., Tulkens P.M.: Activity of moxifloxacin against intracellular community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison with clindamycin, linezolid and co-trimoxazole and attempt at defining an intracellular susceptibility breakpoint. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 596–607 (2011)
50. Li X., Fusco W.G., Seo K.S., Bayles K.W., Mosley E.E., McGuire M.A., Bohach G.A.: Epithelial cell gene expression induced by intracellular *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Microbiol.* **2009**, Article ID 753278, 11 stron (2009)
51. Liu C.M., Cosetti M.K., Aziz M., Buchhagen J.L., Contente-Cuomo T.L., Price L.B., Keim P.S., Lalwani A.K.: The otologic microbiome. A study of the bacterial microbiota in a pediatric patient with chronic serous otitis media using 16S rRNA gene-based pyrosequencing. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **137**, 664–668 (2011)
52. Logsdon L.K., Håkansson A.P., Cortés G., Wessels M.R.: Streptolysin O inhibits clathrin-dependent internalization of group A Streptococcus. *Mbio*, **15**, e00332–10 (2011)
53. Martí-Llitas P., Regueiro V., Morey P., Hood D.W., Saus C., Sauleda J., Agustí A.G., Bengoechea J.A., Garmendia J.: Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect. Immun.* **77**, 4232–4242 (2009)
54. Morey P., Cano V., Martí-Llitas P., López-Gómez A., Regueiro V., Saus C., Bengoechea J.A., Garmendia J.: Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology* **157**, 234–250 (2011)
55. Moriyama S., Hotomi M., Shimada J., Billal D.S., Fujihara K., Yamanaka N.: Formation of biofilm by *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric intractable otitis media. *Auris Nasus Larynx* **36**, 525–531 (2009)
56. Muenzner P., Rohde M., Kneitz S., Hauck C.R.: CEACAM engagement by human pathogens enhances cell adhesion and

- counteracts bacteria-induced detachment of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **29**, 825–836 (2005)
57. Nistico L., Hall-Stoodley L. i wsp.: Adenoid reservoir for pathogenic biofilm bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1411–1420 (2011) (Praca jest dziełem 15 autorów).
 58. Nguyen H.A., Denis O., Vergison A., Theunis A., Tulkens P.M., Struelens M.J., Van Bambeke F.: Intracellular activity of antibiotics in a model of human THP-1 macrophages infected by a *Staphylococcus aureus* small-colony variant strain isolated from a cystic fibrosis patient: pharmacodynamic evaluation and comparison with isogenic normal-phenotype and revertant strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1434–1442 (2009)
 59. Nobbs A.H., Lamont R.J., Jenkinson H.F.: *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 407–450 (2009)
 60. Ogawa T., Terao Y., Okuni H., Ninomiya K., Sakata H., Ikebe K., Maeda Y., Kawabata S.: Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microb. Pathog.* **51**, 58–68 (2011)
 61. Papisergi S., Garibaldi M., Tuscano G. i wsp.: Plasminogen and fibronectin-binding protein B is involved in the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 7517–7524 (2010) (Praca jest dziełem 11 autorów).
 62. Park K.: Otitis media and tonsils-role of adenoidectomy in the treatment of chronic otitis media with effusion. *Adv. Otorhinolaryngol.* **72**, 160–163 (2011)
 63. Paterson N.G., Baker E.N.: Structure of the full-length major pilin from *Streptococcus pneumoniae*: implications for isopeptide bond formation in gram-positive bacterial pili. *PLoS One* **6**, e22095 (2011)
 64. Pettigrew M.M., Gent J.F., Revai K., Patel J.A., Chonmaitree T.: Microbial interactions during upper respiratory tract infections. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1584–1591 (2008)
 65. Piacentini G.L., Peroni D.G., Blasi F., Pescollendergg L., Goller P., Gallmetzer L., Drago L., Bodini A., Boner A.L.: Atypical bacteria in adenoids and tonsils of children requiring adenotonsillectomy. *Acta Otolaryngol.* **130**, 620–625 (2010)
 66. Podbielski A., Beckert S., Schattke R., Leithäuser F., Lestin F., Gossler B., Kreikemeyer B.: Epidemiology and virulence gene expression of intracellular group A streptococci in tonsils of recurrently infected adults. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 179–190 (2003)
 67. Proft T., Baker E.N.: Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 613–635 (2009)
 68. Renzoni A., Huggler E., Kelley W.L., Lew D., Vaudaux P.: Increased uptake and improved intracellular survival of a teicoplanin-resistant mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in non-professional phagocytes. *Chemotherapy*, **55**, 183–188 (2009)
 69. Sandberg A., Hessler J.H., Skov R.L., Blom J., Frimodt-Møller N.: Intracellular activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a mouse peritonitis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1874–1883 (2009)
 70. Sandberg A., Jensen K.S., Baudoux P., Van Bambeke F., Tulkens P.M., Frimodt-Møller N.: Intra- and extracellular activities of dicloxacillin against *Staphylococcus aureus* in vivo and in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 2391–2400 (2010)
 71. Sekiya Y., Eguchi M., Nakamura M., Ubukata K., Omura S., Matsui H.: Comparative efficacies of different antibiotic treatments to eradicate nontypeable *Haemophilus influenzae* infection. *BMC Infect. Dis.* **7**, 15 (2008)
 72. Sendi P., Proctor R.A.: *Staphylococcus aureus* as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol.* **17**, 54–58 (2009)
 73. Shakhnovich E.A., King S.J., Weiser J.N.: Neuraminidase expressed by *Streptococcus pneumoniae* desialylates the lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*: a paradigm for interbacterial competition among pathogens of the human respiratory tract. *Infect. Immun.* **70**, 7161–7164 (2002)
 74. Shin K.S., Cho S.H., Kim K.R., Tae K., Lee S.H., Park C.W., Jeong J.H.: The role of adenoids in pediatric rhinosinusitis. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **72**, 1643–1650 (2008)
 75. Shinji H., Yosizawa Y., Tajima A., Iwase T., Sugimoto S., Seki K., Mizunoe Y.: Role of fibronectin-binding proteins A and B in in vitro cellular infections and in vivo septic infections by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **79**, 2215–2223 (2011)
 76. Singh B., Su Y.C., Riesbeck K.: Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion. *Mol. Microbiol.* **78**, 545–60 (2010)
 77. Sinha B., Fraunholz M.: *Staphylococcus aureus* host cell invasion and post-invasion events. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 170–175 (2010)
 78. Soong G., Martin F.J., Chun J., Cohen T.S., Ahn D.S., Prince A.: *Staphylococcus aureus* protein A mediates invasion across airway epithelial cells through activation of RhoA GTPase signaling and proteolytic activity. *J. Biol. Chem.* **286**, 35891–35899 (2011)
 79. Spaniol V., Heiniger N., Troller R., Aebi C.: Outer membrane protein UspA1 and lipooligosaccharide are involved in invasion of human epithelial cells by *Moraxella catarrhalis*. *Microbes Infect.* **10**, 3–11 (2008)
 80. Spaniol V., Troller R., Schaller A., Aebi C.: Physiologic cold shock of *Moraxella catarrhalis* affects the expression of genes involved in the iron acquisition, serum resistance and immune evasion. *BMC Microbiol.* **12**, 182 (2011)
 81. St Geme J.W. 3rd, Falkow S.: *Haemophilus influenzae* adheres to and enters cultured human epithelial cells. *Infect. Immun.* **58**, 4036–4044 (1990)
 82. Stępińska M., Trafny E.A.: Diverse type III secretion phenotypes among *Pseudomonas aeruginosa* strains upon infection of murine macrophage-like and endothelial cell lines. *Microb. Pathog.* **44**, 448–458 (2008)
 83. Strzelecki J., Sadowy E., Hryniewicz W.: Białka powierzchniowe enterokoków odpowiedzialne za oddziaływanie z tkankami gospodarza. *Post. Mikrobiol.* **50**, 31–42 (2011).
 84. Swords W.E., Buscher B.A., Ver Steeg I.K., Preston A., Nichols W.A., Weiser J.N., Gibson B.W., Apicella M.A.: Nontypeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol. Microbiol.* **37**, 13–27 (2000)
 85. Thornton R.B., Rigby P.J., Wiertsema S.P., Filion P., Langlands J., Coates H.L., Vijayasekaran S., Keil A.D., Richmond P.C.: Multi-species bacterial biofilm and intracellular infection in otitis media. *BMC Pediatr.* **11**, 94 (2011)
 86. Thwaites G.E., Gant V.: Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 215–222 (2011)
 87. Tuchscher L., Heitmann V., Hussain M., Viemann D., Roth J., von Eiff C., Peters G., Becker K., Löffler B.: *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J. Infect. Dis.* **202**, 1031–1040 (2010)
 88. Ulrich M., Berger J., Möller J.G., Döring G.: Moxifloxacin and ciprofloxacin protect human respiratory epithelial cells against *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Haemophilus influenzae* in vitro. *Infection*, **33**, Suppl. 2, 50–54 (2005)
 89. Van der Veen E.L., Sanders E.A., Videler W.J., van Staaij B.K., van Benthem P.P., Schilder A.G.: Optimal site for throat culture: tonsillar surface versus posterior pharyngeal wall. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **263**, 750–753 (2006)

90. Veiga E., Guttman J.A., Bonazzi M. i wsp.: Invasive and adherent bacterial pathogens co-opt host clathrin for infection. *Cell. Host Microbe*, **15**, 340–351 (2007) (Praca jest dziełem 11 autorów).
91. Voges M., Bachmann V., Kammerer R., Gophna U., Hauck C.R.: CEACAM1 recognition by bacterial pathogens is species-specific. *BMC Microbiol.* **20**, 117 (2010)
92. Weimer K.E., Armbruster C.E., Juneau R.A., Hong W., Pang B., Swords W.E.: Coinfection with *Haemophilus influenzae* promotes pneumococcal biofilm formation during experimental otitis media and impedes the progression of pneumococcal disease. *J. Infect. Dis.* **202**, 1068–75 (2010)
93. White-Ziegler C.A., Um S., Pérez N.M., Berns A.L., Malhowski A.J., Young S.: Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology*, **154**, 148–166 (2008)
94. Woodford N., Livermore D.M.: Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J. Infect.* **59**, S4–16 (2009)
95. Wołkowicz T., Kadłubowski M., Jaguszyn-Krynicka E.K., Hryniewicz W.: Mechanizmy oporności *Haemophilus influenzae* na antybiotyki β -laktamowe. *Post. Mikrobiol.* **48**, 55–66 (2009)
96. Zautner A.E., Krause M, Stropahl G., Holtfreter S., Frickmann H., Maletzki C., Kreikemeyer B., Pau H.W., Podbielski A.: Intracellular persisting *Staphylococcus aureus* is the major pathogen in recurrent tonsillitis. *PLoS One* **5**, e9452 (2010)
97. Zielnik-Jurkiewicz B., Bielicka A.: Profil oporności bakterii w ostrym zapaleniu ucha środkowego u dzieci po nieskutecznej antybiotykoterapii. *Otolaryngologia* **6**, 189–193 (2007)

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2010–2013 jako projekt badawczy Nr N N404 138938.

Weronika Maria Helbin, Klaudia Polakowska, Jacek Międzobrodzki*

Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński
ul. Gronostajowa, 30-387 Kraków

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Wpływ bakteriofagów na wirulencję gatunku *Staphylococcus aureus*. 3. Gronkowcowe wyspy patogenności SaPIs (staphylococcal pathogenicity islands). 4. Wpływ antybiotyków na odpowiedź SOS i indukcję bakteriofagów. 5. Podsumowanie

Phage-related virulence factors of *Staphylococcus aureus*

Abstract: Mobile genetic elements play fundamental role in the emergence of new pathogens and in the adaptation of all bacteria species to the environment. It is believed that the horizontal gene transfer has a major impact on genome structure of *Staphylococcus aureus* which of both commensal and major pathogen of humans and warm-blooded animals. Bacteriophages via lysogenic conversion are source of the major staphylococcal virulence factors, contribute to strain diversity and enable rapid changes in host specificity. Bacteriophages have also close connection to other kind of mobile genetic elements, known as staphylococcal pathogenicity islands, SaPIs. SaPIs excision from chromosome and replication is possible only after infection of a particular phage and the islands are able to leave the host cell inside hijacked capsids. Horizontal transfer of SaPIs which occurs through a modified transduction may be responsible for spread of toxic-shock syndrome toxin TSST-1, and other superantigens among *S. aureus* strains, and possibly from *S. aureus* to other species. Recently it has been reported that β -lactam and fluorochinolone antibiotic in subinhibitory concentration promote SOS-mediated prophage induction, replication of SaPIs in its host cells and consequently the further spread of SaPIs, and lysogenic conversion genes in pathogenic bacteria. Further understanding of phage and phage-dependent mobile genetic elements can provide insight into staphylococcal virulence and help in the development of efficient treatment of *S. aureus* infections.

1. Introduction. 2. Effect of bacteriophages on the virulence of *Staphylococcus aureus*. 3. Staphylococcal pathogenicity islands SaPIs. 4. Antibiotic dependent SOS response and the induction of prophages. 5. Summary

Słowa kluczowe: bakteriofagi, konwersja lizogeniczna, mobilne elementy genetyczne, SaPI, *Staphylococcus aureus*

Key words: bacteriophages, lysogenic conversion, mobile genetic elements, SaPI, *Staphylococcus aureus*

1. Wprowadzenie

Prowadzone od wielu lat badania nad strukturą i dynamiką zmienności genomów bakteryjnych dowodzą, iż są one strukturami wysoce plastycznymi oraz charakteryzującymi się szybszym tempem ewolucji, niż spotykanym w obrębie genomów organizmów eukariotycznych. Mechanizmami warunkującymi ogromną zmienność Prokariota są tak samo jak u Eukariota rearanżacje w obrębie DNA oraz pokoleniowe nagromadzenie mutacji punktowych. Przede wszystkim jednak główną siłą napędową ewolucji bakteryjnej jest horyzontalny transfer informacji genetycznej, HGT (*horizontal gene transfer*) pozwalający na nabycie wielu genów podczas jednego zdarzenia rekombinacyjnego.

Proces ten jest stosunkowo łatwo zauważalny gdy geny czynników wirulencji kodowane są w tzw. mobilnych elementach genetycznych MGE (*mobile genetic elements*) takich jak plazmidy, transpozony i bakteriofagi [16, 26]. Wyróżnia się trzy główne mechanizmy lateralnego transferu informacji genetycznej pomiędzy komórkami bakteryjnymi – transformację, koniugację oraz transdukcję bakteriofagową. W skrócie: transfor-

macja polega na pobraniu przez komórkę materiału genetycznego ze środowiska, integracji z własnym genomem i następnie jego ekspresji w tej komórce, zwanej odtąd biorcą lub transformantem. Niektóre gatunki bakterii wykazują stałą zdolność do transformacji, zwaną „kompetencją”, natomiast inne są w stanie pobrać wolny DNA tylko w określonych warunkach. Koniugacja jest bezpośrednim transferem DNA z komórki do komórki zachodzącym za pośrednictwem kanału zwanego mostkiem koniugacyjnym, pilusem, który tworzy połączenie między dawcą i biorcą. Geny kodujące aparat koniugacyjny znajdują się często na przekazywanej nici DNA, a w komórce przyjmuje ona najczęściej formę cykliczną zwaną plazmidem. Transdukcja odnosi się do transferu DNA do komórki za pośrednictwem cząstek wirusowych. Jest to złożone zjawisko występujące w bardzo wielu formach. Niektóre wirusy przenoszą zawsze te same sekwencje genomu gospodarza do kolejnych komórek, co określane jest transdukcją specyficzną. Natomiast inne wirusy, zwane w przypadku bakterii bakteriofagami mogą przenosić losowe fragmenty DNA pobrane z komórki, w której przebiegała ich replikacja i składanie [5, 7].

* Autor korespondencyjny: e-mail: jacek.miedzobrodzki@uj.edu.pl

Postuluje się, iż proces HGT ma szczególne znaczenie dla ewolucji i struktury genomu gatunku *Staphylococcus aureus*, którego specyficzne uwarunkowania genetyczne czynią go zarówno komensalem jak i potencjalnym patogenem człowieka [8, 37, 59]. Bakterie te, znane pod polską nazwą gronkowiec złocisty, są wszechobecne w biosferze. Jednakże ich rezerwuarem są ludzie i zwierzęta, gdyż gronkowce mogą namnażać się jedynie w wyższych organizmach. U ludzi zdrowych stanowią one główny składnik mikroflory prawidłowej skóry i błon śluzowych, ale mogą być również przyczyną zakażeń endogennych lub egzogennych u ludzi o obniżonej odporności immunologicznej. Gatunek *S. aureus* stanowi również obecnie jeden z głównych czynników etiologicznych zakażeń szpitalnych oraz jest bardzo ważnym pod względem ekonomicznym patogenem zwierząt hodowlanych. Liczne szczepy tego gatunku, wyposażone są bowiem w geny oporności na antybiotyki oraz wiele czynników wirulencji odpowiedzialnych za objawy kliniczne obserwowane podczas przebiegu infekcji. Największym atutem gronkowców jest zdolność adaptacji pozwalająca im przetrwać niesprzyjające warunki oraz kolonizować nowe środowiska [39]. Analizy genomów gronkowcowych wykazały, iż horyzontalny transfer genów ma fundamentalne znaczenie dla zróżnicowania w obrębie gatunku *S. aureus*: nawet do 22% genomowego DNA stanowiły sekwencje zmienne składające się z mobilnych, lub niegdyś mobilnych, elementów genetycznych [33]. W wyniku infekcji bakteriofagowej, głównie pod postacią profagów uzyskanych zostało około 2% całości gronkowcowego DNA [29]. Obok bakteriofagów konwersji lizogennej niosących geny kodujące determinanty patogenności, również fagi transdukcji ogólnej, jak na przykład $\phi 11$, są prawdopodobnie odpowiedzialne za większość ogółu horyzontalnego transferu elementów genetycznych pomiędzy szczepami *S. aureus* [25]. Wysoki wpływ fagów na ewolucję gronkowców może mieć swoje źródło w niskiej naturalnej kompetencji tego gatunku do przyjmowania wolnego DNA ze środowiska [8, 19, 42]. Należy również podkreślić, iż znaczenie profagów nie ogranicza się tylko do skokowego transferu dużych bloków informacji genetycznej. Wykazano, iż profagi mogą uczestniczyć również w samym zjawisku patogenezy podczas trwania infekcji bakteryjnej [59].

2. Wpływ bakteriofagów na wirulencję gatunku *Staphylococcus aureus*

Wszystkie bakteriofagi, czyli wirusy specyficznie atakujące bakterie, podzielić można na trzy zróżnicowane grupy: lityczne, lizogeniczne i chroniczne. Dla każdej z nich wnikięcie bakteriofaga do komórki bakteryjnej może mieć różne następstwa. Podczas infekcji litycznej

dochodzi do replikacji cząstek faga aż do wyczerpania zasobów metabolicznych komórki a następnie jej lizy z uwolnieniem nowych bakteriofagów do środowiska. Fagi lityczne należą przede wszystkim do rodziny *Myoviridae* i wykorzystywane są w terapii fagowej ze względu na swoją wysoką specyficzność [29, 40]. Bakterie zainfekowane fagami chronicznymi zachowują zdolność do wzrostu i podziału pomimo replikacji wirusów i ich ciągłego uwalniania do środowiska.

Fagi lizogeniczne należą do rodziny *Siphoviridae* a ich wpływ na ewolucję bakterii nie polega jedynie na „wyscigu zbrojeń” jak to ma miejsce dla ich litycznych odpowiedników. Infekcja lizogeniczna również może skończyć się propagacją faga i lizą gospodarza, lecz przeważnie genom wirusa integruje do chromosomu bakteryjnego gdzie w postaci profaga ulega utajeniu [37]. Genomika bakteryjna wykazała, iż lizogenizacja jest bardziej zasadą niż wyjątkiem, a wiele gatunków bakterii zawiera w swoim genomie więcej niż jednego profaga [9]. Szczep *S. aureus* NCTC 8325 był jednym z pierwszych gronkowców, dla których została opracowana fizyczna mapa genomu. Zawiera on 3 sekwencje bakteriofagowe natomiast u innych przedstawicieli rodzaju *Staphylococcus* spotyka się dwie lub pojedyncze takie sekwencje. Porównanie genomu wyżej wspomnianego szczepu NCTC 8325 z genomem MSSA-476 wykazało, iż to bakteriofagi są główną przyczyną różnic. Natomiast w przypadku szczepów N315 i NW2 odmienność wprowadzały transpozony, sekwencje insercyjne i wyspy patogenności [2]. Obecność sekwencji bakteriofagowych nie jest jednak regułą w obrębie rodzaju *Staphylococcus*. Warto zaznaczyć, iż genom szczepu *S. epidermidis* ATCC 12228 nie zawiera ani jednego profaga [10].

Niektóre fagi lizogeniczne niosą dodatkowe geny zwane „moronami” lub LCG, genami konwersji lizogennej (*lysogenic conversion genes*), które po integracji z chromosomem gospodarza ulegają ekspresji zmieniając jego fenotyp [5]. Zjawisko to znane jest pod nazwą konwersji lizogennej/lizogenicznej. Ze zjawiskiem lizogenii została powiązana ponad 40 lat temu produkcja niektórych toksyn przez gatunek *S. aureus* gdy odkryto, że poprzez infekcję fagową można uzyskać szczep z ekspresją alfa-hemolizyny [3]. Od tego czasu opisano wiele bakteryjnych determinant patogenności kodowanych w genomie bakteriofagów. Te dodatkowe geny ulegają ekspresji po integracji z chromosomem zmieniając fenotyp gospodarza. Jest to zjawisko zwane pozytywną konwersją lizogeniczną. Geny typu LGC mogą znacząco wpływać na dostosowanie bakterii do środowiska oraz jak w przypadku patogenów, warunkować określone objawy kliniczne oraz specyficzność względem gospodarza [21, 31]. Poniżej zostaną przedstawione gronkowcowe czynniki wirulencji o najważniejszym znaczeniu klinicznym, których źródłem była transmisja bakteriofagowa.

Tabela I

Wybrane czynniki wirulencji *Staphylococcus aureus* zależne od bakteriofagów

Toksyna/determinanta patogenności (<i>gen</i>)	MGE	Opis/Mechanizm/Objawy chorobowe	Piśmien- nictwo
Białko odpowiedzialne za powstawanie biofilmu (<i>bap</i>)	SaPIbov	Powstawanie biofilmu we wnętrzu krowiego wymienia, zaangażowane w objawy <i>mastitis</i>	[19, 54, 57]
Białko wiążące czynnik von Willebranda (vWBps) wariant swoisty względem gospodarza (<i>vwb_{ps}</i>)	SaPIbov2, SaPIbov4, SaPIbov5, SaPIeq1, SaPIov2	Wariant genomowego białka vWBp, Koagulacja osocza bydlęcego lub końskiego	[20, 21, 61]
CHIPS, gronkowcowe białko inhibitorowe chemotaksji (<i>chip</i>)	φ13, φtp310-3, φ252B, φMu3A, φN315, φNM3, φSa3JH1, φSa3mw, φSa3 ms, φSa3JH9, φSa3USA300, φβC-USA300_TCH1516	Obniża aktywność receptorów C5AR1 i FPR1 neutrofilii w stosunku do składników dopełniacza C5a i formylowanych peptydów	[45, 49, 59, 62]
Eksfoliatyna A (<i>eta</i>)	ΦETA	Toksyna odpowiedzialna za objawy towarzyszące gronkowcowemu złuszcżającemu zapaleniu skóry	[6, 30]
Enterotoksyna A (<i>sea</i>)	ΦSa3ms, ΦSa3mw, Φ252B, ΦNM3, ΦMu50a	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
Enterotoksyna B (<i>seb</i>)	SaPI1, SaPI3	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
Enterotoksyna C (<i>sec</i>)	SaPIin1, SaPIin1, SaPIin2, SaPIbov1	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
Enterotoksyna K (<i>selk</i>)	ΦSa3ms, ΦSa3mw, SaPI1, SaPI3, SaPIbov1, SaPI5	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
Enterotoksyna L (<i>sell</i>)	SaPIin1, SaPIin1, SaPIin2, SaPIbov1	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
Enterotoksyna P (<i>seip</i>)	ΦN315, ΦMu3A	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
Enterotoksyna Q (<i>selq</i>)	ΦSa3ms, ΦSa3mw, SaPI1, SaPI3, SaPI5	Gronkowcowe zatrucie pokarmowe	[1]
PVL, leukocydyna Panton'a-Valentina'a, dwupodjednostkowa toksyna (<i>lukS</i> i <i>lukF</i>)	ΦSA2pvl, ΦSLT, ΦPVL, ΦSA2MW, ΦSA2usa	Powoduje lizę ssaczych leukocytów, stymuluje nadmierną produkcję czynników prozapalnych prowadzącą do nekrozy tkanek	[15, 17, 27, 63]
SCIN, gronkowcowy inhibitor dopełniacza (<i>scn</i>)	φ13, φN315, φ252B, φNM3, φMu50A, φSa3JH1, φSa3 ms, φSa3mw, φSa3JH9, φMu3A, φtp310-3, φSa3USA300, φβC-USA300_TCH1516	Ingeruje w proces opsonizacji komórek bakteryjnych poprzez inhibicję konwertazy C3bBb dopełniacza	[47, 49, 59]
Stafylokinaza (<i>sak</i>)	phl3, ph42D, phφC, φN315, φMu50A	Zakłóca fagocytozę komórek bakteryjnych, fibrynolizyna której jest składnikiem ułatwia penetrację komórek gronkowca do tkanek i ich proteolityczny rozkład	[4, 5, 46]
Toksyna 1 zespołu szoku toksycznego, TSST-1 (<i>tstH</i>)	SaPI1, SaPI2, SaPIbov1, SaPI3	Główna toksyna odpowiedzialna za wystąpienie zespołu szoku toksycznego, stymuluje wydzielanie prozapalnych cytokin przez komórki epitelialne	[19, 50, 51]

- Białko inhibitorowe chemotaksji, czyli **CHIPS** (*chemotaxis inhibitory protein*) wiąże się do receptorów C5AR1 i FPR1 neutrofilii obniżając ich aktywność w stosunku do odpowiednio składników dopełniacza C5a oraz formylowanych peptydów [46, 50, 60, 63].
- Gronkowcowy inhibitor dopełniacza, **SCIN** (*staphylococcal complement inhibitor*) o działaniu przeciwfagocytarnym kodowany przez gen *scn*. Inhibitor SCIN zakłóca proces opsonizacji komórek bakteryjnych przez wiązanie oraz inhibicję konwertazy C3bBb dopełniacza [48, 50, 60].
- Leukocydyna Panton'a-Valentina'a, **PVL** (*the Panton-Valentine leukocidin*) jest toksyną dwupodjednostkową będącą produktem genów *lukS* i *lukF* kodowanych na bakteriofagu PVL. Białka LukS i LukF tworzą razem kanały w poprzek błony ssaczych leukocytów powodując ich lizę. Podczas infekcji ekspresja PVL stymuluje neutrofile do podniesionej produkcji czynników prozapalnych [35]. Tak wywołana ostra odpowiedź zapalna prowadzi ostatecznie do nekrozy tkanek. Toksyna PVL uważana jest za jeden z najgroźniejszych gronkowcowych czynników wirulencji ponieważ

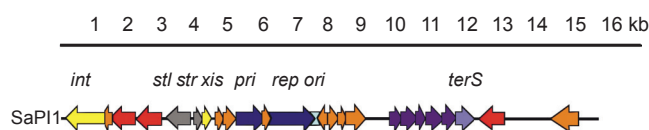
wiąże się z podniesionym ryzykiem transmisji, komplikacji leczenia i hospitalizacji [15, 17, 27, 64].

- **Stafylokinaza** będąca produktem genu *sak* jest odpowiedzialna za usuwanie na drodze cięcia proteolitycznego przeciwciał IgG oraz C3b dopełniacza z powierzchni komórki bakteryjnej kolidując z procesem fagocytozy [47]. Powstanie kompleksu stafylokinazy z plazminogenem prowadzi do powstania aktywnej fibrynolizyny, enzymu proteolitycznego o szerokim spektrum działania, ułatwiającego penetrację komórek gronkowca do sąsiednich tkanek oraz ich destrukcję podczas infekcji [4].
- **Eksfoliatyna A** (*exfoliative toxin A*) jest wydzielaną zewnątrzkomórkowo toksyną odpowiedzialną za występowanie objawów towarzyszących gronkowcowemu złuszcżającemu zapaleniu skóry, w skrócie SSSS (*staphylococcal scalded skin syndrome*) [6, 30].
- **Enterotoksyny P** (*sep*), **A** (*sea*), **K** (*sek*), **K2** (*sek2*) i **G** (*seg*) to toksyny, posiadające właściwości superantygenu, zaangażowane w występowanie objawów gronkowcowego zatrucia pokarmowego [1].

Lizogenizacja może powodować utratę ekspresji funkcjonalnych białek jeśli bakteriofag integruje w obrębie sekwencji kodujących na chromosomie, co nazywane jest negatywną konwersją lizogeniczną. Przykładem może być występowanie fenotypów z brakiem produkcji lipazy lub β -toksyny po integracji odpowiednio profagów L54a i ϕ 13, do chromosomu *S. aureus* [12]. Profag transdukujący gen kodujący CHIPS, czyli *chp*, zawiera również w swoim genomie geny dla stafylokinazy (*sak*), enterotoksyny A (*entA*) oraz eliminuje ekspresję β -hemolizyny (*Hlb*) poprzez inaktywację insercyjną genu [63]. Zjawisko równoczesnej konwersji lizogenicznej pozytywnej i negatywnej opisano również dla fenotypu *sak*+, *entA*+ przy braku p-lizyny [13]. Podsumowując, większość czynników wirulencji rozprzestrzenia się w obrębie rodzaju *Staphylococcus* na drodze specyficznej transdukcji bakteriofagowej. Dopiero niedawno odkryto bezpośredni związek między transdukcją ogólną a specyficznym rozprzestrzenianiem się chromosomowych determinant patogenności [53, 59].

3. Gronkowcowe wyspy patogenności SaPIs (*staphylococcal pathogenicity islands*)

Gronkowcowe wyspy patogenności, SaPIs, stanowią dużą i stosunkowo spójną rodzinę elementów genetycznych o wielkości od 15-kpz do 27-kpz, których przedstawiciele odkryto pierwotnie w gatunku *S. aureus*. Jednakże znajdują się również w genomach innych Gram-dodatnich bakterii z rodzajów *Staphylococcus* oraz *Lactococcus* [43, 49]. Wyspy patogenności, PI (*pathogenicity island*) są często oskrzydłone przez sekwencje repetytywne takie jak elementy insercyjne (IS). Mogą



Rys. 1. Schemat organizacji genetycznej gronkowcowej wyspy SaPI1. Poszczególnym genom nadano kolory i orientację zgodnie z ich funkcją. Geny odpowiedzialne za wycięcie i integrację *int* i *xis* (żółte), regulatory transkrypcji (szare), geny odpowiedzialne za replikację (granatowe), początek startu replikacji (turkusowy), geny wpływające na enkapsydację (ciemnofioletowe), mała podjednostka terminazy *terS* (jasnofioletowy), superantygeny oraz inne geny konwersji lizogennej (czerwone), geny o nieznanym celu (pomarańczowe).

także zawierać geny o sekwencji podobnej do genu *int*, kodującego fagową integrazę.

Właśnie z powodu sąsiedztwa sekwencji powtórzonych oraz obecności homologów integrazy przypuszczano, iż wyspy patogenności można zaliczyć do MGE. Jednakże do tej pory cechę mobilności udało się w pełni przypisać jedynie kilku ze znanych wysp gronkowcowych, których horyzontalny transfer zachodzi na drodze transdukcji bakteriofagowej. Najdokładniej opisaną ruchomą gronkowcową wyspą patogenności spośród siedemnastu odkrytych, jest jak do tej pory SaPI1 [43]. W obrębie sekwencji wysp SaPI opisano również geny kodujące czynniki wirulencji, oto ich krótkie charakterystyki:

- **Toksyna zespołu szoku toksycznego 1**, TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin-1*) jest najczęstszą przyczyną etiologiczną zespołu szoku toksycznego. To potencjalnie śmiertelne ostre zatrucie charakteryzuje się wysoką temperaturą, zaburzeniem czynności wielu narządów wewnętrznych, spadkiem ciśnienia tętniczego krwi oraz złuszczeniem naskórki w fazie rekonwalescencji. Białko TSST-1 podobnie jak inne wydzielane zewnątrzkomórkowo gronkowcowe superantygeny stymuluje wydzielanie prozapalnych cytokin przez komórki epitelialne [19, 51, 54].
- **Enterotoksyna B** (*seb*), **enterotoksyna C** (*sec*), **enterotoksyna Q** (*seq*) oraz **enterotoksyna K** (*sek*) zaangażowane w wystąpienie objawów gronkowcowego zatrucia pokarmowego [1].
- **Białko odpowiedzialne za powstawanie biofilmu** (*bap*) we wnętrzu krowiego wymienia rozprzestrzenianie na gronkowcowych wyspach SaPIbov zidentyfikowanych w szczepach bydłowych [19, 55, 58].
- **Swoiste względem gospodarza białko wiążące czynnik von Willebranda**, vWBp (*von Willebrand binding protein*). W nowo opisanej gronkowcowej wyspie patogenności SaPIbov2 oraz trzech innych SaPIs, wyizolowanych z bydłowych i końskich szczepów klonalnego kompleksu CC133, zidentyfikowano sekwencję białek vWBps będących wariantem genomowego genu białka vWBp. Obecność wyspy SaPI kodującej wariant vWBp pozwala komórkom gronkowcowym na koagulację osocza bydłowego lub końskiego zgodnie

z rodzajem gospodarza, z którego dany szczep został wyizolowany [20, 21, 62].

Mechanizm wycięcia kasety SaPIs z chromosomu, przebiegający na drodze specyficznej rekombinacji pomiędzy towarzyszącymi im sekwencjami repetytywnymi jest analogiczny z procesem uwolnienia profaga z genomu jego lizogenu. Do takiego wycięcia może dojść w trzech sytuacjach: po indukcji profaga „pomocniczego” za pośrednictwem systemu SOS, po wnikięciu do komórki bakteriofaga „pomocniczego” nie będącego lizogenem danego szczepu zawierającego SaPI na chromosomie oraz po wnikięciu do komórki bakteryjnej cząstek SaPI i jej faga „pomocniczego” [43]. Ustalono również, iż SaPI mogą zostać uwolnione z chromosomu, lecz nie replikowane, w obecności niektórych fagów gronkowcowych, a dla innych podobne procesy nie mają w ogóle miejsca [49]. Wycięty fragment bakteryjnego genomu jest następnie replikowany z wykorzystaniem aparatu molekularnego faga z bardzo wysoką wydajnością. Powstaje dużo więcej kopii SaPI niż genomu wirusa. W przypadku infekcji fagiem 80 α nosiciela wyspy SaPII, zaobserwowano powstawanie dwóch typów cząstek transdukcyjnych, o średnicy główek 48 μ m, będących w stanie generować łyśinki oraz cząstek o główkach średnicy 35 μ m, które własności takiej nie posiadają. Dowiedziono, iż oba te rodzaje zbudowane są z takich samych kapsomerów, kodowanych przez genom fagowy [53, 54, 55]. Przypuszcza się, iż to geny znajdujące się w obrębie gronkowcowej wyspy patogenności są w stanie kierować na swoją korzyść przebiegiem replikacji DNA oraz dopasowywać rozmiar kapsydów do długości przenoszonego materiału genetycznego, co zapewnia to genomowi wyspy znaczną przewagę w ekspansji [54]. Ponadto wysoki odsetek nowo zreplikowanych cząstek SaPII nie zostaje nigdy spakowany do kapsydów i po lizie komórki zostaje uwolniony do środowiska, skąd jako wolny DNA teoretycznie może zostać pobrany przez komórki bakteryjne na drodze transformacji. Wydaje się jednak, iż cząsteczki SaPI, które po amplifikacji znajdują się w multimerycznej formie zwanej linearnym konkaterem, mogą uzyskać funkcjonalność dopiero po monomeryzacji i spakowaniu do kapsomerów przez fagowy moduł pakujący [56].

Po przedostaniu się do wnętrza komórki gronkowcowej, wyspa zostaje wbudowana w swoistym dla siebie miejscu att_c w chromosomie z udziałem kodowanego przez siebie homologa integrazy [49]. Horyzontalny transfer wyspy SaPII zachodzący z wysoką wydajnością na drodze zmodyfikowanej transdukcji oraz transformacji może być przyczyną postępującego rozprzestrzenienia genów toksyn szoku toksycznego, np. TSST-1 i superantygenów w obrębie gatunku *S. aureus* [52]. Ponadto SaPIbov1 może ulec transdukcji do gatunków innych gronkowców, a mianowicie do *S. chromogenes*, *S. intermedius*, *S. xylosus* i *S. epidermidis* [45]. Zaobser-

wowano również transfer wysp SaPI1 i SaPIbov1 towarzyszący indukcji profagów z komórek bakterii *S. aureus* do gatunku *Listeria monocytogenes*, który zachodził spontanicznie w surowym krowim mleku [11]. Ten międzyrodzajowy transfer MGE niosących geny determinant patogenności jest zjawiskiem bardzo niepokojącym zarówno z punktu widzenia medycyny człowieka jak i medycyny weterynaryjnej. Jednakże podczas terapii infekcji bakteryjnych można także w inny sposób przyczynić się do rozprzestrzeniania się bakteriofagowych i bakteryjnych genów.

4. Wpływ antybiotyków na odpowiedź SOS i indukcję bakteriofagów

Wspomniano powyżej, iż gronkowcowe wyspy patogenności SaPI mogą ulec wycięciu z chromosomu po indukcji profagów przez system SOS. Jest to globalna odpowiedź komórki bakteryjnej na uszkodzenia DNA, prowadząca do podniesienia poziomu ekspresji genów odpowiedzialnych za procesy naprawcze oraz promujące przetrwanie komórki bakteryjnej w niesprzyjających warunkach [14]. Odpowiedź SOS odbywa się za sprawą dwóch białek LexA i RecA. Białko LexA jest represorem ekspresji genów regulujących odpowiedź SOS, wiążąc się z ich rejonami promotorowymi. Obecność uszkodzeń DNA jest czynnikiem aktywującym białko RecA, które stymuluje autokatalityczne trawienie proteolityczne w rejonie Ala-Gly białka LexA. Proces ten uniemożliwia dalsze wiązanie represora LexA z DNA i tym samym geny SOS mogą ulec transkrypcji i translacji. Gdy uszkodzenia materiału genetycznego ulegną naprawie, zostają zsyntetyzowane nowe cząsteczki białek LexA i RecA, które zatrzymują odpowiedź SOS [36]. Wykazano, iż w komórkach *E. coli* odpowiedź SOS indukowana jest zarówno przez antybiotyki zaburzające syntezę ściany komórkowej (β -laktamy) jak i przebieg replikacji DNA (fluorochinolony). Bakteriobójcze działanie antybiotyki z grupy β -laktamów wynika głównie z ich oddziaływania na transmembranowe białka wiążące penicylinę PBPs (*penicillin binding proteins* 3), które prowadzi do zatrzymania syntezy ściany komórkowej i utratę jej ciągłości [41]. Ponadto inaktywując produkt genu *ftsI*, którym jest białko nr 3 wiążące penicylinę, PBP3 aktywują odpowiedź SOS poprzez zwiększenie ekspresji dwu podjednostkowego systemu transkrypcyjnego DpiBA. Białko DpiA, będące efektem, odpowiada za prawidłowy przebieg transkrypcji oraz replikacji DNA, lecz jego nad-produkcja w komórce prowadzi do generowania mutacji, zaprzestania replikacji materiału genetycznego i tym samym do indukcji systemu SOS [41]. Antybiotyki florochinolowe po przedostaniu się do wnętrza komórki bakteryjnej hamują dwa kluczowe dla replikacji DNA enzymy: gyrazę oraz topoizomerazę IV

odpowiedzialne za odpowiednio tworzenie/usuwanie superskrętów helisy oraz rozdział matczynej i potomnej nici DNA po replikacji [24]. Następujące w efekcie uszkodzenia materiału genetycznego i zatrzymanie podziału komórki prowadzą bezpośrednio do uruchomienia systemu SOS, a ostatecznie jeśli systemy naprawcze zawiodą do śmierci komórki.

Zastosowanie antybiotyków z grupy β -laktamów oraz fluorochinolonów indukując odpowiedź SOS promuje jednocześnie wyjście profagów ze stanu utajenia. Dochodzi do replikacji genomu wirusowego oraz tym samym amplifikacji kodowanych na nim genów, w tym genów konwersji lizogenicznej [34, 44]. Zastosowanie antybiotyków z grupy fluorochinolonów w terapii syndromu hemolityczno-mocznicowego, spowodowanego produkcją toksyny Shiga przez szczep *E. coli* H57:0157 [22], poważnie pogarsza objawy i może doprowadzić do śmierci pacjenta [34, 44, 61]. Podobne zjawisko obserwowano dla gronkowcowych szczepów niosących na chromosomie wyspy SaPII, SaPIbov1 oraz SaPIbov3, które poddane były wpływowi ampicyliny, penicyliny (β -laktamy), cyprofloksacyny (fluorochinolon) lub mitomycyny C w stężeniach podprogowych (*subinhibitory concentration*) [23, 57]. Jak do tej pory brak doniesień by kuracja antybiotykowa pogarszała stan pacjentów z syndromem szoku toksycznego lub innymi objawami powodowanymi przez geny kodowane na SaPIs, lecz nie można wykluczyć takiej możliwości.

5. Podsumowanie

Podsumowując, bakteriofagi bezpośrednio drogą konwersji lizogennej oraz pośrednio uczestnicząc w rozprzestrzenianiu wysp patogenności przyczyniają się do powstawania zmienności oraz powstawania wysoce wirulentnych szczepów gronkowca złocistego. Niedawne doniesienie o pojawieniu się szczepu z ekspresją zarówno toksyn TSST-1 oraz leukocydyny Panton'a-Valentín'a potwierdza wyżej postawioną tezę [32]. Oprócz czynników patogenności bakteriofagi i inne MGE silnie wpływają na dostosowanie gatunku *S. aureus* do gospodarza zarówno ludzkiego jak do zwierząt domowych i gospodarskich poprzez dostarczenie nowych informacji genetycznych lub ułatwienie utraty DNA zbędnego w nowej niszy ekologicznej [18, 38]. Śledzenie dynamiki koewolucji gronkowców oraz infekujących je wirusów na pewno pozostanie jeszcze długo jednym z największych zadań współczesnej mikrobiologii i epidemiologii.

Podziękowanie

Publikacja została przygotowana podczas realizacji projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, NCN nr N N401 017740.

Piśmiennictwo

- Argudín M.A., Mendoza M.C., Rodicio M.R.: Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, **2**, 1751–1773 (2010)
- Baba T., K. Hiramatsu i wsp.: Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, **359**, 1819–1827 (2002)
- Blair J. E., Carr M.: Lysogeny in staphylococci. *J. Bacteriol.* **82**, 984–993 (1961)
- Bokarewa M.I., Jin T., Tarkowski A.: *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 504–509 (2006)
- Brüssow H., Canchaya C., Hardt W.D.: Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 560–602 (2004)
- Bukowski M., Władyka B., Dubin G.: Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, **2**, 1148–1165 (2010)
- Bushman F., Lateral DNA Transfer. Cold Spring Harbor. New York: CSH Laboratory Press, 2002
- Canchaya C., Fournous G., Brüssow H.: The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol. Microbiol.* **53**, 9–18 (2004)
- Canchaya C., Fournous G., Chibani-Chennoufi S., Dillmann M.L., Brüssow H.: Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 417–424 (2003)
- Canchaya C., Proux C., Fournous G., Bruttin A., Brüssow H.: Prophage genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 238–276 (2003)
- Chen J., Novick R.P.: Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science*, **323**, 139–141 (2009)
- Coleman D., Knights J., Russell R., Shanley D., Birkbeck T.H., Dougan G., Charles I.: Insertional inactivation of the *Staphylococcus aureus* β -toxin by bacteriophage phi 13 occurs by site- and orientation-specific integration of the phi 13 genome. *Mol. Microbiol.* **5**, 933–939 (1991)
- Coleman D.C., Sullivan D.J., Russell R.J., Arbutnott J.P., Carey B.F., Pomeroy H.M.: *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 1679–1697 (1989)
- Courcelle J., Khodursky A., Peter B., Brown P.O., Hanawalt P.C. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, **158**, 41–64 (2001)
- Diep B.A., Otto M.: The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol.* **16**, 361–369 (2008)
- Feng Y., Chen C.J., Su L.H., Hu S., Yu J., Chiu C.H.: Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 23–37 (2008)
- Finck-Barbançon V., Duportail G., Meunier O., Colin D.A.: Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1182**, 275–282 (1993)
- Fitzgerald J.R.: Human origin for livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio.* **3**, e00082–12 (2012)
- Fitzgerald J.R., Monday S.R., Foster T.J., Bohach G.A., Hartigan P.J., Meaney W.J., Smyth C.J.: Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J. Bacteriol.* **183**, 63–70 (2001)

20. Guinane C.M., J.R. Fitzgerald i wsp.: Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus* reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. *Genome Biol. Evol.* **2**, 454–466 (2010)
21. Guinane C.M., Penadés J.R., Fitzgerald J.R.: The role of horizontal gene transfer in *Staphylococcus aureus* host adaptation. *Virulence*, **2**, 241–243 (2011)
22. Gyles C.L.: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* **85** (13 Suppl), E45–62 (2007)
23. Hastings P.J., Rosenberg S.M., Slack A.: Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.* **12**, 401–404 (2004)
24. Hooper, D. C.: Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis.* **7**, 337–341 (2001)
25. Iandolo J.J., V. Worrell i wsp.: Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. *Gene* **289**, 109–118 (2002)
26. Jagustyn-Kryniecka E. K., Molekularne podstawy bakteryjnej patogeny (w) *Biologia molekularna bakterii*, (red.) Baj J., Markiewicz Z., PWN, Warszawa 2005.
27. Kaneko J., Kimura T., Narita S., Tomita T., Kamio Y.: Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene*, **215**, 57–67 (1998)
28. Kropinski A.M.: Phage Therapy – Everything Old is New Again. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **17**, 297–306 (2006)
29. Kuroda M., T. Ohta.: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**, 1225–1240 (2001)
30. Ladhani S., Joannou C.L., Lochrie D.P., Evans R.W., Poston S.M.: Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 224–242 (1999)
31. Le Maréchal C., le Loir Y. i wsp.: Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One*, **6**, e27354 (2011)
32. Li Z., Stevens D.L., Hamilton S.M., Parimon T., Ma Y., Kearns A.M., Ellis R.W., Bryant A.E.: Fatal *S. aureus* hemorrhagic pneumonia: genetic analysis of a unique clinical isolate producing both PVL and TSST-1. *PLoS One*, **6**, e2724 (2011)
33. Lindsay J., Holden M.T.G.: *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends microbiol* **12**, 378–385 (2004)
34. Łoś J.M., Łoś M., Węgrzyn G.: Bacteriophages carrying Shiga toxin genes: genomic variations, detection and potential treatment of pathogenic bacteria. *Future Microbiol.* **6**, 909–924 (2011)
35. Ma X., Chang W., Zhang C., Zhou X., Yu F.: Staphylococcal panton-valentine leukocidin induces pro-inflammatory cytokine production and nuclear factor-kappa B activation in neutrophils. *PLoS One*, **7**, e34970 (2012)
36. Maiques E., Ubeda C., Campoy S., Salvador N., Lasa I., Novick R.P., Barbé J., Penadés J.R.: β -lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**, 2726–2729 (2006)
37. Małachowa N., DeLeo F.R.: Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3057–3071 (2010)
38. McCarthy A.J., Witney A.A., Gould K.A., Moodley A., Guardabassi L., Voss A., Denis O., Broens E.M., Hinds J., Lindsay J.A.: The distribution of mobile genetic elements (MGEs) in MRSA CC398 is associated with both host and country. *Genome Biol. Evol.* **3**, 1164–1174 (2011)
39. Międzobrodzki J., Małachowa N., Markiewski T., Białecka A., Kasprowicz A.: Różnicowanie izolatów *Staphylococcus aureus* w oparciu o cechy fenotypowe. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **62**, 322–327 (2008)
40. Międzobrodzki R., Fortuna W., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **61**, 461–465 (2007)
41. Miller C.L., L.E. Thomsen i wsp.: SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science (New York, N.Y.)* **305**, 1629–1631 (2004)
42. Morikawa K., Inose Y., Okamura H., Maruyama A., Hayashi H., Takeyasu K., Ohta T.A.: New staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes. *Gen. Cell.* **8**, 699–712 (2003)
43. Novick R.P., Christie G.E., Penadés J.R.: The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 541–551 (2008)
44. Panos G.Z., Betsi G.I., Falagas M.E.: Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection? *Aliment. Pharmacol. Ther.* **24**, 731–742 (2006)
45. Poliakov A., Chang J.R., Spilman M.S., Damle P.K., Christie G.E., Mobley J.A., Dokland T.: Capsid size determination by *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPI1 involves specific incorporation of SaPI1 proteins into procapsids. *J. Mol. Biol.* **380**, 465–475 (2008)
46. Postma B., M.J. Poppelier.: Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* binds specifically to the C5a and formylated peptide receptor. *J. Immunol.* **172**, 6994–7001 (2004)
47. Rooijackers S. H., van Kessel K. P., van Strijp J.A.: Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol.* **13**, 596–601 (2005)
48. Rooijackers S.H., Ruyken, M. et al.: Immune evasion by astaphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Natl. Immunol.* **6**, 920–927 (2005)
49. Ruzin A., Lindsay J., Novick R.P.: Molecular genetics of SaPI1 – a mobile pathogenicity island of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**, 365–377 (2001)
50. Serruto D., Rappuoli R., Scarselli M., Gros P., van Strijp J.A.G.: Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. *Natl. Rev. Microbiol.* **8**, 393–399 (2010)
51. Schaefer M.M., L.M. Breshears i wsp.: Epithelial Proinflammatory Response and Curcumin-Mediated Protection from Staphylococcal Toxic Shock Syndrome Toxin-1. *PLoS One*, **7**, e32813 (2012)
52. Subedi A., Ubeda C., Adhikari R.P., Penadés J.R., Novick R.P.: Sequence analysis reveals genetic exchanges and intraspecific spread of SaPI2, a pathogenicity island involved in menstrual toxic shock. *Microbiology*, **153**, 3235–3245 (2007)
53. Tallent S.M., Langston T.B., Moran R.G., Christie G.E.: Transducing particles of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPI1 are comprised of helper phage-encoded proteins. *J. Bacteriol.* **189**, 7520–7524 (2007)
54. Tormo M.A., Ferrer M.D., Maiques E., Ubeda C., Selva L., Lasa I., Calvete J.J., Novick R.P., Penadés J.R.: *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. *J. Bacteriol.* **190**, 2434–2440 (2008)
55. Tormo-Más M.A., Mir I., Shrestha A., Tallent S.M., Campoy S., Lasa I., Barbé J., Novick R.P., Christie G.E., Penadés J.R.: Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature*, **465**, 779–782 (2010)
56. Ubeda C., Barry P., Penadés J.R., Novick R.P.: A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 14182–14188 (2007)
57. Ubeda C., Maiques E., Knecht E., Lasa I., Novick R.P., Penadés J.R.: Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol. Microbiol.* **56**, 836–844 (2005)

58. Úbeda C., M.A. Tormo i wsp.: Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol. Microbiol.* **49**, 193–210 (2003)
59. Wagner P.L., Waldor M.K.: Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infect. Immunol.* **70**, 3985–3993 (2002)
60. Wamel W. J.B.V., Rooijackers S.H.M., Ruyken M., Kessel K.P.M., van Strijp J.A.G.: The Innate Immune Modulators Staphylococcal Complement Inhibitor and Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* Are Located on β -Hemolysin-Converting Bacteriophages. *J Immunol.* **188**, 1310–1315 (2006)
61. Wong C.S., Jelacic S., Habeeb R.L., Watkins S.L., Tarr P.I.: The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1930–1936 (2000)
62. Viana D., J.R. Penadés i wsp.: Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. *Mol. Microbiol.* **77**, 1583–1594 (2010)
63. Veldkamp K. E., Heezius H.C., Verhoef J., van Strijp J.A., van Kessel K.P.: Modulation of neutrophil chemokine receptors by *Staphylococcus aureus* supernate. *Infect. Immunol.* **68**, 5908–5913 (2000)
64. Voyich J.M., M. Otto i wsp.: Is Pantone-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J Infect Dis.* **194**, 1761–1770 (2006)

Monika Bigos^{1*}, Monika Łysakowska¹, Małgorzata Wasieła¹

¹Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Sanitarnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Pl. Hallera 1, 90-647 Łódź

Wpłynęło w grudniu 2011 r.

1. Wstęp. 2. Czynniki zjadliwości *S. agalactiae*. 3. Epidemiologia zakażeń *S. agalactiae*. 4. Chorobotwórczość *S. agalactiae*. 5. Lekowrażliwość szczepów *S. agalactiae*. 6. Diagnostyka nosicielstwa GBS. 7. Okołoporodowa profilaktyka antybiotykowa. 8. Immunoprofilaktyka zakażeń GBS. 9. Uwagi końcowe

Perinatal infections caused by *Streptococcus agalactiae*

Abstract: *Streptococcus agalactiae* are Gram-positive β -haemolytic bacteria belonging to group B streptococci (GBS), according to Rebecca Lancefield's classification. They are commensals that colonize the distal parts of gastrointestinal, urinary, and genital tracts of healthy people. An increasing level of the pregnant women colonization by GBS was noted in the last decade. This raises a really high concern over the risk of severe perinatal infections among newborns since GBS are easily transmitted from mother being a *S. agalactiae* carrier to her child during delivery. Pneumonia, meningitis, bacteraemia, and sepsis are the most serious consequences of GBS infections in newborns. Moreover, the mortality rate among neonates infected with *S. agalactiae* reaches 20%. The microbiological screening for the GBS carriage among women being in 35–37 weeks of pregnancy are obligatory in Poland, starting from April, the 8th, 2011. This paper is a review of current knowledge about GBS pathogenicity and epidemiology. The issues concerning the diagnostics of *S. agalactiae* carriage among pregnant women and the perinatal antibiotic prophylaxis are also presented.

1. Introduction. 2. *S. agalactiae* virulence factors. 3. Epidemiology of *S. agalactiae* infections. 4. Pathogenicity of *S. agalactiae*. 5. Drug susceptibility of *S. agalactiae* strains. 6. Diagnostics of GBS carriage. 7. Perinatal antibiotic prophylaxis. 8. Immunoprophyllaxis of GBS infections. 9. Final remarks

Słowa kluczowe: GBS, infekcje okołoporodowe, *Streptococcus agalactiae*

Key words: GBS, perinatal infections, *Streptococcus agalactiae*

1. Wstęp

Streptococcus agalactiae jest Gram-dodatni bakterią β -hemolizującą zaliczaną do grupy B paciorkowców klasyfikowanych wg schematu Lancefield (Group B *Streptococcus*, GBS). Drobnoustroje te są komensalnymi kolonizującymi dystalne części układu pokarmowego i moczowo-płciowego zdrowych ludzi. Często zasiedlają również środowisko pochwy.

Jeśli ich nosicielką jest kobieta ciężarna, to istnieje duże, szacowane na 70%, ryzyko transmisji wertykalnej tych patogenów. *S. agalactiae* jest jednym z najważniejszych czynników etiologicznych zakażeń występujących w trakcie akcji porodowej na skutek kontaktu błon śluzowych noworodka z drobnoustrojami obecnymi w drogach rodnych matki. Wśród najpoważniejszych konsekwencji kolonizacji organizmu noworodka bakteriami GBS wymieniać należy infekcje dolnego odcinka układu oddechowego z następową bakteremią, posocznicą oraz zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych. Spośród 1000 żywo urodzonych dzieci zakażenia spowodowane przez *S. agalactiae* występują u 2–4 noworodków, a śmiertelność w tej grupie pacjentów sięga

nawet 20%. GBS mogą także stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia rodzącej.

Wytyczne dotyczące badania nosicielstwa GBS w drogach rodnych kobiet ciężarnych zostały sformułowane przez CDC (Centers for Disease Control and Prevention) w latach 90-tych ubiegłego stulecia, co przyczyniło się do znacznej poprawy sytuacji epidemiologicznej w zakresie zakażeń GBS u noworodków na świecie.

Mimo to omawiane bakterie nadal pozostają ważnym czynnikiem etiologicznym infekcji okołoporodowych z wszelkimi ich konsekwencjami. W Polsce, począwszy od 8 kwietnia bieżącego roku, istnieje obowiązek badania nosicielstwa *S. agalactiae* wśród kobiet ciężarnych.

W obliczu przytoczonych argumentów postanowiono dokonać przeglądu piśmiennictwa w celu przybliżenia Czytelnikowi wiedzy na temat chorobotwórczości i epidemiologii zakażeń *S. agalactiae*. Uwzględniono również zagadnienia dotyczące diagnostyki nosicielstwa GBS u kobiet ciężarnych oraz zasad okołoporodowej profilaktyki antybiotykowej, a także perspektyw dotyczących opracowania efektywnej szczepionki skierowanej przeciw infekcjom GBS.

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Lekarskiej i Sanitarnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Pl. Hallera 1, 90-647 Łódź

2. Czynniki zjadliwości *S. agalactiae*

Do najistotniejszych czynników wirulencji *S. agalactiae* należą: otoczka, białka o aktywności enzymatycznej, cytolizyny oraz adhezyne bakteryjne.

Na podstawie różnic w strukturze wielocukrów otoczkowych oraz białkowego antygeny C, wykazujących grupową swoistość, wśród szczepów *S. agalactiae* można wyróżnić 10 typów serologicznych oznaczonych jako Ia, Ib oraz II–IX. Metodę klasyfikacji serologicznej paciorkowców zaproponowała w 1934 roku Rebeka Lanefield [53]. W skład wielocukrów otoczkowych GBS wchodzi D-galaktoza, D-glukoza, N-acetylo-D-glukozaamina, kwas sialowy oraz krótkie, powtarzające się sekwencje 4–7 cukrów prostych [47, 84]. Trudności z oznaczeniem serotypu występują w przypadku ok. 7% szczepów GBS, jednak odsetek ów może sięgać nawet 32% [47, 74].

Częstość występowania poszczególnych serotypów otoczkowych *S. agalactiae* zależna jest od miejsca i czasu. W Europie i Ameryce Północnej dominują serotypy I, II, III i V [3, 25, 27, 47]. W Japonii w latach 90-tych stosunkowo często izolowano serotypy VI i VIII. Obecnie najczęściej występują tam serotypy I, III i V [61, 63]. Serotypy Ia, II, III i V są ważnym czynnikiem etiologicznym infekcji przede wszystkim u noworodków oraz kobiet ciężarnych [33, 69]. Coraz częściej izoluje się je także z zakażeń inwazyjnych u osób w podeszłym wieku [20, 22].

Polimery otoczkowe stanowią istotny czynnik zjadliwości GBS. Ich wirulencja wynika głównie z obecności kwasu sialowego, który utrudnia prawidłowe zajście procesu fagocytozy poprzez hamowanie opsonizacji komórek bakteryjnych składową C3 układu dopełniacza. GBS są jedynymi, opisanymi dotychczas, Gram-dodatnimi producentami kwasu sialowego. Hydroliza otoczki zbudowanej z polimerów kwasu sialowego przy użyciu neuraminidazy prowadzi do aktywacji układu dopełniacza na drodze alternatywnej, opsonizacji, fagocytozy i wewnątrzkomórkowego zabicia bakterii [13, 25]. Przeciwciała opsonizujące skierowane przeciwko wielocukrom otoczkowym *S. agalactiae* są serotypowo specyficzne. Brak matczynych immunoglobulin jest potwierdzonym czynnikiem ryzyka zakażeń o etiologii GBS u noworodków [56].

Do czynników zjadliwości GBS należą także enzymy: peptydaza białka C5a układu dopełniacza oraz liaza kwasu hialuronowego. Pierwszy z nich, poza rozkładem białka C5a – atraktantu dla komórek zapalnych, wydzielanego m.in. przez komórki nabłonkowe pęcherzyków płucnych – służy również jako bakteryjna adhezyna (poprzez wiązanie z fibronektyną) i inwazyjna [6, 8]. Aktywność enzymu zależy od obecności grupowo swoistego otoczkowego antygeny B. Peptydaza C5a jest produkowana także przez szczepy grup A i G paciorkow-

ców β -hemolizujących [5]. Liaza kwasu hialuronowego umożliwia rozprzestrzenianie się zakażenia o etiologii GBS poprzez rozkład kwasu hialuronowego obecnego w szczególnie dużym stężeniu w tkankach łożyskowych, płodowych i w płynie owodniowym [73].

Cytolizyny wydzielane przez GBS mają zdolność tworzenia porów w komórkach nabłonka i śródbłonka pęcherzyków płucnych *in vitro*, co wskazuje na ich znaczącą rolę w rozwoju zapalenia płuc u noworodków [36].

Kolonizacja tkanek człowieka przez GBS jest możliwa dzięki obecności licznych adhezyn obecnych na powierzchni komórek bakteryjnych; procesowi temu sprzyja niskie pH pochwy. Rolę adhezyn pełnią m.in. kwasy lipotejchajowe ściany komórkowej *S. agalactiae*, wykazujące także cytotoksyczność w stosunku do ludzkich embrionalnych komórek mózgowych oraz komórek owodniowych w hodowlach tkankowych [21, 35]. Wśród powierzchniowych białek adhezyjnych GBS wymienić należy również: Ca i C β , Alp1, Alp2 i Alp3 oraz Rib. Cechują się one silnymi właściwościami antygenowymi, stymulując produkcję swoistych przeciwciał. Zjawisko to próbuje się wykorzystać w pracach nad skuteczną szczepionką przeciw zakażeniom o etiologii GBS [62]. Antygen C może odgrywać szczególną rolę we wnikanii patogenów do komórek nabłonka szyjki macicy poprzez wiązanie się z ich powierzchniowymi glukoaminoglikanami w mechanizmie zależnym od aktywności [4].

Na powierzchni komórek GBS wykryto obecność struktur podobnych do fimbrii, zbudowanych z antygenów wyzwalających swoistą odpowiedź w modelu szczurzym. Antygeny te umożliwiają adhezję do nabłonka drobnych naczyń krwionośnych mózgu oraz pneumocytów [52, 58].

3. Epidemiologia zakażeń *S. agalactiae*

Szacuje się, iż 10–30% zdrowych kobiet bez objawów toczącego się procesu zapalnego jest nosicielkami GBS [3, 18]. Bakterie najczęściej kolonizują pochwę i odbył. Podstawowy rezerwuuar GBS stanowi jednak dolny odcinek przewodu pokarmowego, a ich obecność w pochwie może świadczyć o zanieczyszczeniu z odbytu. U ok. 60% kobiet ciężarnych jest to kolonizacja okresowa. Jeśli zjawisko kolonizacji GBS występuje w przebiegu pierwszej ciąży, to jego nawrót w trakcie każdej kolejnej ciąży jest wysoce prawdopodobny [16, 88].

Wykazano ochronną rolę naturalnej flory bakteryjnej pochwy przed kolonizacją GBS [55]. Potwierdzono horyzontalną transmisję GBS drogą seksualną. Bakterie izolowano także z gardła oraz układu moczowo-płciowego mężczyzn [60].

Wśród czynników predysponujących do kolonizacji dróg moczowo-płciowych paciorkowcami grupy B

u kobiet ciężarnych wymienia się wysoki wskaźnik BMI (Body Mass Index). Kolonizacja występuje również częściej u kobiet rasy czarnej, a także kobiet pracujących w służbach medycznych [86]. Wg Seoud i wsp. [81], takie czynniki jak: wiek, status ekonomiczny, poród przedterminowy oraz gorączka śródporodowa, nie mają wpływu na ryzyko kolonizacji organizmu kobiety ciężarnej paciorkowcami grupy B. Wyniki badań Kovavisarach i wsp. [49] wskazują jednak na wzrost ryzyka kolonizacji bakteriami GBS wraz z wiekiem kobiety ciężarnej.

Częstość kolonizacji paciorkowcami grupy B wśród ciężarnych szacuje się na 3–35% [3, 24, 61, 90]. W Europie Wschodniej, Europie Zachodniej, Skandynawii i Europie Południowej odsetki kolonizacji pochwy bakteriami GBS wynoszą odpowiednio: 19,7–29,3%, 11–21%, 24,3–36% i 6,5–32% [3]. Na podstawie stosunkowo niewielu danych z Polski wynika, iż odsetek kobiet skolonizowanych GBS oscyluje wokół 20% [50, 51, 87].

Kraśnianin i wsp. [51] badali częstość nosicielstwa GBS u 100 rodzących kobiet. Nosicielką szczepów GBS była co piąta rodząca. Ponadto, wyniki badań pozwoliły ustalić, że ryzyko transmisji *S. agalactiae* z matki na noworodka wynosi 21%.

W jednym z krakowskich szpitali uniwersyteckich przebadano 340 ciężarnych na obecność GBS w drogach rodnych: nosicielkami szczepów GBS było 20% kobiet z ciążą zagrożoną oraz 17,2% kobiet z fizjologicznym przebiegiem ciąży. Częstość kolonizacji noworodków z ciąż wysokiego ryzyka wynosiła 35%, natomiast z ciąż prawidłowych 26,7% [12, 87].

W wyniku badań przeprowadzonych w latach 2001–2002 w Klinice Położnictwa i Ginekologii Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie na grupie 1678 kobiet ciężarnych, nosicielstwo GBS stwierdzono u 331 pacjentek, co stanowiło 19,7% [50]. Kolonizację *S. agalactiae* wykryto u 70 spośród 203 noworodków urodzonych przez kobiety będące nosicielkami GBS. Wczesne objawy zakażenia wystąpiły u jednego dziecka.

Kolonizacja pochwy jest zwykle bezobjawowa i ma charakter okresowy, stały lub nawracający [30]. Bogato-objawowe zapalenie pochwy, wymagające leczenia skierowanego przeciw GBS, występuje rzadko [37].

Obecność GBS w drogach rodnych kobiety w trakcie porodu może prowadzić do zakażeń okołoporodowych. Bakterie, w konsekwencji transmisji wertykalnej, w pierwszej kolejności kolonizują jamę ustną, a następnie układ oddechowy i dalsze odcinki przewodu pokarmowego noworodka. U połowy noworodków ze skolonizowanych matek paciorkowce grupy B kolonizują skórę i błony śluzowe, głównie w następstwie przechodzenia przez kanał rodny, ale także w życiu płodowym. Wśród skolonizowanych noworodków zakażenia o etiologii GBS występują średnio u 1–4 noworodków na 1000 żywych urodzeń [39, 85].

4. Chorobotwórczość *S. agalactiae*

Paciorkowce β -hemolizujące grupy B są głównym czynnikiem etiologicznym zakażeń u noworodków i niemowląt [32, 69]. Infekcje te dzieli się na wczesno-objawowe i późno-objawowe.

Zakażenia wczesno-objawowe pojawiają się z częstością 0,7–6 na 1000 żywych urodzeń i mają związek z nabyciem drobnoustrojów w życiu płodowym lub okołoporodowo. Chociaż niemal połowa noworodków z matek nosicielek GBS zostaje także skolonizowana, to infekcje występują u 2% noworodków [39, 57].

Zakażenie o wczesnym początku, zwykle pojawiające się w ciągu pierwszych pięciu dni życia, manifestuje się bakteriemią, zapaleniem płuc i opon mózgowo-rdzeniowych, a w konsekwencji szokiem septycznym. Połowa przypadków zakażeń GBS dotyczy noworodków donoszonych, jednak wyższe ryzyko zachorowalności i śmiertelności wiąże się z porodem przedwczesnym oraz niską masą urodzeniową. Śmiertelność wśród noworodków donoszonych jest szacowana na 2–8%. U noworodków z zakażeniem wczesno-objawowym bez zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych najczęściej izoluje się serotypy I, II i III *S. agalactiae*. W przypadku przebiegu zakażenia wczesno-objawowego z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych dominuje serotyp V [19].

Do zależnych od matki czynników zwiększających ryzyko zakażenia wczesno-objawowego należą: przedterminowy poród (< 37 tygodnia ciąży), późne przerwanie błon płodowych, bakteriemia poporodowa, zakażenie wód płodowych, wczesne macierzyństwo, a także niski poziom przeciwciał skierowanych przeciwko wielocukrom otoczkowym GBS u ciężarnej. Cesarskie cięcie oraz nienaruszone błony płodowe nie chronią przed transmisją GBS z matki na dziecko [51].

Ryzyko wystąpienia zakażenia wczesno-objawowego u noworodka istotnie zwiększa duża liczebność GBS w pochwie kobiety ciężarnej, potwierdzona wyhodowaniem bakterii z posiewu bezpośredniego (z pominięciem etapu namnażania w podłożu wybiórczym) [75]. Podobnie jest w przypadku masywnej kolonizacji dróg moczowych kobiety ciężarnej, na którą wskazuje znamienna bakteriuria o etiologii GBS, zdiagnozowana w dowolnym trymestrze ciąży [33].

Zakażenia o późnym początku występują z częstością 0,5–1,8 przypadków na 1000 żywych urodzeń. Kliniczne objawy infekcji (gł. bakteriemia z towarzyszącym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych) pojawiają się średnio w ciągu 3–4 tygodni po porodzie. Połowa zakażeń późno-objawowych jest konsekwencją przechodzenia noworodka przez kanał rodny kobiety skolonizowanej GBS. W pozostałych przypadkach są to zakażenia poporodowe: *S. agalactiae* może pochodzić od matki lub innych osób z otoczenia dziecka, skolonizowanych GBS; może mieć także charakter zakażenia szpitalnego.

Odnotowano również przypadki transmisji inwazyjnych szczepów GBS z mlekiem matki [48].

Odsetek śmiertelności wśród noworodków w przypadku infekcji późno-objawowych wynosi 10–15%. U połowy dzieci z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych w przebiegu późno-objawowej infekcji o etiologii GBS wystąpią długotrwałe komplikacje neurologiczne [92].

GBS mogą stanowić zagrożenie także dla kobiety ciężarnej. Bywają bezpośrednim czynnikiem etiologicznym poporodowego zapalenia błony śluzowej macicy, bakteriemii w następstwie cięcia cesarskiego oraz bezobjawowej bakteriurii w przebiegu ciąży i/lub po porodzie [93]. Mogą być przyczyną przedterminowego porodu w wyniku przedwczesnego pęknięcia błon płodowych, gorączki śródporodowej oraz zakażenia jamy owodni [19]. Bakteriuria o etiologii *S. agalactiae* u kobiety ciężarnej dowodzi ciężkiej kolonizacji dróg moczowo-płciowych tymi bakteriami, zwiększającej ryzyko wystąpienia infekcji wczesno-objawowej u noworodka [33].

Oprócz zakażeń u płodów, noworodków i kobiet ciężarnych, GBS wywołują różnego rodzaju infekcje u osób dorosłych. Są czynnikiem etiologicznym zakażeń skóry i tkanek miękkich, kości i stawów, płuc, bakteriemii z następowym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych oraz zapaleniem mięśnia sercowego. Wywołują zapalenie pęcherza moczowego i odmiedniczkowe zapalenie nerek, a także zespół podobny do szoku toksycznego [22, 54, 80, 83].

Wśród najważniejszych czynników predysponujących do inwazyjnych zakażeń bakteriami GBS u osób dorosłych wymienia się cukrzycę, marskość wątroby, udar mózgu, chorobę nowotworową, dysfunkcje i cewnikowanie układu moczowego, choroby układu sercowo-naczyniowego i oddechowego, obecność protez stawowych oraz podeszły wiek (> 65 roku życia) [20, 22, 83].

5. Lekowrażliwość szczepów *S. agalactiae*

W przypadku zakażeń paciorkowcami grupy B największe znaczenie w praktyce klinicznej mają antybiotyki β-laktamowe oraz makrolidy i linkozamidy.

W Stanach Zjednoczonych na skutek wprowadzenia zaleceń dotyczących postępowania okołoporodowego u kobiet ciężarnych zakażonych bakteriami GBS, od początku lat 90-tych ubiegłego stulecia lekami z wyboru pozostają antybiotyki β-laktamowe [91]. Sprawdzone wzorce amerykańskie przyjęły także kraje europejskie, w tym Polska. W zakażeniach o etiologii GBS oraz w ramach antybiotykowej profilaktyki okołoporodowej u kobiet nosicielek z powodzeniem stosuje się penicylinę G, ampicylinę oraz cefazolinę. Szczepy *S. agalactiae* nadal wykazują wrażliwość na wymienione chemioterapeutyki przeciwbakteryjne, mimo powszechnego ich

stosowania [26, 42, 43, 65, 67, 76, 82]. Brak oporności na antybiotyki β-laktamowe wśród szczepów *S. agalactiae* potwierdzają również najnowsze dane opublikowane przez CDC w listopadzie 2010 roku [91].

Od kilku lat pojawiają się doniesienia o izolatach GBS z obniżoną wrażliwością na penicyliny naturalne [40, 45, 46, 64]. Badania D a h e s h i wsp. [17] oraz N a g a n o i wsp. [64] wykazały, iż za podwyższoną tolerancję na penicylinę G wśród szczepów *S. agalactiae* odpowiada mutacja genu PBP2X. U niewielkiego odsetka szczepów *S. agalactiae* zaobserwowano również obniżoną wrażliwość na cefalosporyny I generacji [17]. Dlatego z uwagą należy śledzić tendencje wrażliwości na antybiotyki β-laktamowe wśród klinicznych izolatów GBS.

Makrolidy i linkozamidy są lekami drugiego rzutu w leczeniu zakażeń spowodowanych przez *S. agalactiae* oraz alternatywą w przypadku pacjentów z alergią na antybiotyki β-laktamowe. Szczepy GBS prezentują zwykle konstytutywną bądź indukowaną oporność typu MLS_B (Macrolide-Lincosamide-Streptogramin_B resistance) [26, 29, 78, 82].

Badania G a r l a n d i wsp. [26] przeprowadzone na 1160 inwazyjnych szczepach *S. agalactiae* wykazały ich niską oporność na erytromycynę i klindamycynę (odpowiednio: 6,4% i 4,2%) [26]. Wyższe odsetki oporności prezentowane są przez P a n d a i wsp. [65] (32% szczepów *S. agalactiae* opornych na azytromycynę, 25% – na erytromycynę, 21% – na klindamycynę).

B o r c h a r d t i wsp. [7] porównywali lekowrażliwość inwazyjnych i nieinwazyjnych szczepów GBS. Spośród 486 inwazyjnych szczepów *S. agalactiae* oporność na klindamycynę, erytromycynę oraz na obydwie te antybiotyki jednocześnie stwierdzono odpowiednio u 20%, 24,5% i 19,8% izolatów bakteryjnych. Wśród 167 nieinwazyjnych szczepów *S. agalactiae* 40,7% izolatów było opornych na klindamycynę, 41,9% – na erytromycynę, a 38,3% szczepów wykazywało brak wrażliwości na oba antybiotyki. Zaobserwowane przez badaczy różnice były statystycznie znamienne.

P h a r e s i wsp. [70] przeanalizowali lekowrażliwość 4882 szczepów GBS, z czego 15% izolatów bakteryjnych było opornych na klindamycynę, a 32% – na erytromycynę.

D o g a n i wsp. [20] przedstawili fenotypową i molekularną charakterystykę 135 szczepów *S. agalactiae* (52 izolaty pochodziły od ludzi; 83 – od bydła). Uzyskane wyniki ujawniły wyższą oporność na erytromycynę oraz tetracyklinę wśród szczepów ludzkich (odpowiednio: 26,9% i 84,6%) w porównaniu ze szczepami bydlęcymi (odpowiednio: 3,6% i 14,5%). Autorzy zwrócili szczególną uwagę na możliwość zarówno klonalnej transmisji wysoce opornych szczepów bakteryjnych, jak i na ryzyko horyzontalnego przekazywania genów oporności na makrolidy i tetracykliny pomiędzy ludzkimi i bydlęcymi szczepami GBS.

Podobne spostrzeżenia dotyczące mechanizmów szerzenia się oporności na makrolidy znajdujemy w pracy Gherardi i wsp. [27], przy czym w badaniu tym wykazano oporność na erytromycynę na poziomie 16,5% – wyłącznie wśród szczepów pochodzących od chorych z infekcjami nieinwazyjnymi oraz od nosicieli; ponad 68% szczepów *S. agalactiae* prezentowało brak wrażliwości na tetracykliny.

Oporność na makrolidy i linkozamidy była badana u 169 szczepów GBS izolowanych od ciężarnych nosicielek z terenu miasta Krakowa [10]. Oporność na erytromycynę i klindamycynę stwierdzono odpowiednio u 16% i 10% szczepów. Większość izolatów (63%) prezentowała konstytutywną oporność MLS_B. Indukowany typ oporności MLS_B odnotowano u 26% szczepów. U 11% izolatów wykryto natomiast fenotyp M oporności na makrolidy.

W jednym z badań skandynawskich nie stwierdzono natomiast oporności na makrolidy i linkozamidy; średnią wrażliwość zarejestrowano odpowiednio u 2% i 1% badanych izolatów GBS. W przypadku tego badania uwagę zwraca także wysoki odsetek szczepów *S. agalactiae* opornych na tetracykliny (68%) [68].

Jak dotąd wśród izolatów GBS nie wykrywa się oporności na chinupristinę-dalfopristinę, daptomycynę, linezolid i wankomycynę [26, 65, 67, 76, 82]. W okołoporodowej profilaktyce zakażeń *S. agalactiae* antybiotyki glikopeptydowe powinny być stosowane ostrożnie, z ograniczeniem wyłącznie do ciężarnych prezentujących alergię na penicyliny, od których izolowano szczepy GBS odporne na erytromycynę i klindamycynę. Badania P e l á e z i i wsp. [66] dowodzą, iż lekarze praktycy nie zawsze przestrzegają tej zasady.

6. Diagnostyka nosicielstwa GBS

Noworodki urodzone przez kobiety skolonizowane GBS są bardziej narażone na wystąpienie infekcji o wczesnym początku niż noworodki z matek nie będących nosicielkami GBS – szczególnie, jeśli liczebność populacji bakterii *S. agalactiae* w przedsionku pochwy kobiety rodzącej jest wysoka. Ponadto, im więcej komórek bakteryjnych trafia w trakcie porodu do organizmu noworodka, tym wyższe jest ryzyko wystąpienia u niego zarówno za każenia wczesno-objawowego, jak i późno-objawowego. Identyfikacja nosicielek GBS wśród kobiet ciężarnych oraz zastosowanie u nich antybiotykowej profilaktyki okołoporodowej to podstawowe narzędzie zapobiegawcze w walce z zakażeniami o etiologii GBS u noworodków. Obowiązujące w tym zakresie wytyczne zostały sformułowane w latach 90-tych ubiegłego wieku przez CDC, a następnie wielokrotnie rewidowane [14, 15, 28, 71, 79, 91].

Zgodnie z rekomendacjami CDC, zaleca się przeprowadzanie opartych na hodowli prenatalnych badań

przesiewowych w kierunku kolonizacji bakteriami GBS pochwy i odbytu u wszystkich kobiet będących w 35–37 tygodniu ciąży [91].

Należy pobrać dwa wymazy: jeden z przedsionka pochwy, a drugi z kanału odbytu (po pokonaniu oporu zwieracza). Jeśli nie ma możliwości bezpośredniego posiewu pobranego materiału, należy użyć wymazówek z podłożem transportowym Amiesa. Materiał należy inkubować w bulionie Todd-Hewitt'a z dodatkiem kwasu nalidyksowego (15 µg/ml) i gentamycyny (8 µg/ml) przez 18–24 godziny w temperaturze 35–37°C w atmosferze tlenowej bądź z dodatkiem 5% CO₂ [91].

Następnie zakłada się hodowlę na podłożu agarowym wzbogaconym 5% odwłóknioną krwią baranią i inkubuje do 48 godzin, z zachowaniem opisanych wcześniej warunków inkubacji. Wstępną identyfikację należy oprzeć na cechach morfologicznych hodowli typowych dla GBS (zwykle występuje hemoliza typu β), morfologii komórkowej (stwierdzenie obecności ziarniaków Gram-dodatnich w preparacie mikroskopowym) oraz na wynikach podstawowych testów biochemicznych (ujemny test na katalazę, dodatni test CAMP, hydroliza hipuranu) [91]. W procesie diagnostycznym można także skorzystać z komercyjnych testów biochemicznych.

Przynależność wyizolowanego szczepu do serologicznej grupy B *Streptococcus* sp. potwierdza się poprzez wykonanie lateksowego testu aglutynacyjnego. W przypadku dalszych wątpliwości należy zastosować odpowiednie metody biologii molekularnej – np. technikę łańcuchowej reakcji polimerazy (Polymerase Chain Reaction, PCR) z użyciem starterów Sag59 (TTT CAC CAG CTG TAT TAG AAG TA) i Sag190 (GTT CCC TGA ACA TTA TCT TTG AT) [34]. Wśród pozostałych technik biologii molekularnej, które znajdują zastosowanie w badaniach nad szczepami GBS wymienia się fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (Fluorescent *in situ* Hybridization, FISH), metodę losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD), technikę multipleks-PCR oraz metodę elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (Pulse Field Gel Electrophoresis, PFGE) [9, 11].

Hodowla GBS jest niezbędna do wykonania analizy lekowrażliwości szczepu, koniecznej np. w przypadku alergii pacjentki na antybiotyki β-laktamowe. Rekomenduje się metodę krążkowo-dyfuzyjną z zastosowaniem podłoża Muellera-Hintona wzbogaconego 5% odwłóknioną krwią baranią (gęstość zawiesiny bakteryjnej powinna wynosić 0,5 w skali McFarlanda; 24-godzinna inkubacja należy prowadzić w atmosferze tlenowej w 37°C) [91].

Należy oznaczyć wrażliwość izolatu *S. agalactiae* na erytromycynę i klindamycynę. W przypadku wykrycia oporności istnieje konieczność określenia jej mechanizmu – konstytutywnego bądź indukcyjnego fenotypu MLS_B [34].

Jak dotąd wśród szczepów *S. agalactiae* nie wykryto oporności na naturalne antybiotyki β -laktamowe [91]. Zgodnie z zatwierdzonym przez Polskie Towarzystwo Ginekologów oraz Polskie Towarzystwo Neonatologiczne stanowiskiem specjalnej grupy roboczej, która opracowała krajowe zalecenia dotyczące wykrywania nosicielstwa GBS u kobiet ciężarnych i zapobiegania zakażeniom o etiologii GBS u noworodków, stwierdzenie oporności lub obniżonej wrażliwości na penicylinę u izolatu *S. agalactiae* wskazuje z dużym prawdopodobieństwem na błędną identyfikację szczepu lub nieprawidłowe przeprowadzenie badania lekowrażliwości [34]. W przypadku wykluczenia tych dwóch sytuacji wynik należy skonsultować w Krajowym Ośrodku Referencyjnym ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów funkcjonującym w ramach Zakładu Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej Narodowego Instytutu Leków.

7. Okołoporodowa profilaktyka antybiotykowa

W przywołanych wcześniej rekomendacjach CDC dotyczących zapobiegania okołoporodowym zakażeniom o etiologii GBS wiele miejsca poświęca się profilaktyce antybiotykowej, która istotnie zmniejsza ryzyko transmisji wertykalnej GBS oraz chroni przed rozwinięciem się wczesno-objawowego zakażenia tymi bakteriami u noworodka [91].

Okołoporodową profilaktykę antybiotykową należy zastosować u ciężarnych będących nosicielkami GBS w pochwie i/lub odbycie; także, jeśli w przebiegu ciąży zdiagnozowano bakteriurię o etiologii GBS lub gdy doszło do okołoporodowego zakażenia bakteriami *S. agalactiae* u dzieci z wcześniejszych ciąży pacjentki. Wskazaniem do wdrożenia okołoporodowej przeciwpaciorkowcowej profilaktyki antybiotykowej są również: poród przed 35–37 tygodniem ciąży (kiedy nie wykonano jeszcze badania przesiewowego w kierunku kolonizacji kobiety ciężarnej bakteriami GBS), zgłoszenie się rodzącej ciężarnej do szpitala po ponad 18 godzinach od przerwania błon płodowych oraz w przypadku wystąpienia gorączki śródporodowej ($\geq 38^\circ\text{C}$) [91].

Jeśli w trakcie ciąży podjęto decyzję o antybiotykowej eradykacji GBS z dróg moczowo-płciowych kobiety, należy obowiązkowo wdrożyć okołoporodową profilaktykę antybiotykową, ze względu na częste zjawisko powtórnej kolonizacji, pojawiające się po zakończeniu antybiotykoterapii [34, 91].

Rekomendowanymi antybiotykami β -laktamowymi są penicylina G oraz ampicylina, podawane dożylnie [34, 91]. U kobiet ciężarnych wykazujących alergię na penicyliny, zaleca się dożylną terapię z zastosowaniem cefazoliny, która ma podobne właściwości farmakokinetyczne [72]. W tym miejscu podkreślić należy jednak, iż u 10% osób uczulonych na penicyliny, występuje także

alergia na cefalosporyny [44]. W dalszej kolejności rozpatruje się podanie tą samą drogą klindamycyny, erytromycyny lub wankomycyny. Charakteryzuje je jednak niższa skuteczność w zwalczaniu nosicielstwa GBS u ciężarnych w porównaniu do skuteczności antybiotyków β -laktamowych [34, 91].

Noworodki urodzone przez kobiety, u których wdrożono okołoporodową profilaktykę antybiotykową przeciw *S. agalactiae*, należy poddać co najmniej 24-godzinnej obserwacji, a w przypadku wystąpienia objawów infekcji – wykonać diagnostykę mikrobiologiczną w kierunku GBS (materiał do badania stanowią wymazy z ucha i pępka noworodka) oraz zastosować antybiotykoterapię empiryczną z wykorzystaniem ampicyliny [34].

8. Immunoprofilaktyka zakażeń GBS

Do dziś brak jest szczepionki przeciw zakażeniom o etiologii GBS. Podejmowano próby redukcji stopnia kolonizacji kobiet w celu zmniejszenia ryzyka transmisji *S. agalactiae* do organizmu noworodka, badania dowodzą bowiem ochronnej roli matczynej przeciwciał z klasy IgG (skierowanych m.in. przeciwko bakteryjnym wielocukrom otoczkowym), zapobiegających rozwojowi zakażeń inwazyjnych u dzieci [2, 23, 31].

Zasadniczym problemem w opracowaniu skutecznej szczepionki przeciw zakażeniom GBS jest występowanie ze zróżnicowaną częstością (w zależności od szerokości geograficznej) kilku serotypów bakterii, które mogą reagować ze sobą krzyżowo. Ponadto, odsetek szczepów niepoddających się serotypowaniu przy użyciu stosowanych obecnie technik diagnostycznych może być wysoki (10–30%), co dodatkowo utrudnia opracowanie uniwersalnej szczepionki chroniącej przed zakażeniami o etiologii GBS [47, 74]. Podanie szczepionki będącej w fazie badań klinicznych kobietom ciężarnym także budzi wiele kontrowersji. Rodzi się wreszcie pytanie o populację docelową szczepienia: czy miałyby być to nastolatki przed rozpoczęciem współżycia seksualnego, czy też kobiety w trzecim trymestrze ciąży? Jest to o tyle istotne, że skuteczność obecnie badanych szczepionek spada z 84% w pierwszym roku po szczepieniu, do 55% po 5 latach, i 35% po 10 latach od szczepienia. Zatem strategia wdrażania szczepień wśród dziewcząt kilkunastoletnich byłaby niekorzystna dla kobiet 30-letnich, rodzących najczęściej. Szczepienia w wieku późniejszym niż 12–15 lat nie objęłyby natomiast matek małoletnich [85].

Wśród potencjalnych składników konstruowanej szczepionki najczęściej wymienia się wielocukry otoczkowe, peptydazę C5a, komponentę β białka C, a także białka LmbP, Sip, LrrG [41]. Wyniki badań nad przydatnością podjednostki α i β białka C oraz białka Rib do opracowania szczepionki przeciwpaciorkowcowej pozwalają twierdzić, iż wymienione antygeny *S. aga-*

lactiae charakteryzują się wystarczającą immunogennością. Nie występują jednak wśród szczepów GBS na tyle powszechnie, by mogły zapewnić odpowiednio wysoką skuteczność potencjalnej szczepionki [68, 77]. Xu e i wsp. [94] prowadzili badania nad przydatnością konserwatywnych powierzchniowych antygenów białkowych *S. agalactiae* – Sip i ScpB – do skonstruowania skutecznej szczepionki; u myszy, którym preparat podano donosowo, zaobserwowano prawidłową reakcję ze strony układu immunologicznego.

Wyniki badań klinicznych na zdrowych dorosłych – z użyciem skonjugowanej wielocukrowo-białkowej szczepionki przygotowanej ze szczepów GBS najczęściej uwikłanych w zakażenia inwazyjne są obiecujące [1, 2, 23, 31]. Jak dotąd jednak klasyczne podejście do skonstruowania szczepionki przeciw zakażeniom GBS nie przyniosło oczekiwanych efektów, dlatego próbuje się wykorzystać także narzędzia z zakresu genomiki i proteomiki, poczynając od zsekwencjonowania genomu dwóch szczepów *S. agalactiae*: NEM316 (serotyp III) i 2603V/R (serotyp V) [41].

9. Uwagi końcowe

Występujące u noworodków i niemowląt zakażenia o etiologii *S. agalactiae* mają często niezwykle dramatyczny przebieg. Zagrożają życiu najmłodszych pacjentów, manifestując się bakteremią, zapaleniem płuc, zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych i szokiem septycznym.

W 2008 roku Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego rozpoczął realizację programu BINet mającego na celu wzmocnienie monitorowania w Polsce inwazyjnych zakażeń bakteryjnych nabytych poza szpitalem. Monitoringiem BINet objęto infekcje inwazyjne wywołane przez *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* [38].

Ponadto Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 września 2010 roku w sprawie standardów postępowania oraz procedur medycznych przy udzielaniu świadczeń zdrowotnych z zakresu opieki okołoporodowej sprawowanej nad kobietą w okresie fizjologicznej ciąży, fizjologicznego porodu, porodu oraz opieki nad noworodkiem podniosło rangę badań mikrobiologicznych w kierunku nosicielstwa paciorkowców β -hemolizujących grupy B, czyniąc je obowiązkowymi. Dokument wszedł w życie z dniem 8 kwietnia 2011 roku.

Podjęte działania pozwolą na rzetelną ocenę związanej z GBS sytuacji epidemiologicznej w Polsce, poprawę standardów diagnostycznych i podejmowanie dalszych skutecznych działań profilaktycznych.

Piśmiennictwo

1. Baker C.J., Paoletti L.C., Rench M.A., Guttormsen H.K., Carey V.J., Hickman M.E., Kasper D.L.: Use of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine for type II group B *Streptococcus* in healthy women. *J. Infect. Dis.* **182**, 1129–1138 (2000)
2. Baker C.J., Edwards M.S.: Group B streptococcal conjugate vaccines. *Arch. Dis. Child.* **88**, 375–378 (2003)
3. Barcaite E., Bartusevicius A., Tameliene R., Kliucinskas M., Maleckiene L., Nadisauskiene R.: Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **87**, 260–271 (2008)
4. Baron M.J., Filman D.J., Prophete G.A., Hogle J.M., Madoff L.C.: Identification of a glycosaminoglycan-binding region of the alpha C protein that mediates entry of group B streptococci into host cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 10526–10536 (2007)
5. Beckmann C., Waggoner J.D., Harris T.O., Tamura G.S., Rubens C.E.: Identification of novel adhesins from group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect. Immun.* **70**, 2869–2876 (2002)
6. Bohnsack J.F., Whiting A.A., Bradford R.D., Van Frank B.K., Takahashi S., Adderson E.E.: Genetic polymorphisms of group B *Streptococcus scpB* alter functional activity of a cell-associated peptidase that inactivates C5a. *Infect. Immun.* **68**, 5018–5025 (2000)
7. Borchardt S.M., DeBusscher J.H., Tallman P.A., Manning S.D., Marrs C.F., Kurzynski T.A., Foxman B.: Frequency of antimicrobial resistance among invasive and colonizing group B streptococcal isolates. *BMC Infect. Dis.* **6**, 57–64 (2006)
8. Brown C.K., Gu Z.Y., Matsuka Y.V., Purushothaman S.S., Winter L.A., Cleary P.P., Olmsted S.B., Ohlendorf D.H., Earhart C.A.: Structure of the streptococcal cell wall C5a peptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **102**, 18391–18396 (2005)
9. Brzychczy-Włoch M., Bulanda M., Ochojska D., Heczko P.B.: Nowoczesne metody diagnostyki *Streptococcus agalactiae*. *Post. Neonat.* **13**, 71–74 (2009)
10. Brzychczy-Włoch M., Gosiewski T., Bodaszewska M., Pabian W., Bulanda M., Kochan P., Strus M., Heczko P.B.: Genetic characterization and diversity of *Streptococcus agalactiae* isolates with macrolide resistance. *J. Med. Microbiol.* **59**, 780–786 (2010)
11. Brzychczy-Włoch M., Strus M., Pawlik D., Gosiewski T., Rytlewski K., Drzewiecki A., Lauterbach R., Heczko P.B.: Ocena możliwości zastosowania metod molekularnych do diagnostyki nosicielstwa oraz analizy podobieństwa izolatów *Streptococcus agalactiae*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **60**, 91–99 (2008)
12. Brzychczy-Włoch M., Strus M., Pawlik D., Machlarz H., Gosiewski T., Drzewiecki A., Rytlewski K., Lauterbach R., Heczko P.B.: Narastanie stopnia kolonizacji kobiet w ciąży i noworodków przez *Streptococcus agalactiae* na obszarze Polski południowo-wschodniej. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **60**, 5–12 (2008)
13. Carlin A.F., Lewis A.L., Varki A., Nizet V.: Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *J. Bacteriol.* **189**, 1231–1237 (2007)
14. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Perinatal group B streptococcal disease after universal screening recommendations – United States, 2003–2005. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **56**, 701–705 (2007)
15. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Trends in perinatal group B streptococcal disease – United States, 2000–2006. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* **58**, 109–112 (2009)

16. Cheng P.J., Chueh H.Y., Liu C.M., Hsu J.J., Hsieh T.T., Soong Y.K.: Risk factors for recurrence of group B streptococcus colonization in a subsequent pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **111**, 704–709 (2008)
17. Dahesh S., Hensler M.E., Van Sorge N.M., Gertz R.E. Jr., Schrag S., Nizet V., Beall B.W.: Point mutation in the group B streptococcal *pbp2x* gene conferring decreased susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2915–2918 (2008)
18. Davies H.D., Adair C., McGeer A., Ma D., Robertson S., Mucenski M., Kowalsky L., Tyrell G., Baker C.J.: Antibodies to capsular polysaccharides of group B *Streptococcus* in pregnant Canadian women: relationship to colonization status and infection in the neonate. *J. Infect. Dis.* **184**, 285–291 (2001)
19. Dechen T.C., Sumit K., Ranabir P.: Correlates of vaginal colonization with group B streptococci among pregnant women. *J. Glob. Infect. Dis.* **2**, 236–241 (2010)
20. Dogan B., Schukken Y.H., Santisteban C., Boor K.J.: Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5899–5906 (2005)
21. Doran K.S., Engelson E.J., Khosravi A., Maisey H.C., Fedtke I., Equils O., Michelsen K.S., Arditi M., Peschel A., Nizet V.: Blood-brain barrier invasion by group B *Streptococcus* depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. *J. Clin. Invest.* **115**, 2499–2507 (2005)
22. Edwards M.S., Baker C.J.: Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 839–847 (2005)
23. Edwards M.S.: Group B streptococcal conjugate vaccine: a timely concept for which the time has come. *Human Vaccines*, **4**, 444–448 (2008)
24. El Aila N.A., Tency I., Claeys G., Saerens B., De Backer E., Temmerman M., Verhelst R., Vanechoutte M.: Genotyping of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) isolated from vaginal and rectal swabs of women at 35–37 weeks of pregnancy. *BMC Infect. Dis.* **9**, 153–164 (2009)
25. Fluegge K., Supper S., Siedler A., Berner R.: Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in infants: results from a nationwide active laboratory surveillance study over 2 years in Germany. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 760–763 (2005)
26. Garland S.M., Cottrill E., Markowski L., Pearce C., Clifford V., Ndisang D., Kelly N., Daley A., Agar Gbs Resistance Study Group FT: Antimicrobial resistance in group B *Streptococcus*: the Australian experience. *J. Med. Microbiol.* **60**, 230–235 (2011)
27. Gherardi G., Imperi M., Baldassarri L., Pataracchia M., Alfaroni G., Recchia S., Orefici G., Dicuonzo G., Creti R.: Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2909–2916 (2007)
28. Goins W.P., Talbot T.R., Schaffner W., Edwards K.M., Craig A.S., Schrag S.J., Van Dyke M.K., Griffin M.R.: Adherence to perinatal group B streptococcal prevention guidelines. *Obstet. Gynecol.* **115**, 1217–1224 (2010)
29. Gyax S.E., Schuyler J.A., Kimmel L.E., Trama J.P., Mordechai E., Adelson M.E.: Erythromycin and clindamycin resistance in group B streptococcal clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1875–1877 (2006)
30. Hansen S.M., Uldbjerg N., Kilian M., Sorensen U.B.: Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 83–89 (2004)
31. Heath P.T., Feldman R.G.: Vaccination against group B *Streptococcus*. *Expert Rev. Vaccines*, **4**, 207–218 (2005)
32. Heath P.T., Schuchat A.: Perinatal group B streptococcal disease. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **21**, 411–424 (2007)
33. Heath P.T., Balfour G.F., Tighe H., Verlander N.Q., Lamagni T.L., Efstratiou A.: Group B streptococcal disease in infants: a case control study. *Arch. Dis. Child.* **94**, 674–680 (2009)
34. Heczko P.B., Niemiec T., Lauterbach R., Przondo-Mordarska H., Strus M., Drzewiecki A., Brzychczy-Włoch M.: Zalecenia dotyczące wykrywania nosicielstwa paciorkowców grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków spowodowanym przez ten drobnoustrój. *Zakażenia*, **8**, 87–96 (2008)
35. Henneke P., D.T. Golenbock i wsp.: Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B *Streptococcus*. *J. Immunol.* **174**, 6449–6455 (2005)
36. Hensler M.E., Liu G.Y., Sobczak S., Benirschke K., Nizet V., Heldt G.P.: Virulence role of group B *Streptococcus* beta-hemolysin/cytolysin in a neonatal rabbit model of early-onset pulmonary infection. *J. Infect. Dis.* **191**, 1287–1291 (2005)
37. Honig E., Mouton J.W., van der Meijden W.I.: The epidemiology of vaginal colonisation with group B streptococci in a sexually transmitted disease clinic. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **105**, 177–180 (2002)
38. Hryniewicz W., Jackowska T., Skoczyńska A.: Program BINet jako wymóg nowoczesnej polityki zdrowotnej. *Med. Wieku Rozw.* **14**, 211–217 (2010)
39. Jahromi B.N., Poorarian S., Poorbarfehee S.: The prevalence and adverse effects of group B streptococcal colonization during pregnancy. *Arch. Iranian Med.* **11**, 654–657 (2008)
40. Joachim A., Matee M.I., Massawe F.A., Lyamuya E.F.: Maternal and neonatal colonization of group B *Streptococcus* at Muhimbili National Hospital in Dar es Salaam, Tanzania: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. *BMC Public Health*, **9**, 437–442 (2009)
41. Johri A.K., Paoletti L.C., Glaser P., Dua M., Sharma P.K., Grandi G., Rappuoli R.: Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 932–942 (2006)
42. Jones M.E., Draghi D.C., Karlowky J.A., Sahm D.F., Bradley J.S.: Prevalence of antimicrobial resistance in bacteria isolated from central nervous system specimens as reported by U.S. hospital laboratories from 2000 to 2002. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **3**, 3–11 (2004)
43. Kasahara K., Baltus A.J., Lee S.H., Edelstein M.A., Edelstein P.H.: Prevalence of non-penicillin-susceptible group B *Streptococcus* in Philadelphia and specificity of penicillin resistance screening methods. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1468–1469 (2010)
44. Kelkar P. S., Li J. T.: Cephalosporin allergy. *N. Engl. J. Med.* **345**, 804–809 (2001)
45. Kimura K., Suzuki S., Wachino J.I., Kurokawa H., Yamane K., Shibata N., Nagano N., Kato H., Shibayama K., Arakawa Y.: First molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2890–2897 (2008)
46. Kimura K., Wachino J.I., Kurokawa H., Suzuki S., Yamane K., Shibata N., Arakawa Y.: Practical disk diffusion test for detecting group B *Streptococcus* with reduced penicillin susceptibility. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 4154–4157 (2009)
47. Kong F., Lambertsen L.M., Slotved H.C., Ko D., Wang H., Gilbert G.L.: Use of phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2745–2750 (2008)
48. Kotiw M., Zhang G.W., Daggard G., Reiss-Levy E., Tapsall J.W., Numa A.: Late-onset and recurrent neonatal group B streptococcal disease associated with breast-milk transmission. *Pediatr. Dev. Pathol.* **6**, 251–256 (2003)
49. Kovavisarath E., Ying W.S., Kanjanahareutai S.: Risk factors related to group B streptococcal colonization in pregnant women in labor. *J. Med. Assoc. Thai.* **90**, 1287–1292 (2007)

50. Kowalska B., Niemiec K.T., Drejewicz H., Polak K., Kubik P., Elmidaoui A., Gierowska-Bogusz B., Jaczyńska R.: Prevalence of group B streptococcal colonization in pregnant women and their newborns based on the results of examination of patients in the Obstetric and Gynecology Department of the National Research Institute of Mother and Child – a pilot study. *Ginekol. Pol.* **74**, 1223–1227 (2003)
51. Kraśnianin E., Skręt-Magierło J., Witalis J., Barnaś E., Kluz T., Kozieł A., Skręt A.: The incidence of *Streptococcus* group B in 100 parturient women and the transmission of pathogens to the newborn. *Ginekol. Pol.* **80**, 285–289 (2009)
52. Krishnan V., Gaspar A.H., Ye N., Mandlik A., Ton-That H., Narayana S.V.: An IgG-like domain in the minor pilin GBS52 of *Streptococcus agalactiae* mediates lung epithelial cell adhesion. *Structure*, **15**, 893–903 (2007)
53. Lancefield R.C.: A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B). *J. Exp. Med.* **59**, 441–458 (1934)
54. Laupland K.B., Ross T., Church D.L., Gregson D.B.: Population-based surveillance of invasive pyogenic streptococcal infection in a large Canadian region. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 224–230 (2006)
55. Leclair C.M., Hart A.E., Goetsch M.F., Carpentier H., Jensen J.T.: Group B streptococcus: prevalence in a non-obstetric population. *J. Low Genit. Tract Dis.* **14**, 162–166 (2010)
56. Lin F.Y., J.D. Clemens i wsp.: Level of maternal IgG anti-group B streptococcus type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. *J. Infect. Dis.* **190**, 928–934 (2004)
57. Luck S., Torny M., d'Agapeyeff K., Pitt A., Heath P., Breathnach A., Russell A.B.: Estimated early-onset group B streptococcal neonatal disease. *Lancet*, **361**, 1953–1954 (2003)
58. Maisey H.C., Hensler M., Nizet V., Doran K.S.: Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J. Bacteriol.* **189**, 1464–1467 (2007)
59. Maisey H.C., Quach D., Hensler M.E., Liu G.Y., Gallo R.L., Nizet V., Doran K.S.: A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. *FASEB J.* **22**, 1715–1724 (2008)
60. Manning S.D., Neighbors K., Tallman P.A., Gillespie B., Marrs C.F., Borhardt S.M., Baker C.J., Pearlman M.D., Foxman B.: Prevalence of group B streptococcus colonization and potential for transmission by casual contact in healthy young men and women. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 380–388 (2004)
61. Matsubara K., Yamamoto G.: Invasive group B streptococcal infections in a tertiary care hospital between 1998 and 2007 in Japan. *Int. J. Infect. Dis.* **13**, 679–684 (2009)
62. Mavenyengwa R.T., Maeland J.A., Moyo S.R.: Putative novel surface-exposed *Streptococcus agalactiae* protein frequently expressed by the group B *Streptococcus* from Zimbabwe. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**, 1302–1308 (2009)
63. Murayama S.Y., Seki C., Sakata H., Sunaoshi K., Nakayama E., Sunakawa K., Ubukata K.; Invasive Streptococcal Disease Working Group: Capsular type and antibiotic resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from patients, ranging from newborns to the elderly, with invasive infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2650–2653 (2009)
64. Nagano N., Nagano Y., Kimura K., Tamai K., Yanagisawa H., Arakawa Y.: Genetic heterogeneity in *pbp* genes among clinically isolated group B streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 4258–4267 (2008)
65. Panda B., Iruretagoyena I., Stiller R., Panda A.: Antibiotic resistance and penicillin tolerance in ano-vaginal group B streptococci. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **22**, 111–114 (2009)
66. Peláez L.M., Gelber S.E., Fox N.S., Chasen S.T.: Inappropriate use of vancomycin for preventing perinatal group B streptococcal (GBS) disease in laboring patients. *J. Perinat. Med.* **37**, 487–489 (2009)
67. Persson E., Berg S., Bergseng H., Bergh K., Valsö-Lyng R., Trollfors B.: Antimicrobial susceptibility of invasive group B streptococcal isolates from south-west Sweden 1988–2001. *Scand. J. Infect. Dis.* **40**, 308–313 (2008)
68. Persson E., Berg S., Bevanger L., Bergh K., Valsö-Lyng R., Trollfors B.: Characterisation of invasive group B streptococci based on investigation of surface proteins and genes encoding surface proteins. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 66–73 (2008)
69. Pettersson K.S.: Perinatal infection with group B streptococci. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **12**, 193–197 (2007)
70. Phares C.R., Lynfield R., Farley M.M., Mohle-Boetani J., Harrison L.H., Petit S., Craig A.S., Schaffner W., Schrag S.J.: Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. *JAMA*, **299**, 2056–2065 (2008)
71. Picard F.J., Bergeron M.G.: Laboratory detection of group B *Streptococcus* for prevention of perinatal disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**, 665–671 (2004)
72. Popovic J., Grujic Z., Sabo A.: Influence of pregnancy on ceftriaxone, cefazolin and gentamicin pharmacokinetics in caesarean vs. non-pregnant sectioned women. *J. Clin. Pharm. Ther.* **32**, 595–602 (2007)
73. Pritchard D.G., Trent J.O., Li X., Zhang P., Egan M.L., Baker J.R.: Characterization of the active site of group B streptococcal hyaluronan lyase. *Proteins*, **40**, 126–134 (2000)
74. Ramaswamy S.V., Ferrieri P., Flores A.E., Paoletti L.C.: Molecular characterization of nontypeable group B *Streptococcus*. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2398–2403 (2006)
75. Regan J.A., Klebanoff M.A., Nugent R.P., Eschenbach D.A., Blackwelder W.C., Lou Y., Gibbs R.S., Rettig P.J., Martin D.H., Edelman R.: Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. VIP Study Group. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **174**, 1354–1360 (1996)
76. Sader H.S., Streit J.M., Fritsche T.R., Jones R.N.: Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated from European medical centres: results of the Daptomycin Surveillance Programme (2002–2004). *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 844–852 (2006)
77. Sadowy E., Matynia B., Hryniewicz W.: Population structure, virulence factors and resistance determinants of invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* in Poland. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1907–1914 (2010)
78. Schoening T.E., Wagner J., Arvand M.: Prevalence of erythromycin and clindamycin resistance among *Streptococcus agalactiae* isolates in Germany. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**, 579–582 (2005)
79. Schrag S., Gorwitz R., Fultz-Butts K., Schuchat A.: Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm. Rep.* **51**, 1–22 (2002)
80. Sendi P., Johansson L., Norrby-Teglund A.: Invasive group B streptococcal disease in non-pregnant adults: a review with emphasis on skin and soft-tissue infections. *Infection*, **36**, 100–111 (2008)
81. Seoud M., Nassar A.H., Zalloua P., Boghossian N., Ezeddine J., Melki I., Araj G., Nacouzi G., Sanyoura M., Yunis K.: Prenatal and neonatal Group B *Streptococcus* screening and serotyping in Lebanon: incidence and implications. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **89**, 399–403 (2010)
82. Shabayek S.A., Abdalla S.M., Abouzeid M.H.: Vaginal carriage and antibiotic susceptibility profile of group B *Streptococcus* during late pregnancy in Ismailia, Egypt. *J. Infect. Public Health* **2**, 86–90 (2009)

83. Skoff T.H., Farley M.M., Petit S., Craig A.S., Schaffner W., Gershman K., Harrison L.H., Lynfield R., Schrag S.J.: Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990–2007. *CID*, **49**, 85–92 (2009)
84. Slotved H.C., Kong F., Lambertsen L., Sauer S., Gilbert G.L.: Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 2929–2936 (2007)
85. Spellerberg B.: Pathogenesis of neonatal *Streptococcus agalactiae* infections. *Microbes Infect.* **14**, 1733–1742 (2000)
86. Stapleton R.D., Kahn J.M., Evans L.E., Critchlow C.W., Gardella C.M.: Risk factors for group B streptococcal genitourinary tract colonization in pregnant women. *Obstet. Gynecol.* **106**, 1246–1252 (2005)
87. Strus M., Pawlik D., Brzywczy-Włoch M., Gosiewski T., Rytlewski K., Lauterbach R., Heczko P.B.: Group B *Streptococcus* colonization of pregnant women and their children observed on obstetric and neonatal wards of the University Hospital in Krakow, Poland. *J. Med. Microbiol.* **58**, 228–233 (2009)
88. Turrentine M. A., Ramirez M. M.: Recurrence of group B streptococci colonization in subsequent pregnancy. *Obstet. Gynecol.* **112**, 259–264 (2008)
89. Valkenburg-van den Berg A.W., Sprij A.J., Dekker F.W., Dörr P.J., Kanhai H.H.: Association between colonization with Group B *Streptococcus* and preterm delivery: a systematic review. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **88**, 958–967 (2009)
90. Valkenburg-van den Berg A.W., Houtman-Roelofsen R.L., Oostvogel P.M., Dekker F.W., Dörr P.J., Sprij A.J.: Timing of group B streptococcus screening in pregnancy: a systematic review. *Gynecol. Obstet. Invest.* **69**, 174–183 (2010)
91. Verani J.R., McGee L., Schrag S.J., Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Prevention of perinatal group B streptococcal disease – revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm. Rep.* **59**, 1–36 (2010)
92. Wald E.R., Bergman I., Taylor H.G., Chiponis D., Porter C., Kubek K.: Long-term outcome of group B streptococcal meningitis. *Pediatrics*, **77**, 217–221 (1986)
93. Wilk K., Sikora J., Bakon I., Kossowski P., Szymańska-Toczek Z., Szkodny E., Włoch S.: Significance of group B *Streptococcus* (GBS) infections in parturient women. *Ginekol. Pol.* **74**, 463–467 (2003)
94. Xue G., Yu L., Li S., Shen X.: Intranasal immunization with GBS surface protein *Sip* and *ScpB* induces specific mucosal and systemic immune responses in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58**, 202–210 (2010)

PRZYGOTOWANIE INSTRUMENTARIUM MEDYCZNEGO
DO ZABIEGÓW CHIRURGICZNYCH.
CZĘŚĆ I – WSTĘPNA DEKONTAMINACJA I DEZYNFEKCJABeata Sokół-Leszczyńska^{1*}, Elżbieta Sztark², Piotr Leszczyński^{1,3},
Grażyna Młynarczyk⁴, Marta Wróblewska^{1,5}¹Pracownia Epidemiologii Zakażeń Szpitalnych, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa²Centralna Sterylizatornia, Samodzielny Publiczny Zespół Zakładów Opieki Zdrowotnej, Płońsk³Zespół Kontroli Zakażeń Szpitalnych, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus – Centrum Leczenia Obrażeń, Warszawa⁴Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa⁵Zespół Kontroli Zakażeń Szpitalnych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wstęp. 2. Podział instrumentów medycznych. 3. Kompatybilność i tolerancja materiałowa. 4. Centralizacja procesów dekontaminacji. 5. Transport narzędzi od użytkownika. 6. Oczyszczanie i dezynfekcja. 7. Suszenie. 8. Podsumowanie

Medical instrument preparation for surgical procedures. Part I – initial decontamination and disinfection

Abstract: Developments in modern medicine, introduction of new surgical techniques and invasive methods of diagnosis and treatment, resulted in an increased risk of medical personnel's contact with materials contaminated by pathogens. Surgical instruments pose a high risk of infection transmission, as due to contact with tissue they must be sterile. Reprocessing is the technological line, comprising a series of steps that must be done to contaminated instruments during the procedure which makes them suitable for reuse. The main stages of reprocessing are: cleansing, disinfecting, rinsing, drying, control of functionality, maintenance, packaging, sterilisation and verification of medical device quality and performance of functional tests, which allow the user to provide a sterile product, while maintaining its full functional capacity. The paper presents the steps of preparation of medical instruments for use, from transportation from the user, through the cleansing, disinfection and control. The sterilisation process and its control are discussed in part two of the article.

1. Introduction. 2. The classification of medical instruments. 3. Compatibility and material tolerance. 4. Centralisation of decontamination processes. 5. Transportation of instruments from the user. 6. Cleansing and disinfection. 7. Drying. 8. Summary

Słowa kluczowe: instrumentarium medyczne, mycie, dezynfekcja, kontrola dezynfekcji**Key words:** medical instruments, cleansing, disinfection, disinfection control

1. Wstęp

Rozwój medycyny, upowszechnienie nowoczesnych technik operacyjnych oraz inwazyjnych metod diagnostyki i leczenia, spowodowały zwiększenie ryzyka kontaktu personelu medycznego z materiałami skażonymi drobnoustrojami chorobotwórczymi, a w konsekwencji wzrost częstości występowania zakażeń szpitalnych. Zakażenia szpitalne stanowią więc istotny problem dla pracowników ochrony zdrowia.

Drobnoustroje chorobotwórcze są obecne w środowisku szpitalnym w dużej liczbie. Ich patogenność, ilość, a także zdolność do tworzenia biofilmu, stanowią utrudnienie dla szpitalnych procesów dekontaminacji [19]. Za podstawę postępowania dekontaminacyjnego należy przyjąć założenie, że wszyscy pacjenci, z którymi miały kontakt reprocessowane narzędzia, są zakażeni drobnoustrojami chorobotwórczymi. Takie założenie wymusza odpowiednie sposoby postępowania zabezpieczającego zarówno pacjentów, jak i personel medyczny, przed zakażeniami.

Dekontaminacja narzędzi i sprzętu medycznego to praktyczne działania mające na celu redukcję liczby drobnoustrojów do poziomu bezpiecznego dla pacjenta. Ogniwa łańcucha czynności dekontaminacyjnych są mocno ze sobą połączone, a jedno z nich stanowi czynnik ludzki. Działania człowieka na każdym etapie procesu warunkują jego skuteczność. Realizując kolejne etapy należy tak postępować, aby nie doszło do powtórnej kontaminacji sprzętu. Wymaga to od zespołu wyjątkowej dyscypliny, wiedzy z zakresu epidemiologii oraz ciągłego doskonalenia, świadomości i opanowania procedur wytyczających zasady postępowania ze sprzętem potencjalnie skażonym [3, 11, 15].

2. Podział instrumentów medycznych

Drobnoustroje chorobotwórcze powszechnie występujące w środowisku szpitalnym przenoszone są między innymi za pośrednictwem źle przygotowanego sprzętu medycznego. Cykl prawidłowo wykonywanych czynności

* Autor korespondencyjny: Pracownia Epidemiologii Zakażeń Szpitalnych, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, ul. Chałubińskiego 5; tel. 22 628 27 39

dekontaminacyjnych jest zatem jednym z podstawowych elementów higieny szpitalnej, mającym na celu zapobieganie i zwalczanie zakażeń szpitalnych.

Pod względem ryzyka zakażenia sprzęt możemy podzielić na krytyczny – narzędzia i urządzenia medyczne mające kontakt z tkankami (narzędzia chirurgiczne), półkrytyczny – mający kontakt z błonami śluzowymi (laryngoskopy, wzierniki, endoskopy) oraz niekrytyczny – mający kontakt z nieuszkodzoną skórą (mankiety do mierzenia ciśnienia, stetoskopy). Sprzęt krytyczny wymaga sterylizacji, półkrytyczny – dezynfekcji wysokiego stopnia (bakterie, wszystkie wirusy, grzyby, prątki, niektóre spory), a niekrytyczny – dezynfekcji niskiego stopnia (bakterie, wirusy osłonkowe, grzyby) [6].

Innego podziału instrumentów medycznych możemy dokonać przyjmując za kryterium ich zastosowanie. Klasyfikacja ta obejmuje narzędzia chirurgiczne, instrumenty mikrochirurgiczne, narzędzia stomatologiczne, systemy chirurgiczne z napędem, instrumenty do chirurgii mikroinwazyjnej, endoskopy sztywne oraz narzędzia chirurgiczne pracujące z wykorzystaniem prądów wysokiej częstotliwości [20].

Instrumenty medyczne możemy również podzielić pod względem ich konstrukcji, która warunkuje stopień trudności przygotowania do ponownego użycia, na narzędzia klasyczne (tzw. lite) oraz narzędzia o wysoce skomplikowanej budowie i kształtach, wymagające zastosowania odpowiednich technik obróbki.

Jeszcze inna klasyfikacja to podział na sprzęt termostabilny – odporny na obróbkę w wysokiej temperaturze oraz sprzęt termolabilny – wrażliwy na wysoką temperaturę, wymagający zatem wybranych metod działania, w których decydującą rolę biobójczą odgrywa udział środka chemicznego [13, 17, 18].

3. Kompatybilność i tolerancja materiałowa

Efektywność procesu dekontaminacji zależy w dużym stopniu od kompatybilności materiałowej instrumentarium medycznego, co wymaga doboru właściwej metody obróbki (manualna, maszynowa), techniki działania (zanurzenie w roztworze, płukanie kanałowe, przecieranie, zraszanie), czynników chemicznych (substancje aktywne, stężenie, pH, czas kontaktu), oraz fizycznych (ultradźwięki, temperatura, ciśnienie wody, ciśnienie sprężonego powietrza [18]).

W procesie produkcji instrumentów medycznych wytwórca musi wziąć pod uwagę dobór materiałów w odniesieniu do przewidzianego zakresu stosowania. W przypadku narzędzi chirurgicznych, wymagania dotyczą wytrzymałości, trwałości, odporności na korozję, elastyczności, sztywności oraz dobrego cięcia. Wymagania te mogą być spełnione dzięki zastosowaniu do produkcji różnego rodzaju hartowanych stali nierdzewnych.

Odporność na korozję zależy od grubości warstwy pasywnej (tlenku chromu) tworzącej się i narastającej na powierzchni instrumentu. Warstwa ta jest bardzo odporna na działanie wielu czynników chemicznych, jednak niektóre substancje mogą ją uszkodzić. Należą do nich chlorki, wchodzące w reakcję z warstwą pasywną i prowadzące do uszkodzeń w postaci korozji wżerowej. Źródłem pochodzenia chlorków w cyklu użytkowym instrumentu chirurgicznego są najczęściej: ich zawartość w wodzie, niedostateczna demineralizacja wody stosowanej do końcowego płukania i sterylizacji parowej, brak soli regeneracyjnej przy wytwarzaniu zmiękczonej wody, jak również stosowanie preparatów niedopuszczonych lub niewłaściwie użytych w cyklu przygotowania. Substancje te zawarte są też w soli kuchennej, środkach żrących, lekach oraz substancjach organicznych (płyny ustrojowe, np. krew, ślina, pot). Chlorki znajdują się również w bieliźnie operacyjnej, materiałach opatrunkowych oraz opakowaniach sterylizacyjnych. Jak najszybsze eliminowanie kontaktu z chlorkami stanowi bardzo ważny element przedłużenia żywotności instrumentarium medycznego [20].

4. Centralizacja procesów dekontaminacji

Nowoczesna chirurgia wymaga nowoczesnej sterylizacji. Pod względem organizacyjnym i kadrowym za nowoczesną można uznać wyłącznie sterylizację dokonywaną w systemie scentralizowanym, na poziomie danego szpitala. Centralna sterylizatornia jest specjalistyczną jednostką, w której są wykonywane wszystkie czynności umożliwiające odtworzenie stanu sterylności narzędzi medycznych, skażonych w trakcie zabiegu operacyjnego.

Ze względu na stopień komplikacji wykonywanych prac, centralna sterylizatornia powinna być jednostką autonomiczną, zatrudniającą wyszkolony personel i kierowaną przez specjalistę. Za centralizacją sterylizacji przemawia wiele argumentów – możliwość określenia jasnych i czytelnych procedur i instrukcji czynności dekontaminacyjnych, jak również możliwość nadzoru i kontroli działań człowieka oraz urządzeń dekontaminujących, wykonywanie wszystkich czynności przez wyspecjalizowany personel, ciągłe szkolenie personelu, doskonalenie stosowanych metod, weryfikacja procedur pod kątem zmieniających się zaleceń producenta oraz ich dokumentowanie [1, 2, 3, 6].

5. Transport narzędzi od użytkownika

Pierwsze kroki w celu przeprowadzenia właściwej dekontaminacji narzędzi zaczynają się już na bloku operacyjnym, gdzie przed transportem instrumenty

należy oczyścić z pozostałości substancji chemicznych stosowanych w czasie zabiegu, a następnie delikatnie i ostrożnie umieścić je w pojemnikach transportowych, aby nie spowodować uszkodzenia mechanicznego [20].

W szpitalach, w których funkcjonuje centralna sterylizatornia, transport skażonych instrumentów medycznych z bloków operacyjnych i oddziałów szpitalnych powinien odbywać się w zamkniętych systemach transportowych. Pojemników transportowych nie należy przeładowywać [20]. Kontakt pracowników ze skażonymi narzędziami powinien być ograniczony do minimum – skażonymi narzędziami mogą zajmować się jedynie pracownicy wyznaczeni do tego celu, profesjonalnie przygotowani i na bieżąco szkoleni w tym zakresie [8].

Skażony sprzęt z bloku operacyjnego do centralnej sterylizatorni powinien być transportowany dźwigiem towarowym „brudnym”, natomiast z pozostałych komórek organizacyjnych – przy udziale służb transportu wewnętrznego [4, 16].

Sprzęt medyczny może być transportowany na sucho lub na mokro. Każdy z rodzajów transportu posiada zalety oraz wady (Tabela I) [4]. Preferowanym sposobem jest transport na sucho.

Po zakończeniu procesu sterylizacji instrumentu ważnym etapem jest jego prawidłowy transport i przechowywanie do momentu ponownego użycia.

6. Oczyszczanie i dezynfekcja

Dezynfekcja jest procesem powodującym redukcję drobnoustrojów poprzez zabicie wegetatywnych form bakterii i grzybów oraz inaktywację wirusów na powierzchniach przedmiotów do poziomu, który w określonych warunkach nie stanowi zagrożenia dla zdrowia człowieka [1].

Podstawowym procesem w postępowaniu higieniczno-sanitarnym ze skażonym instrumentarium medycznym, realizowanym w centralnej sterylizatorni, jest oczyszczanie, czyli usuwanie zanieczyszczeń natury fizycznej, chemicznej i biologicznej, zakończone redukcją drobnoustrojów w procesie dezynfekcji. Prawidłowo przeprowadzone oczyszczanie połączone z dezynfekcją końcową, stanowi warunek właściwej czystości mikrobiologicznej tzw. „czystego wyrobu medycznego”. Proces ten może doprowadzić do usunięcia 70–80% drobnoustrojów z powierzchni instrumentu [5].

6.1. Metody oczyszczania instrumentów

Oczyszczanie sprzętu jest pierwszym i najważniejszym krokiem w procesie odkażania, gdyż nawet mikroskopijne pozostałości materiału biologicznego mogą stanowić przeszkodę dla efektywnej sterylizacji. Do metod

Tabela I

Zalety i wady transportu instrumentów na sucho i na mokro [5]

Rodzaj transportu	Zalety	Wady
Transport na sucho	<ul style="list-style-type: none"> – mycie mechaniczne – brak piany z powodu użycia środków dezynfekcyjnych – brak koagulacji krwi i białek, brak konieczności płukania przed mechaniczną obróbką – niskie koszty – mniejsze zużycie środków dezynfekcyjnych przez szpital – zmniejszenie zanieczyszczenia środowiska naturalnego – ochrona personelu – ograniczony kontakt z preparatami dezynfekcyjnymi – oszczędność czasu 	<ul style="list-style-type: none"> – skażenie (stanowi ryzyko szerzenia i przenoszenia się infekcji na personel) – ryzyko wystąpienia korozji, jeśli czas oczekiwania jest dłuższy niż 6 godzin
Transport na mokro	<ul style="list-style-type: none"> – odkażanie w miejscu użycia – zapobieganie przenoszeniu się zakażeń na personel medyczny – zapobieganie zasychaniu krwi 	<ul style="list-style-type: none"> – koagulacja krwi i białek – wysokie koszty – duże zużycie środków dezynfekcyjnych – kontakt personelu ze środkami chemicznymi – zanieczyszczenie środowiska naturalnego – konieczność dodatkowego płukania przed myciem mechanicznym – ryzyko tworzenia się piany – czas jaki trzeba dodatkowo poświęcić na przygotowanie środków dezynfekcyjnych – uciążliwości związane z przygotowaniem roztworów roboczych – ryzyko korozji z powodu braku pełnej kontroli nad dozowaniem i przestrzeganiem czasu ekspozycji i temperatury

Tabela II

Kryteria skuteczności procesu manualnego oczyszczania instrumentów [wg 5, 20]

Etap manualnego oczyszczania instrumentów	Opis
Czyszczenie	miękkie szczotki
	ściereczki niepozostawiające nitek
	końcówki pistoletowe
Przecieranie elementów optyki endoskopów	wacik nasączony alkoholem
Przecieranie zdemontowanych elementów układów z napędem	niepyląca ściereczka nasączona roztworem środka myjącego i dezynfekcyjnego, nie stosować kąpeli zanurzeniowej
Płukanie	woda bieżąca
Usuwanie utrzymujących się zanieczyszczeń	krew – nadtlenek wodoru
	tłuszcz – alkohol
	pozostałości kleju – benzyna lub eter
Skoagulowane złoży nie dające się usunąć	instrumenty wycofać z użycia
Płukanie	woda demineralizowana (zapobiega tworzeniu się plam)

oczyszczania, które możemy zastosować w centralnych sterylizatorniach, zalicza się mycie ręczne, zraszanie, splukiwanie, czyszczenie zanurzeniowe, czyszczenie ultradźwiękami oraz mycie w automatycznych myjniach-dezynfektorach [5].

Skuteczność procesu manualnego oczyszczania instrumentów zależy od wielu czynników (tabela II). Do mycia manualnego należy stosować preparaty myjące niepowodujące denaturacji białka. Po dokładnym oczyszczeniu instrumentu można przeprowadzić jego dezynfekcję. Kryteria skuteczności procesu manualnej dezynfekcji instrumentów metodą zanurzeniową przedstawione są w tabeli III.

Preferowaną metodą oczyszczania jest mycie i dezynfekcja maszynowa. Hermetyczność procesu zapewnia bezpieczeństwo personelowi i środowisku szpitalnemu. Ważne jest respektowanie wskazówek producenta środka dezynfekującego i myjącego co do jego stężenia, czasu ekspozycji i temperatury działania oraz tolerancji materiałowej sprzętu. Istotne jest prawidłowe przygotowanie i ułożenie instrumentów na tacach i w koszach myjni-dezynfektora. Instrumenty o dużej powierzchni należy ułożyć tak, by nie zasłaniały i nie przeszkadzały w zmywaniu innych. Przyrządy przegubowe muszą być rozwarte, a instrumenty złożone należy rozłożyć na

części, zdjąć uszczelnienia i otworzyć zawory. Konieczne jest zapewnienie przepływu roztworu myjącego przez kanały wewnętrzne instrumentu. Narzędzia delikatne należy ułożyć tak, aby nie uległy uszkodzeniu w trakcie cyklu [4, 18, 20].

Kolejną metodą dekontaminacji stosowaną w centralnych sterylizatorniach jest oczyszczanie w myjni ultradźwiękowej. Może stanowić ono etap procesu dekontaminacji poprzedzający cykl czyszczenia w myjniach-dezynfektorach lub ostateczny proces mycia i dezynfekcji poprzedzający sterylizację. Aby optymalnie wykorzystać skuteczność ultradźwięków, należy uwzględnić szereg czynników (tabela IV). Należy zaznaczyć, że w kąpeli ultradźwiękowej nie wolno czyścić części systemów chirurgicznych z napędem, układów optycznych, kamer i światłowodów [5, 20].

6.2. Rodzaje i metody dezynfekcji

W cyklu reprocessowania instrumentów medycznych stosujemy – w zależności od kompatybilności materiałowej – następujące rodzaje dezynfekcji: chemiczną, termiczną i termiczno-chemiczną [9].

Dezynfekcja chemiczna znalazła szerokie zastosowanie w praktyce medycznej. Metoda ta polega na zastoso-

Tabela III

Kryteria skuteczności procesu manualnej dezynfekcji instrumentów metodą zanurzeniową [wg 10, 20]

Czas i temperatura – przestrzeganie zaleceń producenta
Właściwe stężenie roztworu środka dezynfekcyjnego
Dokładne rozpuszczenie środka dezynfekcyjnego w proszku
Właściwa temperatura roztworu środka dezynfekcyjnego
Właściwy czas ekspozycji instrumentu na roztwór środka dezynfekcyjnego
Tolerancja materiałowa instrumentu
Roztwory robocze środka dezynfekcyjnego muszą być świeżo przygotowane lub ich aktywność codziennie sprawdzona paskami testowymi
Instrument musi być zdemontowany i całkowicie zanurzony
Należy usunąć pęcherzyki powietrza z wewnętrznych światła instrumentu

Tabela IV

Czynniki warunkujące skuteczność dezynfekcji sprzętu w myjniach ultradźwiękowych [wg 5, 20]

Myjnię musi być napełniona do poziomu wskazanego przez producenta
Do wody należy dodać odpowiedni środek myjący lub myjąco-dezynfekujący
Zwracać uwagę na korelację stężenia, temperatury i czasu działania zastosowanego środka dezynfekującego
Zaleca się zastosowanie wody cieplej o temperaturze nie wyższej niż 50°C (wyższa temperatura może prowadzić do inkrustacji krwi na narzędziach)
Roztwór roboczy środka dezynfekcyjnego przed użyciem powinien być odgazowany
Instrumenty muszą być całkowicie zanurzone w roztworze środka dezynfekcyjnego
Instrumenty z przegubami muszą być rozwarte
Kąpiel należy przeprowadzać wyłącznie w koszach niezakłócających ultradźwięków (np. z drutu)
Instrumenty o dużych powierzchniach zaleca się układać pionowo lub na innych narzędziach tak, aby nie tłumiły ultradźwięków i nie tworzyły tzw. martwych stref
Kosze myjni nie mogą być przeładowane
Roztwór roboczy należy wymienić zgodnie z zaleceniami producenta, lecz nie rzadziej niż raz dziennie
Kąpiel powinna trwać około 3 minut przy częstotliwości ultradźwięków co najmniej 35 kHz
Po czyszczeniu instrumenty należy dokładnie wypłukać, najlepiej wodą demineralizowaną.

waniu roztworów związków chemicznych działających niszcząco na drobnoustroje (biobójczo) poprzez uszkodzenie lub denaturację błony komórkowej bakterii [5].

Dezynfekcja chemiczna stosowana jest w postaci zanurzeniowej metody odkażania. Substancjami aktywnymi w preparatach dezynfekcyjnych są alkohole, aktywny tlen, chlorowce, związki jodu, czwartorzędowe związki amoniowe, aldehydy (glutarowy, bursztynowy, mrówkowy), pochodne fenolu i pochodne biguanidyny. Preparaty te zawierają często mieszaninę kilku związków, takich jak inhibitory korozji, olejki eteryczne czy związki obniżające napięcie powierzchniowe. Dezynfekcja termiczna i termiczno-chemiczna jest stosowana podczas oczyszczania w myjniach-dezynfektorach. Profesjonalne myjnie-dezynfektory mogą być wykorzystane do dekontaminacji różnorodnego instrumentarium chirurgicznego – litych narzędzi chirurgicznych, mikronarzędzi, narzędzi zawierających trudnodostępne powierzchnie i kanały, endoskopów sztywnych i optyk endoskopowych. Procesy mycia i dezynfekcji odbywają się w szczelnie zamkniętej komorze przez wielokrotne spryskiwanie instrumentów – najpierw roztworem detergentu alkalicznego, a następnie roztworem kwaśnego neutralizatora. Oczyszczone instru-

menty poddawane są dezynfekcji termicznej w temperaturze 93–95°C przez 10 minut, z wykorzystaniem gorącej wody (wyroby termostabilne) lub dezynfekcji termiczno-chemicznej w temperaturze 60–65°C przez 10 minut, z wykorzystaniem roztworu preparatu dezynfekcyjnego, przeznaczonego do dezynfekcji maszynowej (wyroby termolabilne) [18].

6.3. Kontrola procesu oczyszczania i dezynfekcji

Najbardziej znaną i nadal najczęściej stosowaną metodą dezynfekcji sprzętu medycznego jest metoda zanurzeniowa, która wymaga bardzo dokładnego oczyszczenia manualnego instrumentów przed jej zastosowaniem. Skuteczność tej metody jest więc uzależniona od czynnika ludzkiego, który może być trudny do skontrolowania i zwalidowania. Norma PN EN ISO 15883 1–4, dotycząca mycia i dezynfekcji sprzętu, wyraźnie wskazuje na stosowanie w procedurach dekontaminacyjnych wyłącznie procesów zautomatyzowanych [12, 14]. Od człowieka możemy w tym przypadku wymagać nadzoru przebiegu manualnych etapów dekontaminacji oraz ustawicznego szkolenia.

Tabela V

Testy kontrolujące skuteczność procesów oczyszczania i dezynfekcji [wg 7, 8, 12]

Aparatura	Rodzaj procesu	Test	Ocena skuteczności
Myjnia ultradźwiękowa	działanie ultradźwięków	kontrola kawatycyjna – test fiołkowy	zmiana zabarwienia pod wpływem siły stymulacji ultradźwięków
	zanieczyszczenia białkowe	test chemiczny – reakcja enzymatyczna	zmiana zabarwienia: wykrywanie obecności krwi lub białka ($\geq 0,1 \mu\text{g}$)
Myjnie – dezynfektory	mycie	testy chemiczne	wykrywanie krwi, fibryny, polisacharydów
	dezynfekcja termiczna	test chemiczny	zmiana zabarwienia po osiągnięciu parametrów dezynfekcji
		test biologiczny	brak wzrostu <i>E. faecium</i> po inkubacji

Obecnie na rynku dostępne są testy kontrolujące skuteczność zautomatyzowanych procesów oczyszczania i dezynfekcji w aparaturze do tego przeznaczonej (tabela V).

7. Suszenie

Kolejnym ogniwem łańcucha czynności dekontaminacyjnych jest suszenie. W przypadku manualnego przygotowania sprzętu musi ono nastąpić natychmiast po myciu i dezynfekcji instrumentów w celu uniknięcia namnażania drobnoustrojów. Optymalną i zalecaną do tego celu metodą jest zastosowanie suchego sprężonego powietrza. Stosując automatyczny cykl mycia i dezynfekcji suszenie powinno być zapewnione w działaniu myjni-dezynfektora. Przebiega ono w temperaturze 60–100°C, w zależności od programu [1].

8. Podsumowanie

Dekontaminacja narzędzi i sprzętu medycznego to praktyczne działania mające na celu redukcję liczby drobnoustrojów do poziomu bezpiecznego dla pacjenta. Cykl prawidłowo wykonywanych czynności dekontaminacyjnych jest zatem jednym z podstawowych elementów higieny szpitalnej, mającym na celu zapobieganie i zwalczanie zakażeń szpitalnych.

Ogniwa łańcucha czynności dekontaminacyjnych są mocno ze sobą połączone, a jedno z nich stanowi czynnik ludzki. Działania człowieka na każdym etapie procesu warunkują jego skuteczność.

W części II niniejszej pracy zawarto omówienie rodzajów opakowań i zasad pakowania instrumentów, zasad załadunku komory sterylizatora, metod sterylizacji i kontroli jej skuteczności, warunków zwalniania produktu końcowego, warunków transportu do użytkownika oraz warunków przechowywania wyrobów sterylnych, a także problem związany z reprocessowaniem sprzętu jednorazowego użytku.

Piśmiennictwo

1. Czaplinski J.: Cechy charakterystyczne nowoczesnej sterylizacji szpitalnej. *Zakażenia*, **8**, 7–10 (2008)
2. Czaplinski J.: Nowoczesne rozwiązania w sterylizacji szpitalnej. *Zakażenia*, **8**, 8–10 (2008)
3. Fleischer M., Choroszy-Król I.: Sterylizacja – aktualne zalecenia. *Essentia Medica*, **24**, 68–72 (2005)
4. Gaudzińska E.: Centralizacja procesów dezynfekcji i sterylizacji w placówkach służby zdrowia. Materiały szkoleniowe do kursu kwalifikacyjnego I^o dla pracowników sterylizatorni organizowany przez Aesculap Akademię, PZH, DGSV, Warszawa 25.05.–05.06.2008 r.
5. Gaudzińska E.: Procesy dekontaminacji w działaniach praktycznych w dziale centralnej sterylizacji cz. I. Materiały szkoleniowe do kursu kwalifikacyjnego I^o dla pracowników sterylizatorni organizowany przez Aesculap Akademię, PZH, DGSV, Warszawa 25.05.–05.06.2008 r.
6. Grzesiowski P.: Sterylizacja – krytyczne ogniwo systemu kontroli zakażeń szpitalnych. Pełną parą. *Menedżer Zdrowia*, **8**, 52–57 (2008)
7. Jakimiak B., Röhm-Rodowald E., Staniszevska M.: Ocena skuteczności mycia w myjniach – dezynfektorach. *Zakażenia*, **7**, 8–14 (2007)
8. Kanclerski K., Kuszewski K., Tadeusiak B.: Wybrane zasady ochrony pracowników medycznych przed zawodowymi zagrożeniami medycznymi. PZH: Warszawa, 2001
9. Karolczak W.: Metody dezynfekcji i sterylizacji. *Farm. Pol.*, **64**, 85–87 (2008)
10. Kutrowska E.: Chemiczne środki dezynfekcyjne do powierzchni i narzędzi. *Zakażenia*, **8**, 12–13 (2008)
11. Olszak W.: Zasady sterylizacji narzędzi i sprzętu medycznego, prowadzenie dokumentacji procesów sterylizacji oraz przechowywanie sterylnych wyrobów. *Przewodnik Menedżera Zdrowia*, **4**, 74–78 (2001)
12. Olszak W.: Monitorowanie procesów automatycznego mycia i dezynfekcji. *Zakażenia*, **8**, 11–12 (2008)
13. Olszak W.: Nowe technologie maszynowego mycia i dezynfekcji. *Zakażenia*, **9**, 18–22 (2009)
14. Olszak W.: Procesy mycia i dezynfekcji manualnej i maszynowej instrumentarium medycznego. Materiały z konferencji PSR-SiDM Sterylizacja wyrobów medycznych w warunkach zakładu ochrony zdrowia. Wymagania merytoryczne i prawne, Olsztyn 17.12. 2009 r.
15. Owczarska A.M.: Zadania na rzecz bezpieczeństwa w dziedzinie sterylizacji i dezynfekcji szpitalnej. *Zakażenia*, **9**, 23–25 (2009)
16. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 10.11. 2006 r. w sprawie wymagań, jakim powinny odpowiadać pod względem fachowym i sanitarnym pomieszczenia i urządzenia zakładów opieki zdrowotnej (Dz.U.06.213.1568).
17. Świtalski S.: Dezynfekcja narzędzi medycznych. *Zakażenia*, **3/4**, 31–32 (2002)
18. Świtalski S.: Mycie i dezynfekcja maszynowa narzędzi medycznych w warunkach szpitalnych. *Zakażenia*, **5**, 8–22 (2004)
19. Waszak B.: Dekontaminacja obowiązkowa, określona w aktualnie obowiązujących regulacjach merytoryczno-prawnych. *Zakażenia*, **6**, 8–13 (2006)
20. Zespół roboczy ds. przygotowania instrumentarium medycznego: Prawidłowy sposób przygotowania instrumentarium medycznego, wyd. 4 (2011)

PRZYGOTOWANIE INSTRUMENTARIUM MEDYCZNEGO DO ZABIEGÓW CHIRURGICZNYCH. CZĘŚĆ II – STERYLIZACJA I REPROCESOWANIE

Beata Sokół-Leszczynska^{1*}, Elżbieta Sztark², Piotr Leszczyński^{1,3},
Grażyna Młynarczyk⁴, Marta Wróblewska^{1,5}

¹Pracownia Epidemiologii Zakażeń Szpitalnych, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej,
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

²Centralna Sterylizatornia, Samodzielny Publiczny Zespół Zakładów Opieki Zdrowotnej, Płońsk

³Zespół Kontroli Zakażeń Szpitalnych, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus
– Centrum Leczenia Obrażeń, Warszawa

⁴Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

⁵Zespół Kontroli Zakażeń Szpitalnych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wstęp. 2. Kontrola i konserwacja narzędzi 3. Rodzaje opakowań sterylizacyjnych i zasady pakowania narzędzi do sterylizacji. 4. Załadunek komory sterylizatora. 5. Sterylizacja i jej kontrola 6. Transport do użytkownika. 7. Warunki przechowywania wyrobów sterylnych. 8. Reprocesowanie sprzętu jednorazowego użytku. 9. Podsumowanie

Medical instrument preparation for surgical procedures. Part II – sterilisation and reprocessing

Abstract: Sterilisation constitutes another step in the reprocessing cycle of medical instruments. It aims at killing all types of microorganisms and spores. Preferably it should be performed by highly qualified personnel of the central sterilisation unit at the hospital.

This part of the paper covers drying, control and maintenance of medical instruments, packaging, methods of sterilisation and its control, and releasing of sterile medical instruments. Problem of reprocessing of the single use devices is also discussed.

1. Introduction. 2. Inspection and maintenance of instruments. 3. Types of sterilisation packaging and principles of packing instruments for sterilization. 4. Loading of the sterilisation chamber. 5. Sterilisation and its control. 6. Transport to the user. 7. Storage. 8. Reprocessing of single use instruments. 9. Summary

Słowa kluczowe: instrumentarium medyczne, pakowanie, sterylizacja, reprocesowanie

Key words: medical instrumentation, packaging, sterilisation, reprocessing

1. Wstęp

W części I opisano podział instrumentów medycznych, czynniki wpływające na efektywność procesu dekontaminacji, zalety posiadania centralnej sterylizatorni, cykl przygotowania narzędzi do użycia, ich transport od użytkownika, a także oczyszczanie i dezynfekcję sprzętu.

Omówione wcześniej procesy dekontaminacji są niezbędnym warunkiem skuteczności procesu sterylizacji instrumentów medycznych. Narzędzia chirurgiczne są tzw. przedmiotami wysokiego ryzyka transmisji zakażenia, które ze względu na kontakt z tkankami muszą być sterylne. Odpowiedzialność za sterylność sprzętu wielorazowego użycia spoczywa na jednostce dokonującej cyklu czynności dekontaminacyjnych, zakończonych procesem sterylizacji. Zagadnienia dotyczące sterylizacji wyrobów medycznych zostały zawarte w normach EN oraz ISO [3].

2. Kontrola i konserwacja narzędzi

Przed procesem sterylizacji narzędzia muszą być sprawdzone wizualnie pod kątem czystości i drożności ich światła. Szczególną uwagę należy zwrócić na tzw. miejsca krytyczne (np. rowki, ząbki w mechanizmach automatycznych, uchwyty, szczeliny i przeguby). Niedoczyszczone lub niedrożne instrumenty muszą zostać ponownie poddane dekontaminacji i dezynfekcji, z uwzględnieniem zaleceń producenta [7].

Kolejnym etapem jest konserwacja narzędzi i sprawdzenie ich działania. Konserwacja zabezpiecza narzędzia przed korozją przez stosowanie na przeguby, gwinty, śruby i płaszczyzny poślizgu środków na bazie oleju parafinowego, przepuszczających parę i biokompatybilnych (zgodnie z obowiązującą farmakopeą europejską). Funkcjonowanie narzędzi należy sprawdzić zgodnie z odpowiednimi instrukcjami. Zdemontowane instrumenty do chirurgii mikroinwazyjnej należy

* Autor korespondencyjny: Pracownia Epidemiologii Zakażeń Szpitalnych, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

skontrolować po ich zmontowaniu, a w światłowodach i endoskopach sztywnych ocenić jakość włókien [7].

Po wykonaniu czynności konserwujących i sprawdzeniu działania instrumentów zadaniem pracowników jest ułożenie ich w zestawy zgodnie ze spisami narzędziami ustalonymi przez użytkowników.

3. Rodzaje opakowań sterylizacyjnych i zasady pakowania narzędzi do sterylizacji

Instrumenty medyczne poddawane sterylizacji, wymagające czasowego przechowywania lub transportu, muszą być sterylizowane w odpowiednim opakowaniu. Zadaniem takiego opakowania jest zachowanie sterylności jego zawartości od momentu zakończenia procesu sterylizacji do chwili użycia. Obecnie istnieje znormalizowany system opakowań sterylizacyjnych, który zapewnia wszystkie kryteria utrzymania sterylności wyrobu medycznego (PN EN 868). Dokument ten nakłada na producenta obowiązek wykazania przydatności opakowania do konkretnego zastosowania. W tabeli I wymienione są kryteria, jakie powinny spełniać opakowania sterylizacyjne.

3.1. Rodzaje opakowań sterylizacyjnych

Możliwość wykorzystania danego opakowania do określonej metody sterylizacji musi udokumentować producent opakowania. Opakowania sterylizacyjne dzielą się na jednorazowe i wielorazowe, o różnym przeznaczeniu (tabela II).

Nie wolno stosować jako opakowań sterylizacyjnych materiałów tekstylnych, papieru siarczynowego lub puszek Schimmelbuscha, gdyż nie stanowią one bariery dla drobnoustrojów [3, 8].

Zastosowanie właściwego, specjalistycznego opakowania do sterylizacji wyrobów medycznych, daje gwa-

rancję utrzymania sterylności przechowywanego w nim jałowego wyrobu [8].

3.2. Zasady pakowania narzędzi do sterylizacji

Istotnym elementem zachowania jałowości wysterylizowanych narzędzi jest właściwe zapakowanie ich tak, by nie doszło do uszkodzenia opakowania. Sposób opakowania musi także zapewnić możliwość aseptycznego wyjęcia zawartości [3, 8]. Przygotowując instrumenty medyczne do zabiegów chirurgicznych należy zastosować system podwójnego pakowania, gdyż stanowi on zabezpieczenie przed wtórną kontaminacją z zewnętrznej warstwy opakowania. Zasady właściwego pakowania narzędzi do sterylizacji przedstawione są w tabeli III.

4. Załadunek komory sterylizatora

W celu zapewnienia prawidłowej penetracji czynnika sterylizującego i w następstwie osiągnięcia zakładanego efektu procesu, należy pamiętać o ważnych zasadach obowiązujących podczas załadunku komory sterylizatora.

Ciężkie, łatwiej kondensujące wodę materiały należy układać na dole komory, lekkie natomiast na górze, aby uchronić je przed zamoczeniem wodą kondensacyjną. Minimalne wypełnienie komory nie powinno być mniejsze niż 1/6 jej objętości, gdyż resztki powietrza koncentrują się wokół małego ładunku, co może stanowić przeszkodę dla przenikania pary i przyczynę nieprawidłowej sterylizacji. Materiał w opakowaniach papierowo-foliowych należy układać według schematu: folia na folię, papier na papier, ponieważ przenikanie pary i powietrza zachodzi wyłącznie przez powierzchnię papierową. Kosze nie mogą być wypełnione zbyt szczelnie lub zbyt luźno (pomiędzy pakiety powinno być możliwe włożenie wyprostowanej ręki). Sterylizowane mate-

Tabela I

Cechy opakowania sterylizacyjnego [10]

- dobre przenikanie czynnika sterylizującego do wnętrza opakowania
- odporność na uszkodzenie podczas procesu sterylizacji
- zapewnienie szczelnego, trwałego zamknięcia zawartości oraz bezpiecznego wyjęcia jej do ponownego użycia
- barierowość dla drobnoustrojów oraz niepożądanych substancji typu klej, tusz z nadruku czy testu chemicznego

Tabela II

Zastosowanie opakowań sterylizacyjnych [10]

Rodzaj opakowania sterylizacyjnego	Zastosowanie
Jednorazowe opakowania papierowe	sterylizacja parą wodną w nadciśnieniu lub tlenkiem etylenu
Opakowania papierowo-foliowe (folia poliestrowa/polipropylenowa)	sterylizacja parą wodną w nadciśnieniu, formaldehydem lub tlenkiem etylenu
Opakowania typu TYVEK (folia poliestrowa/polipropylenowa)	sterylizacja plazmą, tlenkiem etylenu lub formaldehydem
Pojemniki sterylizacyjne wielorazowego użytku	sterylizacja parą wodną w nadciśnieniu

Tabela III

Zasady pakowania narzędzi do sterylizacji [1]

Rodzaj opakowania sterylizacyjnego	Zasady pakowania narzędzi
Jednorazowe opakowania sterylizacyjne	torebki należy wypełnić tylko do 3/4 objętości w celu umożliwienia prawidłowego wykonania zgrzewu i zminimalizowania ryzyka pęknięcia opakowania
	między zgrzewem a sterylizowanym sprzętem powinna być zachowana odległość 30 mm
	ostre krawędzie należy zabezpieczyć, aby uniknąć uszkodzenia opakowania
	materiał opakowaniowy nie może być ułożony zbyt luźno, ani być zbyt naciągnięty, aby nie wpływał na zmiany ciśnienia podczas sterylizacji
Wielowarstwowe opakowania papierowo-foliowe	sprzęt należy układać tak, aby strona papierowa stykała się ze stroną papierową, gdyż penetracja czynnika sterylizującego i wymiana powietrza może zachodzić wyłącznie przez papier
	na zewnątrz opakowań umieścić wskaźnik procesu (odpowiedni do metody sterylizacji)
Pojemniki sterylizacyjne wielorazowego użytku	przed użyciem pojemnik umyć i zdezynfekować
	dbać o wymianę filtra zgodnie z instrukcją producenta
	instrumenty należy umieszczać na tacach narzędziowych owiniętych w materiał opakowaniowy (materiał opakowaniowy i pojemnik stanowią podwójne opakowanie sprzętu sterylnego)
	pokrywę pojemnika należy zamknąć i zabezpieczyć systemem chroniącym przed przypadkowym otwarciem go (np. plombą)
	na opakowaniu należy umieścić etykietę z informacją o zawartości opakowania, kod osoby pakującej, datę sterylizacji i datę przydatności do użycia oraz parametry sterylizacji

riały nie mogą dotykać ściany sterylizatora, a pojemniki, miski i butelki muszą być ustawione wlotem ku dołowi. Komora nie może być przeładowana – należy przestrzegać wytycznych producenta dotyczących maksymalnej wielkości wsadu [3, 6, 8].

5. Sterylizacja

Sterylicacja jest procesem mającym na celu zabicie wszystkich drobnoustrojów i przetrwalników bakteryjnych oraz stanowi kolejny etap reprocessowania instrumentów medycznych. Jej celem jest osiągnięcie efektu SAL 10^{-6} . Wartość SAL 10^{-6} (SAL – Sterility Assurance Level) jest to gwarantowany poziom sterylności oznaczający w praktyce możliwość przeżycia w wysterylizowanym pakiecie jednego drobnoustroju na milion [1, 7, 12, 17].

Dobór metody i parametrów sterylizacji powinien być określony przez producenta sprzętu medycznego. Istotna jest dobra penetracja czynnika sterylizującego, szybki czas działania, niezawodność, brak toksyczności dla człowieka i środowiska oraz niska cena i tania eksploatacja. Proces ten nie może uszkadzać ani zmieniać właściwości sterylizowanego materiału [3, 6].

5.1. Metody sterylizacji

Metody sterylizacji można podzielić na wysoko- i niskotemperaturowe. Do metod wysokotemperaturowych zalicza się sterylizację parą wodną pod ciśnieniem oraz sterylizację suchym gorącym powietrzem. Najczęściej stosowane metody sterylizacji niskotemperaturowej to zastosowanie tlenku etylenu, formaldehydu lub plazmy gazu. Mniej popularne sposoby to sterylizacja w ciekłym kwasie nadoctowym, ozonem lub za pomocą promieniowania jonizującego [3, 5, 6].

W praktyce szpitalnej najczęściej stosowaną metodą jest sterylizacja parą wodną pod ciśnieniem. Czynnikiem sterylizującym jest nasycona para wodna w ciśnieniu wyższym od atmosferycznego. Jest to metoda, szybka, nietoksyczna i ekonomiczna, toteż powinna być stosowana zawsze, gdy tylko to jest możliwe. Powszechnie stosuje się dwa sposoby sterylizacji parowej: sterylizację w temperaturze 134°C w nadciśnieniu 2 atmosfer w czasie 3,5–7 minut oraz 121°C w nadciśnieniu 1 atmosfery w czasie 15–20 minut. Metoda ta ma zastosowanie do wyjaławiania instrumentów medycznych odpornych na wysoką temperaturę.

Sterylicacja suchym gorącym powietrzem ma zastosowanie do wyjaławiania maści, pudrów, szkła laboratoryjnego oraz roztworów oleistych. Należy podkreślić, że ta metoda nie może być stosowana do sterylizacji instrumentarium medycznego. Czynnikiem sterylizującym jest tu powietrze o temperaturze $160\text{--}200^{\circ}\text{C}$ w czasie 30–150 minut [16].

Sterylicacja niskotemperaturowa tlenkiem etylenu służy do wyjaławiania sprzętu termolabilnego niezawierającego elementów gumowych. Czynnikiem sterylizującym jest tlenek etylenu czysty lub zmieszany z hydroksyfreonem bądź z dwutlenkiem węgla. Sterylizacja przebiega w temperaturze $30\text{--}65^{\circ}\text{C}$, w czasie 2–5 godzin. Jest to metoda nieprzyjemna dla środowiska, kosztowna oraz czasochłonna [3]. Tlenek etylenu jest toksyczny, a podczas ekspozycji narzędzi dochodzi

do adsorpcji gazu na powierzchni instrumentu, dlatego przed użyciem u pacjenta konieczna jest degazacja wysterylizowanego sprzętu. Dotąd trwało to około 7 dni, lecz aktualnie dostępne są sterylizatory, w których możliwa jest szybka, aktywna degazacja.

Sterylizacja formaldehydem stosowana jest do sprzętu wrażliwego na wysoką temperaturę. Przebiega w temperaturze 48–70°C. Formaldehyd jest gazem niepalnym, niewybuchowym, wyczuwalnym w stężeniu nietoksycznym. Posiada słabsze niż tlenek etylenu właściwości penetrujące, dlatego sterylizacja sprzętu o wąskich, długich światłach jest utrudniona. Przedmioty z gumy, celulozy lub poliuretanu powinny być poddane degazacji [3, 6].

Sterylizacja plazmowa polega na poddawaniu sprzętu działaniu nadtlenu wodoru (gaz), z którego pod wpływem pola elektrycznego wytwarzana jest plazma. Do jej wytworzenia stosowany jest najczęściej 50–55% nadtlenu wodoru. Sterylizacja zachodzi w temperaturze 40–60°C, w czasie 45–75 minut. Tą metodą nie można sterylizować sprzętu z długimi, wąskimi, ślepo zakończonymi kanałami, jak również stosować opakowań zawierających celulozę [3]. Jest to metoda przyjazna dla środowiska, jednak sprzęt do sterylizacji plazmowej jest drogi w eksploatacji.

Sterylizacja w ciekłym kwasie nadoctowym jest procesem niskotemperaturowym i przebiega w temperaturze 50–55°C w specjalnych sterylizatorach. Cały cykl trwa 30 minut. Metoda polega na poddaniu działaniu kwasu nadoctowego instrumentów termolabilnych, odpornych na zanurzenie. Kwas nadoctowy służy do szybkiej sterylizacji instrumentu bezpośrednio przed użyciem, gdyż sprzęt poddawany tego rodzaju procesowi jest nieopakowany, w związku z czym wyjęty sprzęt musi być natychmiast użyty do zabiegów czy badań diagnostycznych. Ten rodzaj sterylizacji może być stosowany w warunkach sali operacyjnej czy gabinetu zabiegowego [6].

Sterylizacja za pomocą promieniowania jonizującego polega na naświetlaniu sprzętu dużymi dawkami promieni gamma. Ze względu na konieczność ochrony radiologicznej i wysokie koszty, metoda ta jest stosowana przede wszystkim przez producentów do wyjąłowania sprzętu jednorazowego użytku [6].

5.2. Kontrola sterylizacji

Proces sterylizacji jest zespołem czynności, w wyniku których zostaje wytworzony wyrób jałowy. Kontrola procesu stanowi udokumentowanie jego jakości poprzez sprawdzenie parametrów. Metody kontroli procesu sterylizacji dzielą się na fizyczne, chemiczne i biologiczne.

Wskaźniki fizyczne to wszystkie przyrządy pomiarowe, w które sterylizator został wyposażony przez producenta. Dzięki nim możemy kontrolować temperaturę, ciśnienie i czas trwania procesu. Każdy cykl powinien być kontrolowany w ten sposób, a parametry zapisane

przez rejestrator zintegrowany z urządzeniem stanowią dokument sprawności sterylizatora. Stwierdzenie nieprawidłowości w zapisie parametrów oznacza, że sterylizator należy uznać za niesprawny i wyłączyć z eksploatacji [8].

Wskaźniki chemiczne dostarczają informacji na temat warunków w komorze sterylizatora, sygnalizując tym samym potencjalne błędy. Zgodnie z międzynarodową normą ISO 11140-1 wskaźniki zostały podzielone na klasy (tabela IV).

Wskaźniki biologiczne stanowią przetrwalniki bakteryjne o dużej oporności na czynnik sterylizujący. Dla sterylizacji parą wodną stosuje się spory *Geobacillus stearothermophilus*, dla sterylizacji tlenkiem etylenu – spory *Bacillus subtilis*, a dla sterylizacji formaldehydem – spory obu gatunków. Dostępne na rynku wskaźniki biologiczne mają najczęściej postać krążków bibułowych nasączonych zawiesiną przetrwalników lub testów fiolkowych (inkubowane odpowiednio 7 lub 2 dni). Kontrolę biologiczną należy wykonywać nie rzadziej niż raz w miesiącu, a także każdorazowo po naprawie sterylizatora oraz stwierdzeniu nieprawidłowości za pomocą wskaźników chemicznych. W przypadku sterylizacji tlenkiem etylenu czy formaldehydem, każdy cykl sterylizacji należy kontrolować wskaźnikami biologicznymi [1, 6, 16].

5.3. Zwalnianie produktu sterylnego

Po zakończeniu procesu sterylizacji pakiety wyjęte z komory sterylizatora powinny być bardzo dokładnie sprawdzone pod względem ich szczelności i oczekiwanej zmiany barwy testów kontrolnych, np. testu kontroli wsadu, wskazując na prawidłową ekspozycję pakietu na czynnik sterylizujący. Pakiety powinny być poddane procesowi powolnego schłodzenia, podczas którego powinno nastąpić odparowanie resztek wilgoci po sterylizacji. Analiza zarejestrowanych pomiarów temperatury, czasu ekspozycji i ciśnienia podczas cyklu, wynik kontroli chemicznej oraz kontroli biologicznej stanowią podstawę do stwierdzenia prawdopodobieństwa uzyskania założonego efektu sterylności SAL 10^{-6} . Prawidłowe wyniki całego systemu kontroli stanowią podstawę do zwolnienia produktu sterylnego do użycia [3].

Zachowanie jałowości do momentu użycia zależy jednak nie tylko od prawidłowego przebiegu procesu sterylizacji. Dalsze czynniki warunkujące jałowość pakietu to transport, odpowiednie przechowywanie i prawidłowe użycie [2].

5.4. Organizacja procesów sterylizacji w szpitalu

Optymalnym i zalecanym miejscem przeprowadzania sterylizacji sprzętu jest centralna sterylizatornia składająca się z trzech stref – brudnej, czystej i sterylnej. Każda ze stref posiada różne wymagania pod względem czystości mikrobiologicznej i służy do realizacji innych zadań.

Tabela IV

Wskaźniki chemiczne stosowane w kontroli procesu sterylizacji [na podstawie 8]

Klasa	Rodzaj	Opis
I	Przeznaczone są do odróżnienia pakietów poddanych sterylizacji od oczekujących na sterylizację	Są to etykiety, taśmy, nadruki na opakowaniach, zmieniające barwę pod wpływem temperatury lub czynnika sterylizującego.
		Nie świadczą o jakości procesu.
II	Testy typu Bowiego-Dicka w formie arkuszy testowych umieszczanych w stosie serwet płóciennych, gotowe pakiety jednorazowe symulujące pakiet wykonany z serwet	Testy te kontrolują sprawność sterylizatora (jakość i penetracja pary) oraz usuwanie powietrza.
		Stosowane są w urządzeniach z próżnią wstępną.
		Pozytywny wynik świadczy o sprawności sterylizatora.
		Każde urządzenie codziennie przed dopuszczeniem do eksploatacji powinno być skontrolowane testem Bowiego-Dicka, a wynik testu dołączony do dokumentacji procesu.
		Testy stosowane w urządzeniach testowych rurowych symulacyjnych PCD (ang. Process Challenge Devices)
		Służą do stworzenia najtrudniejszych warunków penetracji czynnika sterylizującego.
		Składają się z kapsuły na wskaźnik chemiczny oraz rurki o różnej średnicy, długości i sposobie zwinięcia.
		Zmiana barwy wskaźnika świadczy, iż czynnik sterylizujący oddziaływał na test.
III	Wskaźniki jednoparametrowe	Wskaźniki reagujące na jeden wybrany parametr procesu.
		Zmiana koloru wskaźnika nie jest dowodem skuteczności sterylizacji.
IV	Wskaźniki wieloparametrowe	Reagują na dwa parametry, np. czas i temperatura w przypadku pary wodnej.
		Osiągnięcie wymaganych wartości dwóch parametrów powoduje zmianę zabarwienia wskaźnika – dowód skuteczności.
V	Wskaźniki zintegrowane	Reagują po osiągnięciu wszystkich parametrów krytycznych dla określonego procesu np. parą wodną, czy tlenkiem etylenu.
		Są to wartości wymagane do zabicia drobnoustrojów testowych.
		Zmiana barwy odczynnika następuje w czasie, w jakim ulega inaktywacji 90% mikroorganizmów wskaźnika biologicznego.
		Prawidłowy wynik oznacza podobny poziom bezpieczeństwa jak przy wskaźniku biologicznym.
VI	Wskaźniki emulacyjne	Wskaźniki, które również reagują po osiągnięciu wszystkich parametrów krytycznych procesu.
		Są zaprojektowane dla określonych warunków cyklu, np. 134°C – 5 minut, 121°C – 15 minut czy 134°C – 7 minut oraz mają mniejsze niż wskaźnik klasy V zakresy tolerancji dla poszczególnych parametrów krytycznych procesu.

W strefie brudnej materiały skażone są przyjmowane i oczyszczane, w czystej – pielęgnowane, kontrolowane, kompletowane, pakietowane i umieszczane w komorze sterylizatora, natomiast strefa sterylna umożliwia bezpieczne wyładowanie jałowego sprzętu, kontrolę procesu sterylizacji, magazynowanie i ekspedycję materiałów sterylnych. Strefy powinny być oddzielone śluzami umywalkowo-fartuchowymi, w których pracownik ma możliwość zmiany odzieży i obuwia oraz umycia i dezynfekcji rąk. Trójstrefowość sterylizatorni, obecność śluz i stosowanie przelotowych urządzeń do realizacji usługi dekontaminacji stanowią logistyczny system barier epidemiologicznych, mający na celu jeden kierunek przepływu instrumentów w procesie reprocessowania. Każdy krok wstecz stanowi zagrożenie dla efektu końcowego SAL 10^{-6} [1, 7, 12, 17].

Wszystkie czynności w ciągu technologicznym dekontaminacji instrumentarium medycznego wymagają szerokiego zasobu wiedzy dotyczącej zasad postępowania, niebezpieczeństw i zagrożeń. Dostęp do takiej wiedzy związanej z technologią dekontaminacji jest jednak wciąż bardzo ograniczony. Nie ma też wymogu prawnego jednorodnego systemu kształcenia dla osób zajmujących się dezynfekcją i sterylizacją medyczną.

6. Transport do użytkownika

Transport wyrobów sterylnych powinien odbywać się czystymi wydzielonymi ciągami komunikacyjnymi w specjalnych wózkach transportowych. Pakiety sterylne powinny być umieszczone w dodatkowych opakowaniach transportowych, np. w sztywnych pojemnikach

z pokrywą. Podczas transportu należy zachować ostrożność, by nie spowodować mechanicznych uszkodzeń jednorazowych opakowań [6].

7. Warunki przechowywania wyrobów sterylnych

Utrzymanie sterylności zawartości pakietu zależy w dużym stopniu od sposobu przechowywania. Powierzchnie w magazynie sprzętu sterylnego powinny być czyste i łatwe do dezynfekcji, wolne od insektów [6, 8]. Temperatura powietrza powinna oscylować w zakresie 15–25°C, a wilgotność 40–60%. Materiały sterylne należy przechowywać w szafach i chronić przed wilgocią, wodą rozpryskową, a także kontaktem ze środkami dezynfekcyjnymi.

Sposób magazynowania pakietu sterylnego determinuje okres jego przydatności do użycia. Okres przechowywania w przytoczonych wyżej warunkach wynosi dla podwójnego opakowania papierowego – 1 miesiąc, a w przypadku opakowania papierowo-foliowego – pół roku. Przy złych warunkach przechowywania okresy te należy skrócić [6].

8. Reprocesowanie sprzętu jednorazowego użytku

Reprocesowanie jest to ciąg technologiczny obejmujący szereg czynności, które należy wykonać, aby zanieczyszczone w trakcie zabiegu narzędzia nadawały się do ponownego użycia. Główne etapy reprocesowania to: oczyszczanie, dezynfekcja, płukanie, suszenie, kontrola funkcjonalności, konserwacja, pakowanie, sterylizacja oraz weryfikacja jakościowa wyrobu medycznego i wykonanie testów funkcyjnych pozwalających na przekazanie użytkownikowi wyrobu sterylnego, z zachowaniem jego pełnej sprawności funkcjonalnej [1].

Reprocesowanie narzędzi może być sposobem na zmniejszenie wydatków szpitali. Jednocześnie należy mieć świadomość zagrożeń wynikających ze stosowania wyrobu reprocesowanego – jeżeli wyrób nie może zostać prawidłowo zdekontaminowany, jego sterylizacja będzie nieskuteczna [4].

W Stanach Zjednoczonych w 2000 r. przyjęto dokumenty rekomendowane przez FDA (Food and Drug Administration), dotyczące reprocesowania i ponownego użycia wyrobów medycznych jednorazowego użytku. Wg FDA szpital, który zamierza stosować samodzielnie reprocesowanie, musi mieć zwalidowany proces sterylizacji (w odniesieniu do każdego reprocesowanego wyrobu jednorazowego użytku), rutynowy monitoring procesu sterylizacji oraz schemat technologiczny zapewniający, że jedynie wyrób sterylny może zostać przekazany użytkownikowi [9]. Ponadto reprocesor jest odpowiedzialny za produkt (tak jak pierwotny wytwórca do chwili pierwszego użycia). W dokumentach FDA podano wykaz wyrobów medycznych, które mogą być reprocesowane. Każdy nowy produkt zanim

zostanie umieszczony na tej liście wymaga zgody FDA. Ponadto, FDA prowadzi kwalifikacje sprzętu do grupy kilkukrotnego użycia oraz wskazuje ile razy ten jednorazowy wyrób może być sterylizowany [4].

W Unii Europejskiej do 2007 roku obowiązywała Dyrektywa EN 93/42, która nie rozgraniczała wyrobów na jedno- i wielorazowego użytku, nie istniał również unijny przepis zabraniający reprocesowania tzw. jednorazówek. Nowa Dyrektywa 90/385/EWG zaleca, aby jednorazowe wyroby medyczne posiadały informację, że są przeznaczone do jednorazowego użytku. Natomiast w Dyrektywie 2007/47/WE zdefiniowano wyrób jednorazowego użytku jako wyrób przeznaczony do użytku tylko jeden raz u jednego pacjenta, określono, że wskazanie o przeznaczeniu do jednorazowego użycia jest spójne we wszystkich krajach Unii Europejskiej oraz nałożono na wytwórcę obowiązek oznaczenia wyrobu medycznego jednorazowego użytku w jednoznaczny i widoczny sposób oraz zamieszczenie w instrukcji użytkownika wszystkich znanych mu informacji na temat właściwości i czynników technicznych, które mogłyby stwarzać ryzyko w przypadku powtórnego użycia [15, 16].

W 2010 roku SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) w Parlamencie Europejskim opublikował sprawozdanie na temat bezpieczeństwa poddanych reprocesowaniu wyrobów medycznych jednorazowego użytku. Komitet wskazywał na trzy podstawowe zagrożenia związane z nieusuniętym skażeniem, obecnością pozostałości substancji chemicznych użytych podczas dekontaminacji oraz zmiany sprawności funkcjonowania jednorazowego wyrobu medycznego [16]. Wszystkie czynności wykonywane w trakcie reprocesowania wyrobów medycznych jednorazowego użytku, stwarzają zagrożenie dla pacjentów i personelu związane z utrzymaniem się skażenia biologicznego. Zagrożenie wzrasta, gdy jednorazowe wyroby medyczne są stosowane w procedurach wysokiego ryzyka, czyli podczas wykonywania zabiegów przebiegających z naruszeniem ciągłości tkanek [16]. Odpowiedzialność za użycie wyrobu medycznego niezgodnie z przeznaczeniem i narażenie pacjenta na ryzyko błędu medycznego ponosi personel medyczny. Dyrektywa 93/42/WE nakłada na producenta obowiązek powiadomienia użytkownika o wszystkich znanych wytwórcy właściwościach i czynnikach technicznych, które mogą stwarzać ryzyko w przypadku ponownego użycia wyrobu [16].

W Unii Europejskiej sytuacja prawna reprocesowania sprzętu jednorazowego użytku w państwach członkowskich jest obecnie bardzo zróżnicowana, (Tabela V) [11].

Według ustawy o wyrobach medycznych z dnia 20 maja 2010 r. w Polsce [14] „zabrania się wprowadzania do obrotu, wprowadzania do używania, dystrybuowania, dostarczania, udostępniania, instalowania, uruchamiania i używania wyrobów, dla których upłynął termin ważności lub został przekroczony czas lub

Tabela V

Sytuacja prawna w wybranych krajach europejskich [na podstawie 11, 14]

Kraje	Sytuacja prawna
Belgia, Dania, Holandia, Niemcy, Polska, Słowacja, Szwecja	reprocesowanie jest regulowane prawnie lub zaakceptowane, jeśli są stosowane i przestrzegane przez reprocessorów zwalidowane procedury zgodnie z wysokimi normami
Cypr, Estonia, Grecja, Litwa, Łotwa, Malta, Węgry	nie ma przepisów i reprocesowanie odbywa się bez norm jakości
Austria, Czechy, Francja, Hiszpania, Irlandia, Portugalia, Wielka Brytania, Włochy	nie jest zalecane i odbywa się bez norm jakości

krotność bezpiecznego użytkowania, określone przez wytwórcę”. Według Stowarzyszenia Higieny Lecznictwa i Stowarzyszenia Kierowników Centralnej Sterylizacji decyzja o ponownej sterylizacji sprzętu jednorazowego użytku musi podjęta przez komisję złożoną z kompetentnych osób jedynie w przypadku konkretnej sytuacji lub warunków, np. zagrożenia życia pacjenta, a resterylizowany sprzęt i stosowane metody muszą spełniać szereg wymogów [14]. W sytuacji, gdy jednorazowy wyrób ma być reprocesowany i ponownie wprowadzony do obrotu lub używania, musi przejść procedurę rejestracyjną.

W 2011 r. ukazało się Rozporządzenie Ministra Zdrowia [13] w sprawie wymagań zasadniczych oraz procedur oceny zgodności wyrobów medycznych, które także definiuje wyrób jednorazowego użytku jako „wyrób medyczny przeznaczony do użycia tylko raz u jednego pacjenta”. Należy podkreślić, że odpowiedzialność za użycie jednorazowego sprzętu, który został powtórnie wysterylizowany, spoczywa na szpitalu lub jednostce ochrony zdrowia, w której go użyto.

9. Podsumowanie

Przygotowanie instrumentarium medycznego do zabiegów chirurgicznych jest procesem złożonym, zależnym od człowieka, jego wiedzy zawodowej, szkoleń, a nawet cech osobowościowych. Wszystko to ma wpływ na efekt końcowy w postaci sterylnych, gotowych do użycia instrumentów, bezpiecznych dla pacjenta i pracowników, dlatego konieczne jest ciągle szkolenie pracowników sterylizatorni. Każdy pracownik uczestniczący w reprocesowaniu instrumentarium medycznego musi pamiętać o aktualizacji wiedzy zawodowej poprzez uczestnictwo w dostępnych formach szkoleń zawodowych.

Piśmiennictwo

- Doroszkiwicz E.: Wykonywanie sterylizacji instrumentów, materiałów opatrunkowych i bielizny zabiegowej 322[01]. Z3.02. Poradnik dla ucznia. Wydawca Instytut Technologii Eksploatacji – Państwowy Instytut Badawczy. Radom 2007. „Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego” <http://www.darsa.pl/s/ogl/upload/554.pdf> (data ostatniego sprawdzenia 12 lipca 2012 r.)
- Dudek P.: Sterylizacja. Przewodnik Menedżera Zdrowia, 2001 (1), 58–59.
- Fleischer M., Choroszy-Król I.: Sterylizacja – aktualne zalecenia. *Essentia Medica*, 2005, 24 (8), 68–72.
- Florkowski M.: Reprocesowanie Wyrobów Medycznych Europejskie Forum EAMDR. *Ogólnopolski Przegląd Medyczny*, 2006, 6, 80–81.
- Heczko P.: Mikrobiologia. Podręcznik dla pielęgniarek, położnych i ratowników medycznych. PZWL, Warszawa, 2008.
- Jakimiak B., Röhm-Rodowald E.: Zasady sterylizacji narzędzi i sprzętu medycznego. Wybrane zasady ochrony pracowników medycznych przed zawodowymi zagrożeniami biologicznymi. (red.) Kancelarski K., Kuszewski K., Tadeusiak B., PZH, Warszawa, 2001.
- Kutrowska E.: Metody i narzędzia kontroli procesów sterylizacji materiałów medycznych. *Ogólnopolski Przegląd Medyczny*, 2008 (11), 25–30.
- Jakimiak B., Röhm-Rodowald E.: Opakowania sterylizacyjne w świetle norm europejskich. *Zakażenia*, 2003, 1, 10–17.
- Świtalski S.: Reprocesowanie i ponowne stosowanie wyrobów medycznych jednokrotnego użytku. *Zakażenia*, 2006, 2, 21–23.
- Świtalski S.: Rodzaje opakowań sterylnych. Systemy bariery sterylnej. Materiały z konferencji PSRSiDM Sterylizacja wyrobów medycznych w warunkach zakładu ochrony zdrowia. Wymagania merytoryczne i prawne, Olsztyn 17.12. 2009 r.
- <http://www.eamdr.org> data ostatniego sprawdzenia 12 lipca 2012 r.
- Polskie Stowarzyszenie Rozwoju Sterylizacji i Dezynfekcji Medycznej www.sterylizacja.org.pl data ostatniego sprawdzenia 12 lipca 2012 r.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 12 stycznia 2011 r. w sprawie wymagań zasadniczych oraz procedur oceny zgodności wyrobów medycznych. Dz. U. 11.16.74
- Ustawa z dnia 20 maja 2010 r. o Wyrobach Medycznych, Dziennik Ustaw 2010, nr 107, poz. 679.
- Waszak B., Kutrowska E., Świtalski S., Gaudzińska E., Jakimiak B., Lejbrandt E., Ziółko A., Grzesiowski P.: Stanowisko Stowarzyszenia Higieny Lecznictwa i Stowarzyszenia Kierowników Centralnej Sterylizacji i Dezynfekcji. „Nowe kierunki w sterylizacji – reprocesowanie i resterylizacja wyrobów medycznych”. <http://www.shl.org.pl> data ostatniego sprawdzenia 12 lipca 2012 r.
- Wytyczne opracowane przez ekspertów Stowarzyszenia Higieny Lecznictwa, Polskiego Stowarzyszenia Rozwoju Sterylizacji i Dezynfekcji Medycznej, Zakładu Zwalczenia Skażeń Biologicznych NIZP – Państwowego Zakładu Higieny, Polskiego Stowarzyszenia Pielęgniarek Epidemiologicznych „Ogólne wytyczne 2011 sterylizacji wyrobów medycznych i innych przedmiotów wielorazowego użycia wykorzystywanych przy udzielaniu świadczeń zdrowotnych oraz innych czynnościach, podczas których może dojść do przeniesienia choroby zakaźnej lub zakażenia” wrzesień 2011 r.
- Zespół roboczy ds. przygotowania instrumentarium medycznego: Prawidłowy sposób przygotowania instrumentarium medycznego, 2006, wyd. 8 poprawione, s. 9, 11–13, 19, 22–26, 53,57 www.a-k-i.org.

TYPOWANIE BAKTERIOFAGOWE W DIAGNOSTYCE PAŁECZEK *SALMONELLA* ENTERITIDIS WYSTĘPUJĄCYCH W POLSCE

Bożena Dera-Tomaszewska^{1*}, Ewa Tokarska-Pietrzak¹

Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Katedra Mikrobiologii
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Krajowy Ośrodek *Salmonella*, ul. Do Studzienki 38, 80-227 Gdańsk

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Typowanie bakteriofagowe. 3. Schematy typowania bakteriofagowego pałeczek *Salmonella*. 4. Typy bakteriofagowe *Salmonella* Enteritidis występujące w Polsce. 5. Podsumowanie

Phage typing in the diagnostic of *Salmonella* Enteritidis occurring in Poland

Abstract: Phage typing has a long history with regard to the differentiation of *Salmonella* serovars of human and animal origin. This method provides the fast and cheap characterization of frequent serovars on the sub-serovar level and is especially useful for primary epidemiological analysis before investigation by other, more expensive molecular techniques. Since the discovery of bacteriophages many different *Salmonella* typing schemes have been developed. More than one typing scheme may have been developed for a serovar. Several phage-typing schemes have been published for *Salmonella* Enteritidis. The most widely used is that of Ward et al. In Poland a different typing scheme is used – the Lalko et al. scheme. It employs eight typing phages for differentiation more than 20 phage types. Basing on the results of *Salmonella* Enteritidis phage typing, which has been conducted in Poland for many years, it can be noted that *Salmonella* Enteritidis infections reported in our country during the last fifty years were associated with two serious epidemics. Among the strains isolated during the first epidemic, phage types 2, 5, 7, 8 and 12 were predominant and the great majority of the strains were represented by types 8 and 5. Phage types 1, 6 and 7 were found to be dominated during 27 years of the second *Salmonella* Enteritidis epidemic in Poland. The strains of type 7 were the most numerous ones. The results of phage typing indicate that sources of infections of these two *Salmonella* Enteritidis epidemics are quite different. However, a relationship between them exists: *Salmonella* Enteritidis type 7 organisms occur in both. During the first epidemic they were isolated in a relatively small percentage and only from humans. The great majority of sources of *Salmonella* Enteritidis infections associated with the second epidemic were dominated by them. They were also prevalent in human isolates. Generally, during the last 27 years, no significant changes in the distribution of *Salmonella* Enteritidis phage types in Poland have been observed. Although, it is noteworthy that except the same, permanent phage types continuously existing in the environment, the new types start to appear. They can suggest an appearance of new sources of *Salmonella* Enteritidis infections, unknown yet in our country, which is very possible as a result of effective elimination of currently existing ones.

1. Introduction. 2. Phage typing. 3. *Salmonella* phage typing schemes. 4. *Salmonella* Enteritidis phage types occurring in Poland. 5. Summary

Słowa kluczowe: bakteriofagi, *Salmonella*, *Salmonella* Enteritidis, typowanie bakteriofagowe, typy bakteriofagowe
Key words: bacteriophages, *Salmonella*, *Salmonella* Enteritidis, phage typing, phage types

1. Wprowadzenie

Niebezpieczeństwo wynikające ze zwiększonej inwazyjności niektórych serowarów *Salmonella* stało się problemem na skalę światową – przykładem może być *Salmonella* Enteritidis. Notuje się także wzrost zatruc pokarmowych spowodowanych innymi serowarami *Salmonella*, które dawniej izolowano sporadycznie. W związku z tym, metody bardziej szczegółowego różnicowania szczepów *Salmonella*, do których zaliczana jest również metoda typowania bakteriofagowego, okazały się niezwykle przydatne dla celów praktycznych [31]. W przypadku epidemii, jak i sporadycznych zachorowań spowodowanych tym patogenem, ważnym staje się wykrycie źródła zakażenia. Ustalenie, czy dana grupa pozornie pokrewnych przypadków jest jednorodna,

czy powiązana z więcej niż jednym źródłem zakażenia, może sprawiać trudności. Wyniki badań uzyskane za pomocą metod serologicznych są niewystarczające dla identyfikacji źródła zakażenia. Typowanie bakteriofagowe umożliwia przeprowadzenie wnikliwych obserwacji nad ustaleniem związku pomiędzy źródłem zakażenia i przypadkiem chorobowym oraz podjęcie skutecznych środków w zwalczaniu źródeł i dróg szerzenia się zakażeń. Celowość typowania bakteriofagowego w dochodzeniach epidemiologicznych i epi-zoocjologicznych uzasadnia również fakt możliwości śledzenia typów bakteriofagowych i obserwacji zmian zachodzących w ich dystrybucji na danym obszarze geograficznym, co pozwala na pełniejsze oszacowanie sytuacji epidemiologicznej związanej z występowaniem danego patogenu.

* Autor korespondencyjny: Krajowy Ośrodek *Salmonella*, Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Gdański Uniwersytet Medyczny, 80-227 Gdańsk, ul. Do Studzienki 38; tel.: (58) 349 19 12; e-mail: bodeto@gumed.edu.pl

2. Typowanie bakteriofagowe

Najlepsze wyniki w rozpoznawaniu zarazka uzyskujemy stosując metody kompleksowe [29]. Chociaż różne nowe metody typowania molekularnego szczepów *Salmonella* wydają się być przydatne w badaniach epidemiologicznych [16, 30], ciągle jeszcze szczególnie usługi epidemiologii oddaje lizotypia [28, 33, 37, 46–48]. Pozwala ona na wyróżnienie, w obrębie jednego serowaru, szeregu typów bakteriofagowych, różniących się między sobą intensywnością lub brakiem wrażliwości na działanie pewnych bakteriofagów uznanych za standardowe. Powtarzalność wyników typowania fagowego przy użyciu specjalnie opracowanych schematów została potwierdzona zarówno przez uzyskiwanie jednakowych wyników przy wielokrotnym typowaniu tych samych szczepów, jak i przez określanie jednego typu fagowego dla szczepów pochodzących z jednego ogniska epidemicznego. Typowanie bakteriofagowe według określonych schematów może więc być nadal polecane jako standardowa, szybka i tania metoda do prowadzenia badań epidemiologicznych zakażeń wywołanych przez pałeczki *Salmonella*. Różne zestawy fagów wykorzystywane są do typowania różnych serowarów. Typowanie bakteriofagowe *Salmonella* przeprowadzane jest głównie z zastosowaniem zestawów fagów, mniej lub bardziej specyficznych dla serowaru prezentowanego przez izolaty poddawane typowaniu.

3. Schematy typowania bakteriofagowego pałeczek *Salmonella*

Bakteriofagi wykorzystano po raz pierwszy do subtypowania bakterii *Salmonella* w latach trzydziestych ubiegłego wieku. Metoda typowania bakteriofagowego i pierwszy schemat typowania bazujący na fagach Vi (Vi-phage typing system) został opracowany przez Craigie i Yen'a dla szczepów *Salmonella* Typhi posiadających antygen Vi [9, 10]. Stał się on inspiracją dla Felix'a i Callow do opracowania kolejnego schematu typowania bakteriofagowego, tym razem dla pałeczek *Salmonella* Paratyphi B [19, 20]. Oba schematy odegrały zasadniczą rolę w identyfikacji stałych nosicieli pałeczek *Salmonella* Typhi i *Salmonella* Paratyphi B oraz skażonych produktów spożywczych. Badania prowadzone w latach 40-tych i 50-tych ubiegłego stulecia przez Felix'a i Callow [7, 21], uzupełnione badaniami Andersona i wsp. [1–4], zaowocowały następnym schematem typowania bakteriofagowego. Dotyczył on różnicowania szczepów *Salmonella* Typhimurium i początkowo umożliwiał wyróżnienie 80 różnych typów fagowych. Obecnie stosowany, rozszerzony zestaw składający się z 37 fagów pozwala określić ponad 210 różnych typów bakterio-

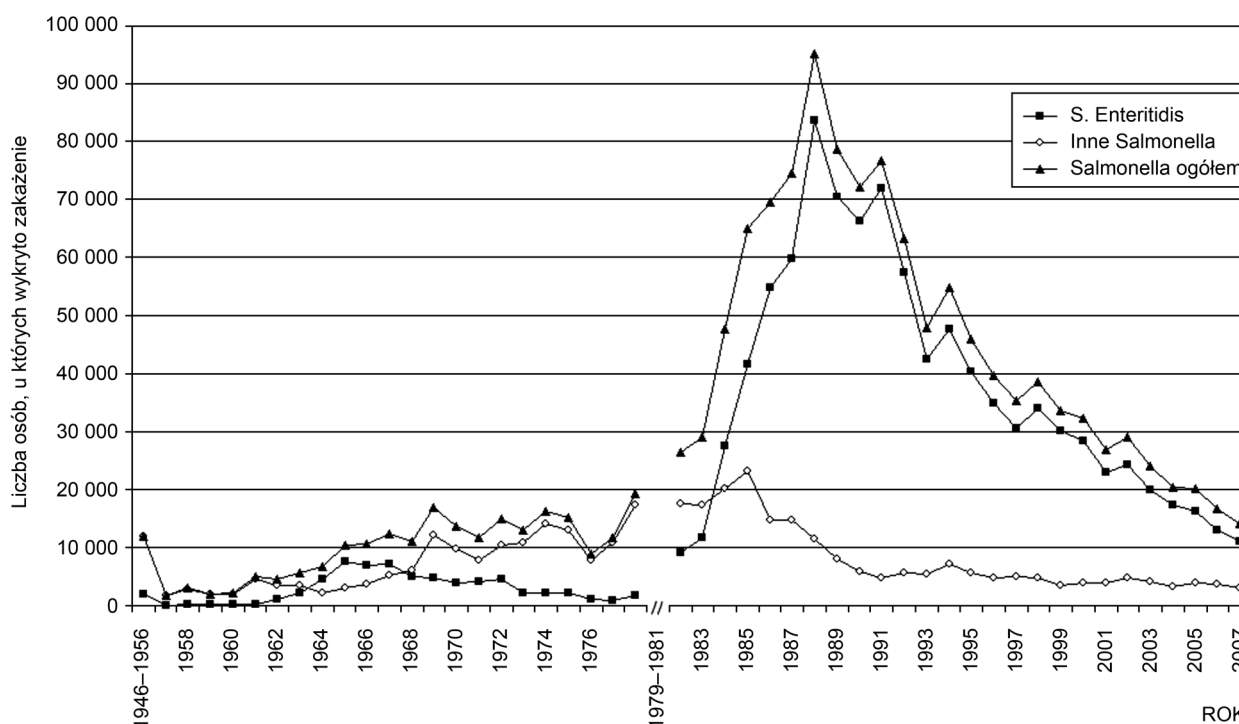
fagowych (definitive phage type, DT) w obrębie serowaru *Salmonella* Typhimurium. Niemal równocześnie z Felixem i Callow pracę nad typowaniem *Salmonella* Typhimurium podjął również Lilleengen [34]. Jego schemat wyróżniał 24 typy bakteriofagowe, w oparciu o reakcje z 12 fagami izolowanymi ze ścieków, nawozu oraz hodowli *Salmonella* Typhimurium. Schemat Lilleengen'a został później rozszerzony przez Kallings i wsp. [27] o 4 nowe typy fagowe. Opracowano również kilka schematów typowania fagowego pałeczek *Salmonella* Enteritidis, spośród których najbardziej popularnym stał się schemat zaproponowany przez Ward i wsp. [48]. Pozwalał on na określenie 27 typów fagowych przy pomocy zestawu 10 fagów. Znaczący odsetek szczepów reagujących z fagami Ward i wsp. w sposób uniemożliwiający określenie typu fagowego oraz dość duży odsetek szczepów nie reagujących z fagami, wskazał na ograniczoną przydatność tego schematu do badań epidemiologicznych zakażeń wywołanych tym serowarem w naszym kraju [15]. Szczegółowa ocena użyteczności schematu Ward i wsp. oraz stosowanego w Polsce schematu Lalko i wsp. do prowadzenia analizy epidemiologicznej *Salmonella* Enteritidis w Polsce została przedstawiona przez Głównicką i Dera-Tomaszewską [24]. Stosowany obecnie, rozszerzony schemat Ward i wsp., obejmuje już 16 fagów typujących i umożliwia rozpoznanie 77 różnych typów fagowych. Inni autorzy komunikowali również o sukcesach w opracowywaniu kolejnych zestawów preparatów fagowych i schematów typowania dla innych serowarów *Salmonella*, głównie lokalnie stosowanych we własnych laboratoriach. Większość z nich bazuje na fagach wirulentnych. Bardziej szczegółowe dane zarówno techniczne, jak i historyczne dotyczące ich powstawania przedstawiono w publikacji Guinée i van Leeuwen [25]. Umożliwiają one subtypowanie w obrębie takich serowarów *Salmonella* jak: Abortusovis, Adelaide, Agona, Anatum, Bareilly, Blockley, Bovismorbificans, Braenderup, Choleraesuis, Dublin, Gallinarum, Good, Hadar, Infantis, Minnesota, Montevideo, Newport, Oranienburg, Panama, Potsdam, Thompson, Virchow, Waycross i Weltevreden [25, 26]. Celowość stosowania metody typowania bakteriofagowego została powszechnie uznana, czego wyrazem było powołanie ośrodków międzynarodowych i krajowych, których zadaniem jest czuwanie nad prawidłowością rozpoznania i porównywalnością wyników oraz dalsza praca badawcza nad doskonaleniem tej metody. Standardowa technika typowania bakteriofagowego zaproponowana przez Craigie i Felix'a w 1947 roku [11] została zatwierdzona przez Międzynarodowy Komitet Typowania Bakteriofagowego Drobnoustrojów Jelitowych, utworzony przez Międzynarodowe Towarzystwo Mikrobiologów i jest stosowana do dziś we wszystkich ośrodkach typowania bakteriofagowego. Wszystkie

szczegóły związane z typowaniem bakteriofagowym, dotyczące podłoża, warunków wzrostu, namnażania i sprawdzania fagów, metod typowania, odczytywania i zapisywania wyników, zostały szczegółowo opisane przez Andersona i Williamsa [1]. Metoda typowania bakteriofagowego opisywana jest również przez wielu autorów w różnych przeglądowych opracowaniach dotyczących fagotypowania bakterii *Salmonella* [8, 25, 29, 45]. Obecnie do schematów o zasięgu międzynarodowym, powszechnie stosowanych w ośrodkach referencyjnych na świecie, należą schematy typowania fagowego pałeczek *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi A, *Salmonella* Paratyphi B (również *Salmonella* Paratyphi B biowar Java), *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Enteritidis [26]. Wiele schematów typowania fagowego (w tym dla *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Enteritidis) oraz związanych z nim technik opracowano w Central Public Health Laboratory w Colindale (Londyn, Wielka Brytania). Ten współpracujący ze Światową Organizacją Zdrowia ośrodek jest międzynarodowym, referencyjnym laboratorium typowania fagowego bakterii *Salmonella* [29]. Umiejętnie wykorzystane wyniki typowania bakteriofagowego przynoszą duży postęp w pracach epidemiologicznych i epizootologicznych – zwiększają znacznie prawdopodobieństwo rozpoznania źródła zakażenia, pozwalają ocenić jednorodność ognisk zatruc pokarmowych i poznać mechanizmy szerzenia się zakażenia.

4. Typy bakteriofagowe *Salmonella* Enteritidis występujące w Polsce

Od wielu już lat w Polsce najczęstszym czynnikiem etiologicznym, zarówno w ogniskach zatruc pokarmowych, jak i zachorowaniach sporadycznych są pałeczki *Salmonella* Enteritidis. I chociaż udział zachorowań wywołanych tym typem serologicznym w ogólnej liczbie zachorowań na salmonelozę w Polsce wskazuje w ostatnich latach niewielką, ale wyraźną tendencję spadkową [12, 17], stanowi on ciągle jeszcze bardzo wysoki odsetek. Pod koniec lat dziewięćdziesiątych udział *Salmonella* Enteritidis w ogólnej liczbie salmoneloz wahał się w przybliżeniu, w granicach 85–90%. W roku 2006, zachorowania, za które odpowiedzialny był ten serowar, stanowiły 80% wszystkich zachorowań spowodowanych przez bakterie *Salmonella* [12]. Zatrucia pokarmowe wywołane pałeczką *Salmonella* Enteritidis stanowią już od dawna jeden z ważniejszych problemów służby zdrowia w Polsce. Zaobserwowany po raz pierwszy na początku lat sześćdziesiątych znacznie szybszy wzrost zakażeń spowodowanych przez *Salmonella* Enteritidis, mających związek z pierwszą w kraju epidemią (1962–1976) wywołaną przez ten serowar [23], stał się przyczyną opracowania systemu bardziej szczegółowego różnicowania tych pa-

czek za pomocą bakteriofagów. Typowanie bakteriofagowe jest doskonałą metodą pomocniczą w prowadzeniu dochodzeń epidemiologicznych. Pierwsza wersja stosowanego w Polsce schematu typowania bakteriofagowego pałeczek *Salmonella* Enteritidis została opublikowana w 1968 roku przez Macierewicz i wsp. [35]. Na podstawie reakcji z 7 fagami typującymi wyróżniono 11 typów bakteriofagowych. W ciągu następnych lat Macierewicz rozszerzyła schemat do 13 typów, a następnie do 25 przy użyciu 11 fagów oraz zmieniła całkowicie nomenklaturę typów bakteriofagowych. Dalsze badania prowadzone przez Lalko wykazały, iż mimo dużej przydatności praktycznej tego systemu, uzyskuje się niekiedy reakcje niepowtarzalne. W toku dalszej pracy, na podstawie uzyskanych wyników, ustalono za aprobatą Macierewicz ostateczną wersję schematu obejmującego 20 typów bakteriofagowych reagujących w odmienny sposób z 8 fagami typującymi [32, 33]. Jego wartość praktyczną potwierdzono poprzez analizę epidemiologiczną wykonaną w oparciu o materiał obejmujący 2 011 szczepów *Salmonella* Enteritidis wyizolowanych w Polsce w latach 1970–1975. W badanym materiale wyróżniono 19 typów bakteriofagowych. Do najczęściej występujących w kraju, zarówno izolowanych od ludzi, jak i od zwierząt, należały typy 2, 5, 7, 8 i 12. Wśród szczepów pochodzących od ludzi przewagę stanowił typ 8 (31,8%) i typ 5 (21,8%), natomiast wśród izolacji odzwierzęcych – typ 12 (50,0%). Na uwagę zasługuje również fakt, iż typy: 4, 6, 7 i 12 izolowano głównie od osób dorosłych i starszych dzieci, natomiast typ 2 i 5 – od niemowląt ze środowisk zamkniętych, jak szpitale, czy domy małego dziecka. Rejestrowany od 1962 roku szybki wzrost zapadalności dla *Salmonella* Enteritidis, osiągający maksymalne wartości w latach 1965–1967 (od 19,1 do 22,1 na 100 tys.) miał głównie związek z epidemią wywołaną przez ten serowar w szpitalach na oddziałach dziecięcych, w żłobkach i w domach dziecka [36]. Chorowały przede wszystkim najmłodsze dzieci. Śmiertelność noworodków sięgała 25%. Zaobserwowano odmienne od normalnie rejestrowanych przyczyny powstania epidemii nie dające się zakwalifikować jako zatrucia pokarmowe [23]. Odrębność źródeł i mechanizmów tej epidemii potwierdzały również wyniki typowania bakteriofagowego. Przyczyna początku pierwszej epidemii *Salmonella* Enteritidis nie została wyjaśniona, natomiast mechanizm jej rozprzestrzeniania się na cały kraj miał związek z długim okresem wydalania zarazka po przechorowaniu, szczególnie przez dzieci. Istniały również podstawy do podejrzeń, że zakażenia te szerzyły się drogą powietrzną. Pokażna liczba przypadków objawowych salmoneloz w tym okresie czasu pochodziła również z ognisk zatruc pokarmowych, z których wyizolowano znakomitą większość szczepów typu: 2, 5, 7, 8 i 12 [33]. Na szczególną uwagę zasługiwały dwa duże ogniska: jedno spowodowane



Rys. 1. Zakażenia pałeczkami *Salmonella* Enteritidis i innymi serowarmi *Salmonella* u ludzi w Polsce na tle ogólnej liczby zakażeń *Salmonella*, 1957–2007 [5, 6, 13, 38–44]

pałeczkami *Salmonella* Enteritidis typu 12 (1972 rok; kolonie letnie – woj. szczecińskie; lody), drugie – typu 8 (1975 rok; woj. łódzkie; befszytk tatarski). Oba ogniska były jednorodne. Szczepy izolowane z żywności, od osób chorych i z tzw. kontaktu przedstawiały ten sam typ bakteriofagowy.

Druga epidemia *Salmonella* Enteritidis w Polsce zaczęła się prawdopodobnie we wczesnych latach osiemdziesiątych. Wprowadzenie stanu wojennego w Polsce w 1981 roku zbiegło się z wydaniem zakazu zbierania informacji epidemiologicznych, co spowodowało znaczne utrudnienie w opracowywaniu danych o zakażeniach *Salmonella* w latach 1979–1981 oraz stało się przyczyną niekompletnych informacji o salmonelozach w latach 1982 i 1983. Mimo to, już w 1982 roku zaobserwowano 11-krotny wzrost liczby przypadków zakażeń pałeczkami *Salmonella* Enteritidis u ludzi w porównaniu z rokiem 1977 (842 przypadki). W 1984 roku rejestrowano 33-krotny, w 1986 roku 65-krotny, a w 1988 prawie 100-krotny wzrost tej liczby. Zakażenia w kolejnych latach 1989, 1990 i 1991 przekraczały ją 80-krotnie. Dane przedstawione na Rys. 1, pozwolą prześledzić, jak kształtowała się liczba zakażeń u ludzi w Polsce spowodowanych pałeczkami *Salmonella* Enteritidis (i innymi serowarami) na tle ogólnej liczby zakażeń *Salmonella* w ciągu ostatnich 50 (1957–2007) lat. Od 1993 roku (z wyjątkiem lat 1994 i 1998) obserwujemy ciągle zmniejszanie się liczby zakażeń świadczące o stopniowym wygasaniu drugiej epidemii *Salmonella* Enteritidis w naszym kraju, której szczyt przypadł na rok 1988.

Epidemia ta do roku 1986 obejmowała głównie zakażenia sporadyczne, dotyczące przede wszystkim małych dzieci, ale nie miała charakteru epidemii szpitalnej. W przeciwieństwie do pierwszej epidemii przebiegała głównie pod postacią ognisk zatruc pokarmowych [23]. Rejestrowano coraz większe liczby ognisk zatruc pokarmowych, które od 1987 roku zaczęły dominować wśród zakażeń *Salmonella* Enteritidis. Główną przyczyną zatruc pokarmowych stały się jaja i produkty je zawierające. Rzadziej przyczynę zatruc stanowiło mięso i jego przetwory, co związane było z wprowadzeniem znacznych ograniczeń i racjonowania żywności o okresie od 1982 do 1989 roku (przydziały kartkowe obejmowały: osoby dorosłe – 2,5 kg, dzieci – 1,8 kg mięsa i wszystkich jego przetworów na miesiąc). Jaja nie podlegały reglamentacji. Typowanie bakteriofagowe ponad 2100 szczepów *Salmonella* Enteritidis wyizolowanych w latach 1981–1990, wykonane przez Głósnicką i wsp. [22] wykazało, że dominującymi typami bakteriofagowymi, izolowanymi od ludzi, od zwierząt i z żywności były typy: 1, 6 i 7. Najwięcej szczepów prezentowało typ bakteriofagowy 7 (ludzie – 64,0%; inne – 52,7%) i typ 1 (ludzie – 26,0%; inne – 37,7%). Liczebna dominacja tych szczepów miała związek ze znaczną liczbą ognisk zatruc pokarmowych spowodowanych przez te typy fagowe. Znakomita większość ognisk była jednorodna – te same typy fagowe określano w przypadku szczepów izolowanych od ludzi chorujących w ogniskach, jak i z żywności odpowiedzialnej za zakażenia (ciastka z kremem, lody, majonez, jaja).

Wśród ognisk mieszanych przeważały ogniska spowodowane jednocześnie typem 1 i 7. Kolejne wyniki typowania bakteriofagowego szczepów *Salmonella* Enteritidis wyizolowanych w latach 1986–1995 [14] wykazały kontynuację występowania opisanych wyżej typów bakteriofagowych. Dominowały typy 1, 6 i 7, zarówno wśród szczepów izolowanych od ludzi z ognisk zatruc pokarmowych, sporadycznych przypadków zakażeń, jak i z innych źródeł. Nie zaobserwowano tylko rejestrowanej wcześniej liczebnej przewagi szczepów typu 7 nad szczepami typu 1.

Wyniki typowania fagowego przeprowadzonego w Krajowym Ośrodku *Salmonella* w oparciu o szczepy *Salmonella* Enteritidis wyizolowane w kraju w latach 1996–2007 (publikacja w druku), czyli w okresie wygasania trwającej w Polsce już ponad 25 lat drugiej epidemii spowodowanej tym serowarem, wykazały, że do najczęściej określanych typów fagowych nadal należą typy: 1, 6 i 7. Dominują wśród izolacji od ludzi, a także z żywności, od zwierząt, z pasz, wymazów sanitarnych i innych źródeł. Zdecydowanie przeważały szczepy typu 7. Szczepy *Salmonella* Enteritidis typu 1 izolowano prawie

Tabela I

Typy bakteriofagowe *Salmonella* Enteritidis (wg schematu L a l k o i wsp.) występujące w Polsce w następujących latach: 1970–1975, 1981–1990, 1986–1995, 1996–2007 [14, 22, 32, 33]

Typ fagowy	Liczba szczepów (%) wyizolowanych							
	1970–1975		1981–1990		1986–1995		1996–2007	
	Od ludzi	Od zwierząt, z żywności, pasz, i innych źródeł	Od ludzi	Od zwierząt, z żywności, pasz, i innych źródeł	Od ludzi	Od zwierząt, z żywności, pasz, i innych źródeł	Od ludzi	Od zwierząt, z żywności, pasz, i innych źródeł
1	1	–	536 (26,2%)	35 (37,6%)	137 (38,2%)	32 (36,4%)	124 (25,0%)	69 (29,3%)
2	147 (8,0%)	–	–	–	–	–	–	–
3	1	–	47 (2,3%)	3 (3,2%)	6 (1,6%)	–	38 (7,6%)	31 (13,1%)
4	56 (3,0%)	1	11 (0,5%)	–	–	–	2 (0,4%)	–
5	402 (21,8%)	26 (15,9%)	1	–	–	–	–	1
6	25 (1,3%)	1	98 (4,8%)	4 (4,3%)	59 (16,4%)	24 (27,3%)	140 (28,1%)	44 (18,7%)
7	332 (18,0%)	–	1313 (64,1%)	49 (52,7%)	147 (41,1%)	30 (34,1%)	167 (33,5%)	68 (28,9%)
8	582 (31,8%)	39 (23,8%)	14 (0,7%)	–	–	–	5 (1,0%)	5 (2,1%)
9	10 (0,5%)	–	1	–	–	1	–	–
10	5 (0,2%)	9 (5,5%)	–	–	–	–	–	–
11	1	–	–	–	–	–	–	–
12	139 (7,5%)	82 (50,0%)	2 (0,1%)	–	–	–	–	–
13	60 (3,2%)	–	–	–	–	–	–	–
14	17 (0,9%)	–	–	–	–	–	–	–
15	1	–	–	–	–	–	–	–
16	–	1	–	–	3 (0,9%)	–	5 (1,0%)	–
17	1	–	–	–	–	–	–	–
18	1	5 (3,0%)	6 (0,3%)	–	–	–	–	–
19	–	–	–	–	–	–	–	–
20	50 (2,7%)	–	3 (0,1%)	–	–	–	–	1
21	–	–	–	–	–	–	–	–
22	–	–	3 (0,1%)	2 (2,2%)	–	–	–	–
23	–	–	–	–	–	–	–	–
24	–	–	–	–	–	–	6 (1,2%)	–
25	–	–	–	–	–	–	1	–
26	–	–	–	–	–	–	2 (0,4%)	1
27	–	–	–	–	–	–	1	–
AT ¹	4 (0,2%)	–	–	–	2 (0,6%)	1	6 (1,2%)	10 (4,2%)
NT ²	12 (0,6%)	–	13	–	3 (0,9%)	–	1	6 (2,5%)
Ogółem	1847	164	2048	93	358	88	498	236

¹ Szczepy atypowe (nietypowo reagujące z fagami typującymi)

² Szczepy nie typujące się (nie reagujące z fagami typującymi)

w takich samych ilościach jak typu 6. Zaobserwowano również nieco większą liczbę szczepów prezentujących typ fagowy 3 w porównaniu do poprzednich przedziałów czasowych. Obecność typu 16 w naszym kraju zarejestrowała po raz pierwszy Lalko w latach 1970–1975 wyłącznie w materiałach pochodzenia zwierzęcego [32]. Pierwszej izolacji tego typu bakteriofagowego od ludzi dokonano w latach 1986–1995 z mieszanego ogniska zatrucia pokarmowego [14]. Izolowano go również od ludzi w ciągu kolejnych trzynastu lat (1996–2007). Trudno jednak nie zauważyć, że przy egzystujących ciągle jeszcze w środowisku tych samych, „stałych” typach bakteriofagowych (tj. 1, 3, 6, 7), zaczynają pojawiać się zupełnie nowe: typ 24, 25, 26 i 27. Izolowano je w niewielkiej liczbie przypadków, przede wszystkim od ludzi. Wprawdzie mogą one być wynikiem jednorazowych izolacji, ale mogą również sugerować pojawienie się nowych, nieznanych jeszcze źródeł zakażeń, co przy skutecznym zwalczaniu obecnie istniejących jest bardzo prawdopodobne. Pojawianie się nowych typów fagowych wśród pałeczek *Salmonella* Enteritidis obserwuje się również w państwach Europy Zachodniej [18, 37].

W oparciu o opublikowane, zbiorcze opracowania obejmujące lata 1970–1975 [32], 1981–1990 [22], 1986–1995 [14] oraz wyniki opisanych powyżej badań, stanowiących kontynuację poprzednich opracowań, dokonano analizy porównawczej występowania typów bakteriofagowych *Salmonella* Enteritidis w naszym kraju (Tabela I). Uzyskane wyniki pozwolą na pełniejsze oszacowanie sytuacji epidemiologicznej związanej z występowaniem tego patogenu w Polsce.

5. Podsumowanie

W podsumowaniu przedstawionych wyników prowadzonego w Polsce już od wielu lat typowania bakteriofagowego pałeczek *Salmonella* Enteritidis można stwierdzić, że zakażenia spowodowane tym serowarem, które wystąpiły w naszym kraju w czasie ostatnich pięćdziesięciu lat spowodowały dwie groźne epidemie. Pierwsza z nich była wprawdzie mniejsza liczebnie, ale spowodowała ciężkie schorzenia i śmierć wielu dzieci. Druga natomiast, o łagodniejszym przebiegu i znacznie wydłużona w czasie, objęła wielokrotnie większą liczbę osób i praktycznie trwa do dzisiaj. Obserwowana w ostatnich latach tendencja spadkowa udziału zachorowań wywołanych tym serowarem w ogólnej liczbie zachorowań na salmonelozę w Polsce napawa optymizmem i rokuje na całkowite wygaśnięcie tej epidemii. Wyniki typowania bakteriofagowego wskazują na pewne powiązanie obydwu epidemii przede wszystkim poprzez obecność pałeczek *Salmonella* Enteritidis typu 7. Izolowane dawniej w stosunkowo niewielkim procencie wyłącznie od ludzi, zdominowały większość

źródeł zakażeń związanych z drugą epidemią, uzyskując również przewagę u ludzi. Wśród szczepów *Salmonella* Enteritidis badanych od 1981 roku nie stwierdzono występowania typu 2. Typy 5 i 12 prezentowane były wyłącznie przez pojedyncze egzemplarze szczepów. Zarejestrowano tylko niewielką liczbę szczepów typu 8, dominującego w latach 1970–1975. Oprócz typu 7 swoją dominację w latach 1981–2007 zaznaczyły również typy 1 i 6. Zaobserwowane zmiany w dystrybucji typów bakteriofagowych świadczą o prawie całkowitej zmianie źródeł i mechanizmów szerzenia się zakażeń związanych z drugą epidemią *Salmonella* Enteritidis w Polsce. W ciągu 27 lat trwania tej epidemii dominującymi typami fagowymi *Salmonella* Enteritidis były typy 1, 6 i 7 (według Lalko i wsp.), z najliczniej izolowanymi szczepami typu 7. Zaczynają również pojawiać się w Polsce nowe typy bakteriofagowe. Izolowano je wprawdzie w niewielkiej liczbie przypadków, przede wszystkim od ludzi. Mogą one sugerować pojawienie się w kraju nowych źródeł zakażeń, co przy skutecznym zwalczaniu obecnie istniejących jest wielce prawdopodobne. W Europie Zachodniej, podobnie jak w Polsce, zaobserwowano również pojawienie się nowych typów bakteriofagowych, które do tej pory nie występowały wśród typów najliczniej izolowanych od ludzi.

Piśmiennictwo

- Anderson E.S., Williams R.E.O.: Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology. *J. Clin. Path.* **9**, 94–114 (1956)
- Anderson E.S., Wilson E.M.J.: The importance of *Salmonella typhimurium* phage typing in human and veterinary medicine. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* **224**, 368–373 (1961)
- Anderson E.S.: Phage typing of *Salmonella* other than *Salmonella typhi* (w) The world problem of salmonellosis, red. W. van Oye, Junk Publisher, The Hague, 1964, s. 89–110
- Anderson E.S., Ward L.R., De Saxe M.J., De Sa J.D.H.: Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. (Camb.)*, **78**, 297–300 (1977)
- Buczowski Z.: Salmonellosis of man diagnosed in the years 1946–1956 in Poland. *Bull. Inst. Mar. Med. Gdańsk*, **1/2**, 51–71 (1961)
- Buczowski Z.: *Salmonella* (w) Enterobacteriaceae – Infektionen. Epidemiologie und Labordiagnostik, red. J. Sedlak, H. Rische, Veb Georg Thieme, Leipzig, 1961, s. 57–182
- Callow B.: A new phage-typing scheme for *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. (Camb.)*, **57**, 346–559 (1959)
- Chirakadze I., Perets A., Ahmed R.: Phage typing (w) Bacteriophages. Methods and protocols. Vol. 2, Molecular and applied aspects, red. M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski, Humana Press, New York USA, 2009, s. 293–305
- Craige J., Yen Ch.E.: The demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparation of type II phage. *Can. Publ. Hlth. J.* **29**, 448–483 (1938 a).
- Craige J., Yen Ch.E.: The demonstration of types of *B. typhosus* by means of preparation of type II phage. 2. The stability and epidemiological significance of V form types of *B. typhosus*. *Can. Publ. Hlth. J.* **29**, 484–496 (1938 b)

11. Craigie J., Felix A.: Typing of typhoid bacilli with Vi-bacteriophage. *Lancet*, **i**, 823–827 (1947)
12. Czerwiński M., Czarkowski M.P., Baumann A.: Salmonelozy w 2006 roku. *Przegl. Epidemiol.* **62**, 301–310 (2008)
13. Dera-Tomaszewska B.: Serological types of *Salmonella* bacilli isolated from men in Poland between 1967 and 1978. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia*, **35**, 56–72 (1984)
14. Dera-Tomaszewska B., Głońska R.: Typy bakteriofagowe *Salmonella* Enteritidis występujące w Polsce w latach 1986–1995. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **51**, 73–79 (1999)
15. Dera-Tomaszewska B., Głońska R.: Zastosowanie schematu Ward i wsp. do typowania bakteriofagowego szczepów *Salmonella* Enteritidis występujących w Polsce. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **5**, 281–288 (1999)
16. Dera-Tomaszewska B.: Metody typowania bakterii *Salmonella*. *Med. Wet.* **67**, 162–167 (2011)
17. Dera-Tomaszewska B., Kozłowski A.: Statystyczna analiza trendu zakażeń *Salmonella* u ludzi w Polsce w latach 1995–2007. *Przegl. Epidemiol.* **65**, 353–361 (2011)
18. European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, **223**, 21–108 (2009)
19. Felix A., Callow B.R.: Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi-bacteriophages. *Brit. Med. J.* **2**, 127–130 (1943)
20. Felix A., Callow B.R.: Paratyphoid-B Vi-phage typing. *Lancet*, **ii**, 10–14 (1951)
21. Felix A.: Phage typing of *Salmonella typhimurium*: its place in epidemiological and epizootiological investigations. *J. Gen. Microbiol.* **14**, 208–222 (1956)
22. Głońska R., Kunikowska D., Dziadziuszko H., Tokarska-Kłunajko E.: Distribution of *Salmonella enteritidis* phage-types in Poland in 1981–1990. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia*, **41**, 145–148 (1990)
23. Głońska R., Kunikowska D.: The epidemiological situation of *Salmonella enteritidis* in Poland. *Int. J. Food Microbiol.* **21**, 21–30 (1994)
24. Głońska R., Dera-Tomaszewska B.: Comparison of two *Salmonella* Enteritidis phage typing schemes. *Eur. J. Epidemiol.* **15**, 395–401 (1999)
25. Guinée P.A.M., van Leeuwen W.J.: Phage typing of *Salmonella* (w) *Methods in Microbiology*, vol. 11, red. T. Bergen, J.R. Norris, Academic Press, New York USA, 1978, s.157–191
26. Jones Y.E., McLaren I.M., Wray C.: Laboratory aspects of *Salmonella* (w) *Salmonella* in Domestic animals, red. C. Wray, A. Wray, CABI Publishing, New York USA, 2000, s. 393–405
27. Kallings L.O., Laurell A.B.: Relation between phage types and fermentation types of *Salmonella typhimurium*. *Acta Path. Microbiol. Scand.* **40**, 328–342 (1957)
28. Kowalczyk-Pecka D., Wernicki A., Puchalski A.: Lekowaralność oraz typy bakteriofagowe szczepów *Salmonella* Enteritidis izolowanych na terenie mikroregionu lubelskiego. *Przegl. Epidemiol.* **57**, 201–209 (2003)
29. Kropinski A. M., Sulakvelidze A., Konczy P., Poppe C.: *Salmonella* phages and prophages – Genomics and practical aspects (w) *Salmonella*. *Methods and Protocols*, red. H. Schatten, A. Eisenstark, Human Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, 2007, s. 133–175.
30. Laconcha I., López-Molina N., Rementeria A., Audicana A., Perales I., Garaizar J.: Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **40**, 27–34 (1998)
31. Lalko J.: Znaczenie typowania bakteriofagowego *Salmonella* w epidemiologii i epizootologii. Konferencja Naukowa „Salmonellozy”, Gdańsk–Gdynia, 19–20.IX.1969. Materiały Naukowe Konferencji, s. 73–81 (1970)
32. Lalko J.: Mikrobiologiczna i epidemiologiczna ocena różnych systemów typowania bakteriofagowego szczepów *S. typhimurium* i *S. enteritidis*. Praca habilitacyjna, red. J. Lalko, Acta Universitatis Lodzensis, Uniwersytet Łódzki, 1976.
33. Lalko J.: *Salmonella enteritidis* bacteriophage typing. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia*, **28**, 187–194 (1977)
34. Lilleengen K.: Typing of *Salmonella typhimurium* by means of bacteriophage. *Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.* **77** (1948)
35. Macierewicz M., Kałużewski S., Lalko J.: Phage differentiation of strains of *Salmonella enteritidis*. *Exp. Med. Microbiol.* **20**, 138–146 (1968)
36. Macierewicz M.: Zagadnienie zakażeń pałeczką *S. enteritidis* na terenie Polski. Konferencja Naukowa: „Salmonellozy”, Gdańsk – Gdynia, 19–20. IX. 1969. Materiały naukowe Konferencji, s. 83–102 (1970)
37. Nygård K., De Jong B., Guerin P.J., Andersson I., Olson A., Giesecke J.: Emergence of new *Salmonella* Enteritidis phage types in Europe? Surveillance of infections in returning travellers. *BMC Medicine*, **2**, 1–8 (2004)
38. Państwowy Zakład Higieny, Zakład Bakteriologii, Raport: Występowanie serotypów *Salmonella* wśród osób chorych i zdrowych badanych w Polsce (kolejno w latach 1982–1985) – na podstawie sprawozdań WSSE na formularzach Mz/E.II-17 (opracowanie: Stypułkowska-Misiurewicz H., Nowicki M.)
39. Państwowy Zakład Higieny, Instytut Naukowo-Badawczy – Zakład Epidemiologii, Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej – Departament Inspekcji Sanitarnej. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, Warszawa, Biuletyny roczne, 1986–1988
40. Państwowy Zakład Higieny, Zakład Bakteriologii, Raport: Serotypy pałeczek *Salmonella* najczęściej wykrywane u osób chorych i zdrowych w Polsce w 1989 roku – dane wg sprawozdań 48 WSSE (opracowanie: Stypułkowska-Misiurewicz H., Nowicki M.)
41. Państwowy Zakład Higieny, Instytut Naukowo-Badawczy – Zakład Epidemiologii, Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej – Departament Zdrowia Publicznego. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, Warszawa, Biuletyny roczne, 1990–1998
42. Państwowy Zakład Higieny, Instytut Naukowo-Badawczy – Zakład Epidemiologii, Główny Inspektorat Sanitarny – Departament Przeciwdemiczny i Oświaty Zdrowotnej. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, Warszawa, Biuletyny roczne, 1999–2002
43. Państwowy Zakład Higieny, Instytut Naukowo-Badawczy – Zakład Epidemiologii, Główny Inspektorat Sanitarny – Departament Przeciwdemiczny. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce, Warszawa, Biuletyny roczne, 2003–2007
44. Pietkiewicz K., Buczowski Z.: Salmonellosis in man in Poland, 1957–66. *Publ. Hlth. Rep.* **84**, 712–720 (1969)
45. Rabsch W.: *Salmonella* Typhimurium phage typing for pathogens (w) *Salmonella*. *Methods and Protocols*, red. H. Schatten, A. Eisenstark, Totowa, New Jersey, USA, Human Press Inc., 2007, s. 177–211
46. Tokarska-Pietrzak E., Kunikowska D., Dera-Tomaszewska B., Głońska R.: Typowanie bakteriofagowe w diagnostyce *Salmonella* Enteritidis. Konferencja Naukowa „Pomorskie Spotkania z Mikrobiologią, Gdańsk 2007”. Materiały Naukowe Konferencji, P-17, s. 54 (2007)
47. Van Duijkeren E., Wannet W.J.B., Houwers D.J., van Pelt W.: Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chicken in The Netherlands from 1984 to 2001. *J. Clin. Microbiol.* **11**, 3980–3985 (2002)
48. Ward L.R., de Sa J.D., Rowe B.: A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiol. Infect.* **106**, 291–294 (1987)

SPIS TREŚCI

Prof. dr hab. Zygmunt Sidorczyk (1940–2012)	241
J. Olszewska, E. K. Jagusztyn-Krynicka – Human Microbiome Project – mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka	243
A. Franczuk, E. K. Jagusztyn-Krynicka – Rola mikroflory jelit w indukcji choroby Leśniewskiego-Crohna w świetle programu badań Human Microbiome Project	257
A. Nowak, S. Tyski – Dwuskładnikowe systemy regulacyjne ziarenkowców Gram-dodatnich i ich rola w tworzeniu biofilmu	265
E. A. Trafny – Wewnątrzkomórkowe bakterie względnie chorobotwórcze w zakażeniach górnych dróg oddechowych i ucha	277
W. M. Helbin, K. Polakowska, J. Międzobrodzki – Czynniki wirulencji <i>Staphylococcus aureus</i> zależne od bakteriofagów	291
M. Bigos, M. Łysakowska, M. Wasieła – Zakażenia okołoporodowe o etiologii <i>Streptococcus agalactiae</i>	299

PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

B. Sokół-Leszczynska, E. Sztark, P. Leszczyński, G. Młynarczyk, M. Wróblewska – Przygotowanie instrumentarium medycznego do zabiegów chirurgicznych. Część I – wstępna dekontaminacja i dezynfekcja	309
B. Sokół-Leszczynska, E. Sztark, P. Leszczyński, G. Młynarczyk, M. Wróblewska – Przygotowanie instrumentarium medycznego do zabiegów chirurgicznych. Część II – sterylizacja i reprocesowanie	315
B. Dera-Tomaszewska, E. Tokarska-Pietrzak – Typowanie bakteriofagowe w diagnostyce pałeczek <i>Salmonella</i> Enteritidis występujących w Polsce	323

CONTENTS

Prof. dr hab. Zygmunt Sidorczyk (1940–2012)	241
J. Olszewska, E. K. Jagusztyn-Krynicka – Human Microbiome Project – influence of gut microbiota on human physiology and health	243
A. Franczuk, E. K. Jagusztyn-Krynicka – Role of microbiota in Crohn's disease induction in the light of studies of Human Microbiome Project	265
A. Nowak, S. Tyski – The role of two-component regulatory systems of Gram-positive cocci in biofilm formation	277
E. A. Trafny – Intracellular opportunistic bacteria in upper respiratory tract and ear infections	277
W. M. Helbin, K. Polakowska, J. Międzobrodzki – Phage-related virulence factors of <i>Staphylococcus aureus</i>	291
M. Bigos, M. Łysakowska, M. Wasieła – Perinatal infections caused by <i>Streptococcus agalactiae</i>	299

METHODS AND STANDARDS

B. Sokół-Leszczynska, E. Sztark, P. Leszczyński, G. Młynarczyk, M. Wróblewska – Medical instrument preparation for surgical procedures. Part I – initial decontamination and disinfection	309
B. Sokół-Leszczynska, E. Sztark, P. Leszczyński, G. Młynarczyk, M. Wróblewska – Medical instrument preparation for surgical procedures. Part II – sterilisation and reprocessing	315
B. Dera-Tomaszewska, E. Tokarska-Pietrzak – Phage typing in the diagnostic of <i>Salmonella</i> Enteritidis occurring in Poland	323

