

## WEWNĄTRZKOMÓRKOWE BAKTERIE WZGLĘDNIĘ CHOROBTWÓRCZE W ZAKAŻENIACH GÓRNYCH DRÓG ODDECHOWYCH I UCHA

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 rezerwuuar 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  $\beta$ -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 siarowego 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  $\beta$ -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 wielojądrowych neutrofilów, 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<sup>+</sup>, 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 ( $2 \times 10^4$  CFU) w ciągu co najmniej 24 godzin w mysich komórkach makrofagalnych linii J774 [17]. Otoczkowe szczepy *H. influenzae* typu b nie wniknęły 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 hodowalne 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<sup>+</sup> i CD68<sup>+</sup>. 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 poznanym procesem. 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 makrocząstek 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 cząstek lipooligosacharydów (PCho<sup>+</sup>), jak i te, które nie posiadają PCho (PCho<sup>-</sup>). Fenotyp PCho<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> i komórek mutanta, pozbawionego reszt fosfatydylocholino w błonie zewnętrznej [53].

Fimbrie NTHi uczestniczą w przyleganiu komórek bakteryjnych do reszt sialowych glikosfingolipidów (laktozyloceramidów), cząstek 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 tę 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 cząstek adhezyjnych, do których przylegają dwoinki *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 cząstek 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- $\beta$ 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 określanych 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 polimeric 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 śródłonka 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 śródłonka [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 integryn w błonie cytoplazmatycznej komórek gospodarza oraz współdziałać z adhezynami FnBPA i FnBPB w internalizacji do komórek nabłonka i śródłonka [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 oddechowym przypada na mieszane 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* GeneChips” 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 transkrypcji) a także trzy geny: *seo*, *lip* i *srtA*, kodujące czynniki zjadliwości tego drobnoustroju, odpowiednie 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 fosfatydyloinozytolu, 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  $\alpha \beta 3$ . Pobudzane są wówczas szlaki sygnałowe, w których biorą udział kinazy serynowo-treoninowe: JIK (integrin-like kinase), PI3K (kinaza fosfatydyloinozytolu) 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- $\alpha$  i aktywację receptora dla EGF pobudza szlaki sygnałowe białek z rodziny Rho, co prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu. Jednocześnie aktywowana zostaje wewnątrzkomórkowa, wapnionależna proteaza cysteinowa z rodziny kalpain, co prowadzi do proteolizy białek okładnych 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 zakwaszenie 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  $\alpha$ -toksyny (hemolizyny  $\alpha$ ) w tym procesie. Jednakże badania z wykorzystaniem mutantu *Staphylococcus carnosus*, do którego genomu wprowadzono gen *hla* kodujący  $\alpha$ -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 cytolyzyn tego drobnoustroju –  $\delta$ -toksyny transkrybowany jest wraz z genem kodującym efektorową cząsteczkę RNAPIII systemu quorum sensing u gronkowców. Toksyna  $\delta$  wraz z  $\beta$ -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  $\alpha$ -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 wzmożoną 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 wzmożona 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- $\alpha$  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 przyczynić się do ich rozszewienia 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<sup>E</sup> 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 ssa-ków 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 wnikaające 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  $\beta$ -laktamowych w zwalczaniu patogenów wewnątrz komórek nabłonka, śródbłonka i komórek żernych.

Badania wykonane *in vitro* pokazały, że spośród pięciu badanych środków przeciwbakteryjnych: ampicyliny, cyprofloksacyny, klarytromycyny, telitromycyny i chinupristyny/dalfopristyny ten ostatni antybiotyk w najniższych stężeniach (8  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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 ośmiokrotnie 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 moksyflokscacyna, 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* (moksyflokscacyna) 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, chinupristyna/dalfopristyna 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 chinupristyna/dalfopristyna 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 moksyflokscacyny 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 moksyflokscacyny, 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 log<sub>10</sub> 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

1. Aebi C.: *Moraxella catarrhalis* – pathogen or commensal? *Adv. Exp. Med. Biol.* **697**, 107–116 (2011)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. Anderton J.M., Rajam G., Romero-Steiner S., Sumner 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)
7. 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)
8. 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)
9. 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)
10. 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)
11. 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)
12. 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)
13. 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)
14. 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)
15. 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)
16. 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)
17. Craig J.E., Cliffe A., Garnett K., High N.J.: Survival of nontypeable *Haemophilus influenzae* in macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 55–61 (2001)
18. Dawson C.C., Intapa C., Jabra-Rizk M.A.: “Persisters”: survival at the cellular level. *PLoS Pathog.* **7**:e1002121 (2011)
19. 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)
20. 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)
21. 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)
22. Erwin A.L., Smith A.L.: Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol.* **15**, 355–362 (2007)
23. 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)
24. 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  $\delta$ -toxin by *Staphylococcus aureus* mediates escape from phago-endosomes of human epithelial and endothelial cells in the presence of  $\beta$ -toxin. *Cell. Microbiol.* **13**, 316–329 (2011)
30. Green L.R., Monk P.N., Partridge L.J., Morris P., Gorrings 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., Hammer-schmidt 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 Staaaj B.K., van den Akker E.H., Hoes A.W., Schilder AG.: 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., Saulea 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. Papasergi 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., Pescolliderung 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. Stepińska 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.: Non-typeable *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  $\beta$ -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.