

Kwartalnik

**Tom 52**

**Zeszyt 2•2013**

KWIECIEŃ – CZERWIEC

CODEN:

PMKMAV 52 (2)

2013

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>

Szanowni Państwo! Autorzy i Czytelnicy *Postępów Mikrobiologii*:  
Informujemy Państwa, że uległ zmianie numer konta bankowego  
Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów.

**Aktualny numer konta:**

**BGŻ SA 57 2030 0045 1110 0000 0261 2550**

#### 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:**

*Fonsecaea monophora* – szczegóły morfologii (widoczny konidiofor i układ konidiów). SEM, pow. 4 000 x.  
Autor zdjęcia: dr n. med. Tomasz Jagielski; Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Instytut Mikrobiologii  
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego  
ul. I. Miecznikowa 1; 02-096 Warszawa; e-mail: t.jagielski@biol.uw.edu.pl

---

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 14 arkuszy wyd., Papier offset 80 g

---

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

## WSPOMNIENIE

### Profesor Hilary Koprowski (1916–2013)



*Fortes fortuna ádiuvat (Terentius)*

*Cieszę się, że Pański znakomity dorobek i cała droga życiowa stają się w Polsce coraz szerzej znane, tym bardziej, że Pana zasługi daleko wykraczają poza rozslawienie swego kraju i narodu na obczyźnie. Można bowiem powiedzieć, że obecne średnie pokolenie Polaków w niemałym stopniu właśnie Panu zawdzięcza swoje zdrowie, a Rzeczpospolita – sukcesy...”*

Prezydent RP Lech Kaczyński (2006)

Profesor Hilary Koprowski, wybitny lekarz i naukowiec, absolwent gimnazjum im. Mikołaja Reja w Warszawie oraz Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Józefa Piłsudskiego w 1939 r., honorowy Obywatel m.st. Warszawy i Celestynowa k. Otwocka, kawaler Orderu Uśmiechu przyznanego przez dzieci, zmarł w Filadelfii (PA, USA) w czwartek 11 kwietnia 2013 r.

Profesor Hilary Koprowski urodził się w Warszawie w dniu 5 grudnia 1916 r. w domu przy nieistniejącej ul. Wielkiej 74a, w miejscu, na którym po II wojnie światowej wybudowano – na ruinach miasta zniszczonego przez Niemców – plac Defilad oraz Pałac Kultury i Nauki. Po wyjeździe z Polski w 1939 r. przedostał się poprzez Włochy do Brazylii, a następnie do USA gdzie był, między innymi, dyrektorem oraz kreatorem potęgi naukowej Instytutu Wistara w Filadelfii oraz Biotechnology Foundation Laboratories w Thomas Jefferson University w tymże mieście. Wykształcił licznych naukowców z różnych krajów świata, w tym wielu z Polski.

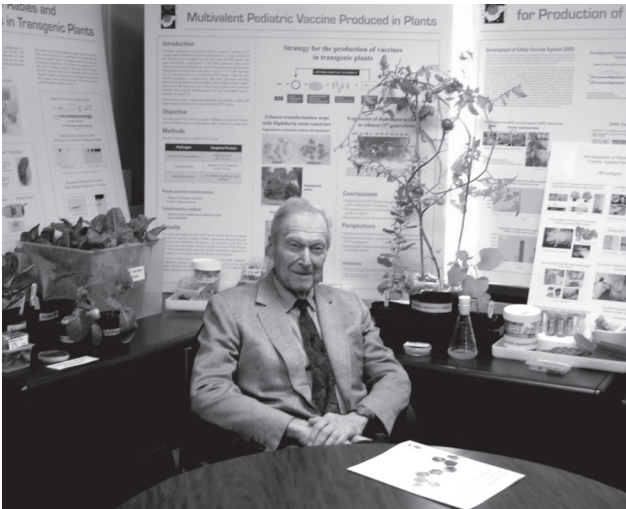
W latach 50. i 60. XX w. stworzył doustną szczepionkę atenuowaną przeciwko polio (chorobie Heinego-

-Medina) i ofiarował polskim dzieciom 9 milionów dawek szczepionki, która przyczyniła się do likwidacji tej choroby w naszym kraju. W tym kontekście warto zacytować dwa fragmenty wykładu profesora Hilarego Koprowskiego wygłoszonego podczas ceremonii wręczenia Mu tytułu doktora honoris causa SGGW w dniu 28 listopada 1998 r.: (i) *W obliczu szalejącej epidemii polio, dyrektor Państwowego Zakładu Higieny w Polsce świętej pamięci dr Feliks Przesmycki zwrócił się z prośbą o udostępnienie mojej szczepionki w celu powstrzymania zachorowań. Szybko obliczono, że Polska potrzebowała szczepionki dla 9 milionów dzieci. Firma Wyeth podjęła się jej produkcji, a Moore McCormick Steamship Line własnym transportem dostarczył szczepionkę do Polski. Było to na przełomie 1960 i 1961 roku. Dzięki temu liczba przypadków dziecięcego nagminnego porażenia zmniejszyła się z 770 do kilku w skali roku oraz (ii) Pierwsze dziesięć lat po opracowaniu szczepionki przeciwko polio czasami nazywano „wojnami o polio”. Głównymi protagonistami byli Albert Sabin i Jonas Salk. Mój udział był niewielki poza tym, że zawsze popierałem koncepcję stosowania żywej szczepionki doustnej zamiast szczepionki inaktywowanej formaliną. „Wojny o polio” rozciągnęły się aż na nominację do nagrody Nobla. W 1960 roku, Sabin, Salk i ja byliśmy poważnymi kandydatami do tej nagrody. Jednakże Sven Gard, wybitny szwedzki wirusolog szczerze nie znosił Jonasa Salka. Gard ostrzegwał Salka, że jego szczepionka nie jest wystarczająco bezpieczna, jednak Salk nie przyjął jego ostrzeżeń i doszło do zakażenia szczepionych dzieci żywym wirusem, pochodzącym z firmy Cutter (tzw. „Cutter Incident”).*

Osiągnięcia naukowe Profesora Hilarego Koprowskiego powinny być rozpatrywane w kontekście Jego blisko 70-letniej kariery naukowej związanej z opracowywaniem i wprowadzaniem do praktyki szczepionek przygotowanych w komórkach ssaków, a w ostatnich latach również w komórkach roślin jako systemie alternatywnym.

Podsumowując, badania Profesora odnosiły się, między innymi, do:

- (i) opracowania i wprowadzenia do praktyki medycznej skutecznej doustnej szczepionki atenuowanej przeciwko poliomyelitis;
- (ii) przygotowania genetycznie modyfikowanych jadalnych szczepionek roślinnych (*plant-based vaccines*)



jak, na przykład, przeciwko AIDS, wścieklicznie, ospie ludzkiej, hepatitis typu B, zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych, SARS, ptasiej grypie, wąglikowi;

(iii) do profilaktyki i leczenia chorób neurodegeneracyjnych i nowotworowych.

Tyle o fascynującym fragmencie historii niezwykłego życiorysu niezwykłego Człowieka, nie tylko znakomitego naukowca i wybitnego odkrywcy, ale i nauczyciela młodzieży, pianisty-wirtuoza po ukończonych konserwatoriach w Warszawie i Rzymie, kompozytora, erudyty i humanisty. Prawdziwie dobrego człowieka!

Profesor Hilary Koprowski, członek zagraniczny Polskiej Akademii Nauk był, między innymi, doktorem *h.c.* Uniwersytetu Ludwika-Maksymiliana w Monachium, Widner College w Chester (PA, USA), Uniwersytetu w Helsinkach, Uniwersytetu w Uppsali, polskich Akademii Medycznych w Lublinie, Poznaniu i Warszawie oraz SGGW. Został uhonorowany wieloma odznaczeniami polskimi (w tym Krzyżem Komandorskim z Gwiazdą Orderu Odrodzenia Polski) i zagranicznymi (był kawalerem Legii Honorowej i Order du Lion przyznanego przez króla Belgów).

Nazwisko Profesora Hilarego Koprowskiego na trwałe weszło do historii nauki światowej obok tak wielkich jej przedstawicieli w obszarze biomedycyny jak Edward Jenner (XVIII w.), Ludwik Pasteur (XIX w.), Albert Léon Charles Calmette i Camille Guérin (XX w.), czy też Rudolf Stefan Weigl (XX w.). Profesor Mieczysław Choraży powiedział, cyt.: *Najważniejszą cechą Koprowskiego – naukowca jest intuicja, bez niej pozostaje się rzemieślnikiem. Prawdziwy naukowiec musi mieć wizję i przemyślenia, l'esprit.* Natomiast Profesor Janusz Jeljaszewicz stwierdził, cyt.: *Hilarego nie opuszcza odkrywczy wigor młodości. Jest jak Verdi, który w późnych latach swego życia pisał wciąż wspaniałe opery... Czy mu zazdrościsz? Nie, ale chciałbym być taki jak on.*

Życie Profesora Hilarego Koprowskiego zostało opisane w autobiograficznej książce *Wygrać każdy dzień*,

jak również w książkach Profesor Ireny Koprowskiej *O moim życiu i medycynie. Wspomnienia* oraz Rogera Vaughana *Takty i fakty. Życie Hilarego Koprowskiego*. W swojej autobiografii Profesor Hilary Koprowski napisał, cyt.: *Urodziłem się w Polsce, wychowałem w Warszawie. ... Jestem człowiekiem bez korzeni. Nie ma domu, w którym się urodziłem. Nie ma mojego miasta. Warszawę, jaką pamiętam sprzed wojny, zburzono... Warszawiakom trudno odnaleźć przeszłość w ich mieście. A przecież nigdy nie zerwałem kontaktów z Polską. Ten kraj zbyt wiele dla mnie znaczy. Zbyt wiele mu zawdzięczam. Dał mi wykształcenie, szkołę, konserwatorium, studia medyczne. Niewątpliwie Polsce zawdzięczam mój intelektualny i emocjonalny rozwój.*

Część swoich młodych lat Profesor Hilary Koprowski spędził w willi kupionej w 1927 r. przez swoich rodziców w Celestynowie k. Otwocka niedaleko Warszawy. Willa ta została rozebrana do fundamentów – w wolnej Polsce – w 2004 r. (!). Społeczność Gminy i Sołectwa Celestynów pragnie odbudować tę posiadłość spełniając tym samym marzenie Profesora Hilarego Koprowskiego. W 2008 r., po uroczystości wręczenia doktoratu *h.c.* SGGW, powstała inicjatywa odbudowy zniszczonego majątku rodziny Koprowskich, która przerodziła się w powstanie w 2009 r. Stowarzyszenia Społecznego „Koprówka”, którego przewodniczącym został Profesor Tomasz Borecki (były rektor SGGW i doradca Prezydenta RP Bronisława Komorowskiego), wiceprzewodniczącymi sołtys Celestynowa Pani Izabela Filipowicz-Zaróń i autor tego artykułu, a sekretarzem dr Bogusława Filipowicz z Uniwersytetu Warszawskiego. Stowarzyszenie zostało zarejestrowane w czerwcu 2011 r.

Cześć Jego pamięci!

Prof. dr hab. Marek Niemiałowski  
 Promotor doktoratu *h.c.* SGGW 2008  
 dla Profesora Hilarego Koprowskiego  
 Zakład Immunologii,  
 Katedra Nauk Przedklinicznych,  
 Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW  
 w Warszawie



Danuta Wojcieszńska<sup>1</sup>, Katarzyna Hupert-Kocurek<sup>1</sup>, Urszula Guzik<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii,  
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. 32 2009 576, email: biochem@us.edu.pl

Wpłynęło w grudniu 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Przemiany kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych w warunkach beztlenowych. 3. Rozkład kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych w warunkach tlenowych. 4. Biotransformacja kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych. 5. Podsumowanie

#### Microbiological degradation of cinnamic acid and its hydroxyl-derivatives

**Abstract:** Microbiological degradation of cinnamic acid and its hydroxyl-derivatives occurs via aerobic or anaerobic pathway. The first step in the biodegradation of these compounds, both aerobic and anaerobic, is  $\beta$ -oxidation. The key intermediate in this process is benzoyl-CoA. In anaerobic environment this intermediate can be transformed to acetyl-CoA, incorporated into the central metabolism. Under aerobic condition benzoyl-CoA is transformed to protocatechuic acid, gentisic acid or catechol, compounds which are cleaved by a specific dioxygenase. Many microorganisms can transform phenolic acid to an amino acid or other compounds such as which 4-hydroxybenzoic acid, amide, acetophenone, which can be used in industry.

1. Introduction. 2. Anaerobic degradation of cinnamic acid and its hydroxyl-derivatives. 3. Degradation of cinnamic acid and its hydroxyl-derivatives under aerobic conditions. 4. Bioconversion of cinnamic acid and its hydroxyl-derivatives. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** degradacja, kwas cynamonowy, mikroorganizmy

**Key words:** degradation, cinnamic acid, microorganisms

## 1. Wprowadzenie

Kwas cynamonowy i jego hydroksypochodne znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle chemicznym jako prekursorzy w chemicznej syntezie flawonoidów, antybiotyków, związków przeciwutleniających, przeciwzapalnych, czy przeciwgrzybiczych [11, 15, 17, 18, 21, 24–26]. Szerokie zastosowanie tych związków skutkuje ich pojawianiem się w odpadach przemysłowych, głównie przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego i spożywczego, ale także jako produkt uboczny procesów obróbki węgla, ropy naftowej, produkcji plastiku, barwników i pestycydów [16, 27, 32]. W wysokich stężeniach fenolokwasy wpływają toksycznie na organizmy żywe, w związku z czym konieczne jest ich usuwanie ze ścieków przemysłowych. Ponadto kwas cynamonowy i jego pochodne: kwasy *p*-kumarowy, ferulowy, synapinowy, są ważnymi kopolimerami budującymi ligniny. Stąd biodegradacja fenylopropanoidów jest niezwykle istotna w globalnym obiegu węgla w przyrodzie [20]. Obecnie dużą uwagę poświęca się mikrobiologicznej degradacji toksycznych związków ze względu na zmniejszone ryzyko powstawania toksycznych intermediatów w tych procesach, niski koszt, brak konieczności wprowadzania do środowiska substancji wiążących, które dodatkowo obciążają ścieki [31]. Procesy rozkładu

kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych w biologicznych oczyszczalniach ścieków podlegają szeregowi regulacji na poziomie fizjologicznym i genetycznym. Aby były prowadzone z odpowiednią wydajnością konieczna jest znajomość szlaków ich mikrobiologicznej degradacji.

## 2. Przemiany kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych w warunkach beztlenowych

Kwas cynamonowy i jego hydroksypochodne mogą oddziaływać negatywnie na środowisko, w którym występują w dwojaki sposób: poprzez toksyczny wpływ na mikroorganizmy w nim bytujące oraz poprzez kumulację w ligninach i zaburzaniu w ten sposób obiegu węgla w przyrodzie. Jednak pomimo antybakteryjnych właściwości tych kwasów istnieje szereg mikroorganizmów zdolnych do całkowitego rozkładu lub biotransformacji kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych.

Procesy beztlenowej degradacji fenolokwasów są słabo poznane, jednak zazwyczaj wiąże się je reakcjami  $\beta$ -oksydacji, prowadzącymi do wytworzenia benzoil-CoA, głównego intermediatu w procesach beztlenowej degradacji większości jednopierścieniowych związków aromatycznych [8, 13]. Do aktywacji fenolokwasów

\* Autor korespondencyjny: Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Biochemii, ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. 32 2009 576, e-mail: urszula.guzik@us.edu.pl

dochodzi poprzez przyłączenie CoA z równoczesną hydrolizą ATP do AMP. W dalszym etapie dochodzi do przyłączenia cząsteczki wody do wiązania podwójnego pomiędzy węglami  $\alpha$  i  $\beta$  łańcucha bocznego. Następnie dochodzi do utlenienia węgla  $\beta$ . Akceptorem elektronów w tym procesie jest  $\text{NAD}^+$ . Powstały związek w wyniku tiolizy z udziałem CoA ulega przekształceniu do benzoilo-CoA i acetylo-CoA (Rys. 1) [8-10].

Benzoilo-CoA podlega dearomatyzacji pierścienia, polegającej na redukcji do cykloheksa-1,5-dien-1-karboksy-CoA przez reduktazę benzoilo-CoA. Produkt tej reakcji ulega następnie hydratacji i dehydrogenacji do 2-okso-6-hydroksycykloheksano-1-karboksy-CoA. Hydroliza tego związku prowadzi do powstania 3-hydroksypimelino-CoA. Ulega on dalej  $\beta$ -oksydacji do acetylo-CoA oraz glutarylo-CoA. Dehydrogenaza glutarylo-CoA, opisana u *Azoarcus evansii*, katalizuje utlenienie i dekarboksylację glutarylo-CoA do dwutlenku węgla i krotonylo-CoA, który następnie utleniany jest do dwóch cząsteczek acetylo-CoA [13].

Często w warunkach beztlenowych dochodzi jedynie do częściowego rozkładu kwasu cynamonowego i jego pochodnych. Uzyskane produkty niepełnego rozkładu stanowią cenne źródło ważnych substratów dla przemysłu spożywczego, kosmetycznego, farmaceutycznego.

Podstawową reakcją niepełnego rozkładu w warunkach beztlenowych jest redukcja wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych (kwasów *o*-, *m*-, *p*-kumarowego, *o*-, *m*-, *p*-metoksycynamonowego, *p*-metylocynamonowego, kawowego, ferulowego, izoferulowego) z udziałem bakterii z rodzaju *Clostridium* (*C. celerecrescens*, *C. xylanolyticum*, *C. glycolicum*, *C. aerotolerans*) oraz *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. cepacia*, *P. stutzeri*) [6, 7, 14]. Wykazano, że jednoczesna obecność grup metoksy w pozycji *meta* i *para* pierścienia aromatycznego inhibuje redukcję łańcucha bocznego [7]. Organizmy te wykorzystują kwas cynamonowy i jego hydroksypochodne jako ostateczny akceptor elektronów w utlenianiu cząsteczek wodoru wytworzonych w reakcjach energetycznych. Cząsteczka wodoru jest przyłączana do wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym kwasu, co prowadzi do jego fenylopropionowej pochodnej (Rys. 1). Szczepy z rodzaju *Clostridium* nie są zdolne do dalszego rozkładu kwasów propionowych, jednak związki te mogą być dalej degradowane przez inne, występujące w środowisku mikroorganizmy, np. *Comamonas* (*Pseudomonas testosteroni*) [3, 6, 7].

Szczep *C. aerotolerans* nie tylko przeprowadza redukcję wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym kwasu *p*-kumarowego (monohydroksylowa pochodna kwasu cynamonowego), ale również katalizuje nieoksydacyjną dekarboksylację tego kwasu. W wyniku tej reakcji powstaje 4-winylofenol, który następnie ulega redukcji do 4-etylofenolu (Rys. 1) [6, 7]. Reakcje tego typu

obserwowano również u *Lactobacillus plantarum* [5]. Dekarboksylaza, odpowiadająca za przemiany kwasów kumarowego i kawowego, wyizolowana z tego szczepu jest homotetramerem o masie cząsteczkowej 93 kDa. Enzym ten zbudowany z 174 aminokwasów i wykazuje w 67% homologię z dekarboksylazą kwasu ferulowego z *Bacillus pumilus* [5].

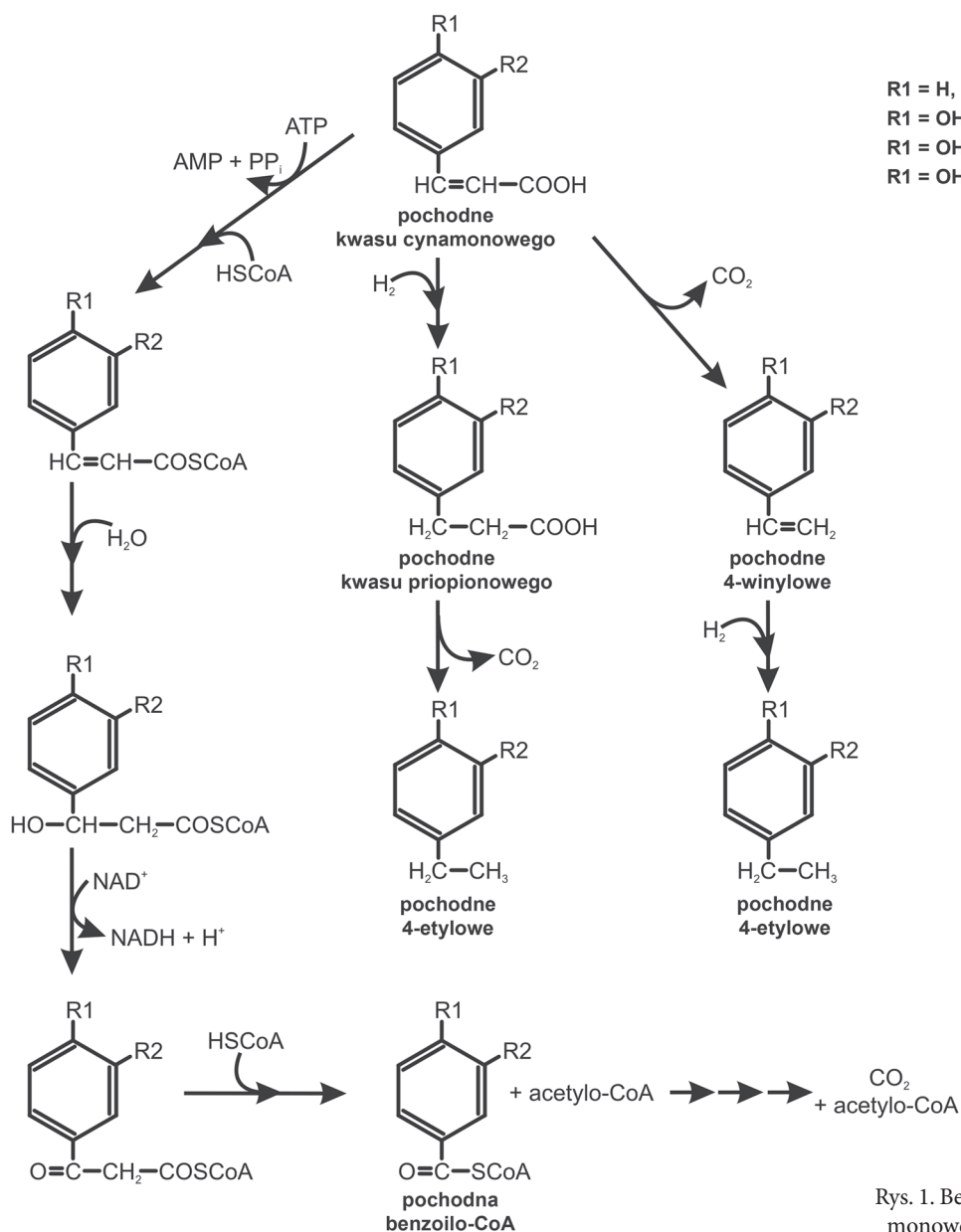
### 3. Rozkład kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych w warunkach tlenowych

Reakcje tlenowego rozkładu kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych stanowią źródło węgla i energii dla mikroorganizmów. Aerobowe szlaki rozkładu tych związków prowadzą do różnych produktów włączanych w centralny metabolizm.

Najczęściej reakcją inicjującą ich rozkład jest aktywacja cząsteczki kwasu poprzez przyłączenie CoA, w wyniku czego powstaje cynamoilo-CoA (Rys. 2). Enzymem odpowiedzialnym za ten proces jest ligaza fenylopropylo-CoA [29]. Powstały w wyniku działania tego enzymu związek podlega typowym reakcjom  $\beta$ -oksydacji, które opisano między innymi u przedstawicieli z rodzaju *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. 132, *Pseudomonas acidovorans*, *P. fluorescens* AN103), termofilnych laseczek z rodzaju *Bacillus* (*Bacillus* sp. AB066336 i Z26929, *Bacillus vulcani*), występujących w pobliżu kominów termalnych na płycznach, w gorących źródłach oraz gnijących korach drzew [14, 20] oraz drożdży *Rhodotorula rubra* i promieniowców *Actinomycetes*.

Produktami tych przemian są acetylo-CoA (wchodzący w cykl Krebsa) i aldehyd benzoesowy, który w następnym etapie podlega hydroksylacji. Obecność grupy hydroksylowej w pozycji *para* pierścienia aromatycznego powstałego aldehydu hydroksybenzoesowego umożliwia rozszczepienie jego pierścienia aromatycznego (Rys. 2) [27]. Odminną drogę rozkładu aldehydu hydroksybenzoesowego, powstałego w wyniku dekarboksylacji, zaobserwowano u szczepu *Halomonas* sp. IMPC, który odpowiada za metabolizm kwasu cynamonowego oraz jego hydroksy-, metylo- i metoksypochodnych. Aldehyd hydroksybenzoesowy jest przekształcany przez ten szczep do kwasu *p*-hydroksybenzoesowego, którego hydroksylacja prowadzi do powstania kwasu protokatechowego, jednego z centralnych intermediatów degradacji związków aromatycznych (Rys. 2). Wykazano, że obecność grupy hydroksylowej w pozycji *orto* całkowicie hamuje biodegradację fenolokwasów [1].

Kwas cynamonowy rozkładany drogą  $\beta$ -oksydacji przez *Actinomycetes* i szczepy z rodzaju *Bacillus* przekształcany jest do kwasu benzoesowego. Powstały benzoestan ulega następnie hydroksylacji do katecholu lub 3-hydroksybenzoesanu. Kwas 3-hydroksybenzoesowy



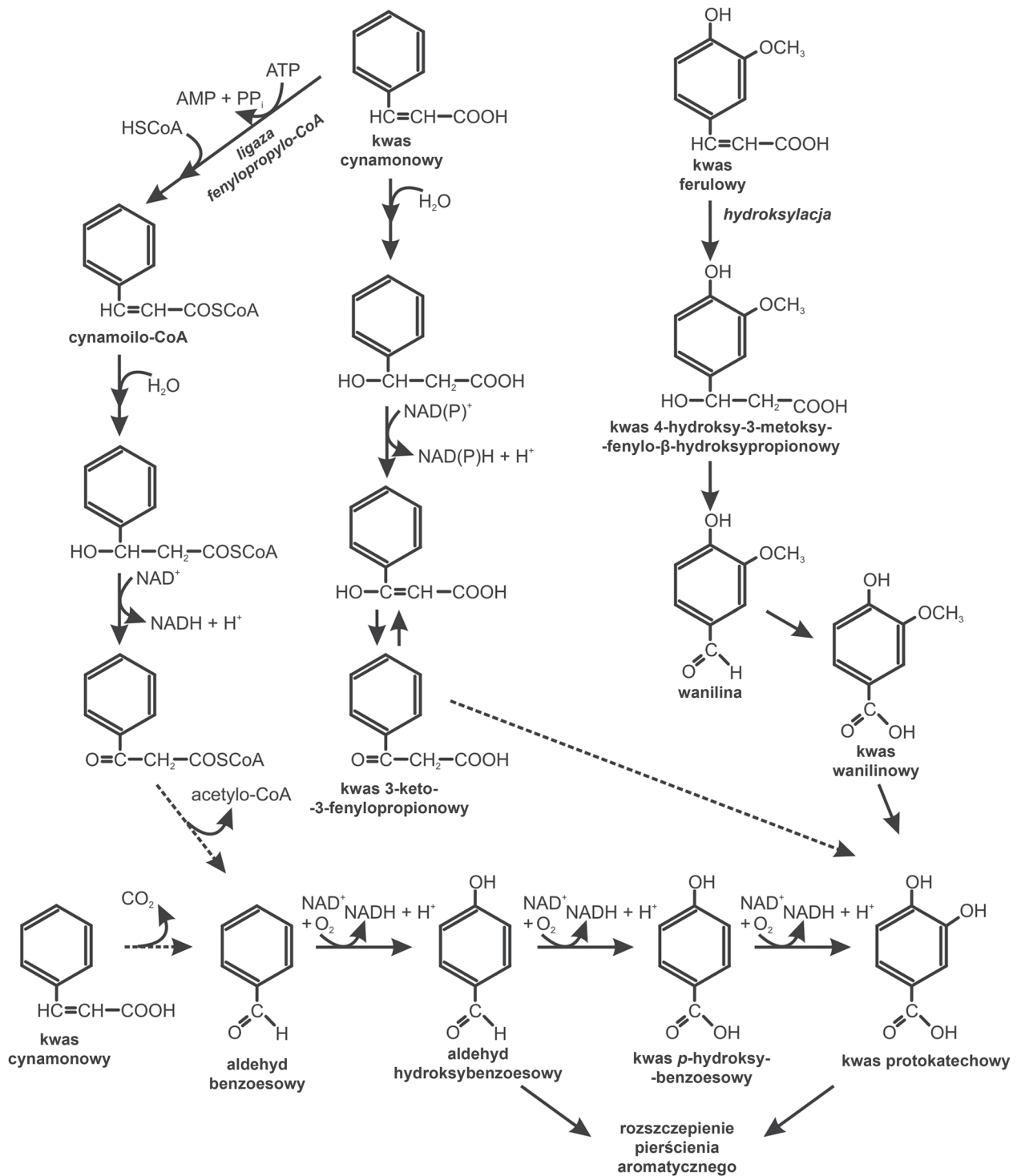
Rys. 1. Beztlenowe przemiany kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych

może następnie być przekształcany do kwasu gentyzynowego dzięki aktywności 6-hydrolazy kwasu 3-hydroksybenzoesowego. Pierścienie aromatyczne powstałych dihydroksylowych pochodnych ulegają następnie rozszczepieniu i włączeniu w przemiany cyklu Krebsa [4, 20]. Podobnie do rozkładu kwasu cynamonowego przebiega degradacja kwasu *p*-kumarowego. Produktem pośrednim jest kwas 4-hydroksybenzoesowy, który następnie jest przekształcany w kwas gentyzynowy poprzez hydroksylację przy węglu C1 pierścienia aromatycznego z równoczesnym przeniesieniem grupy karboksylowej w położenie *orto*. Powstały kwas gentyzynowy ulega następnie rozszczepieniu z udziałem oksygenazy gentyzynowej [20].

Inną drogą rozkładu fenolokwasów w warunkach tlenowych jest tak zwany szlak nie- $\beta$ -oksydacyjny. Rozkład taki opisano u szczepu B1 z rodzaju *Bacillus*,

mającego zdolność do rozkładu kwasu ferulowego oraz u szczepu *Pseudomonas* sp. 132, przeprowadzającego degradację kwasu cynamonowego. W wyniku hydroksylacji łańcucha bocznego kwasu ferulowego powstaje jako intermediat kwas 4-hydroksy-3-metoksy-fenilo- $\beta$ -hydroksypropionowy, który następnie ulega przekształceniom do waniliny. W następnym etapie dochodzi do utlenienia grupy aldehydowej i utworzenia kwasu wanilinowego. W wyniku działania odpowiedniej demetylazy kwas ten ulega przekształceniu do kwasu protokatechowego rozszczepianego przy udziale odpowiedniej dioksygenazy (Rys. 2)[12, 14, 20, 30]. Podobną drogą kwas ferulowy rozkładany jest przez promieniowce [4].

Natomiast szczep *Pseudomonas* sp. 132, przeprowadza degradację kwasu cynamonowego poprzez kwas 3-keto-3-fenylpropionowy. Reakcją inicjującą jest przyłączenie do wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym



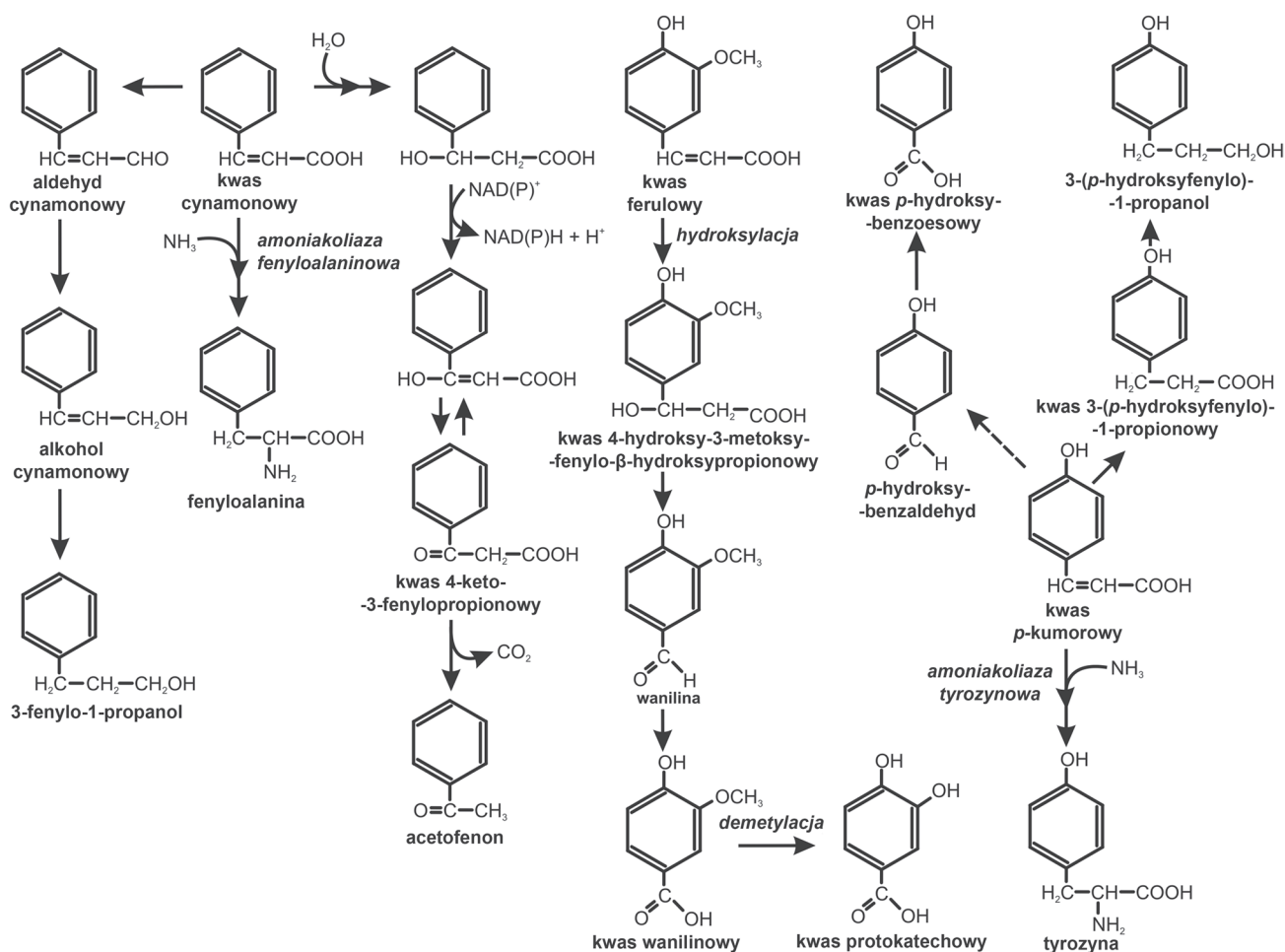
Rys. 2. Tlenowy rozkład kwasu cynamonowego i jego hydroksylowych pochodnych

cząsteczki wody, po której następują reakcje dehydrogenacji i tautomerizacji. Powstały kwas 3-keto-3-fenylpropionowy ulega dalszym przemianom również do kwasu protokatechowego (Rys. 2) [14].

Istnieje grupa mikroorganizmów mających zdolność rozszczepienia pierścienia aromatycznego fenolokwasów bez wcześniejszego usunięcia bocznego łańcucha alifatycznego. Przemianę taką opisano u szczepu *Comamonas testosteroni* TA441 [3]. Wykazuje on zdolność

degradacji kwasu *meta*-kumarowego. W pierwszym etapie zachodzi hydroksylacja węgla C2 pierścienia aromatycznego, w wyniku czego powstaje kwas 2,3-dihydroksycynamonowy. W dalszym etapie zachodzi rozszczepienie pierścienia typu *meta*. Powstały intermedial ulega lizie, w wyniku czego następuje odszczepienie fumaranu, a kwas 2-keto-4-pentenowy ulega dalszym przekształceniom do końcowych produktów: acetyl-CoA i pirogronianu [3].





Rys. 3. Biotransformacja kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych

#### 4. Biotransformacja kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych

Opisano mikroorganizmy, które nie posiadają zdolności do rozkładu kwasu cynamonowego i jego hydroksypochodnych, jednak wykazują umiejętność jego biotransformacji. Uzyskane w ich wyniku metabolity stanowią dla tych organizmów źródło aminokwasów lub innych cennych substratów. Ponadto akumulujące się w ich środowisku nieprzystawalne dla nich produkty biokonwersji mogą stać się źródłem substratów wykorzystywanych w licznych gałęziach przemysłu.

Niektóre z mikroorganizmów asymilują kwas cynamonowy i kumarowy, wykorzystując je do syntezy aminokwasów: fenyloalaniny i tyrozyny, poprzez aminowanie wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym odpowiedniego kwasu. Reakcja ta jest katalizowana przez amoniakolizę aminokwasową (AAL), ze względu na jego zdolność do przeprowadzania reakcji w dwóch kierunkach, w zależności od panujących warunków (Rys. 3). Asymilację kwasu cynamonowego zależną od światła zaobserwowano u bakterii purpurowych *Rhodobacter sphaeroides* OU5. Intensywność tego procesu zależy również od stężenia kwasu cynamonowego

(optymalne stężenie wynosi 0,5 mM, powyżej którego obserwuje się spadek aminowania) oraz rodzaju źródła węgla i energii [28]. Również drożdże *Rhodotorula glutinis* przeprowadzają aminowanie wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym kwasu cynamonowego do fenyloalaniny. Synteza AAL i jej aktywacja zachodzi w komórkach drożdży w obecności odpowiedniego stężenia kwasu cynamonowego (konwersja przebiega w przedziale stężeń 30–60 mM), bądź kumarowego i wysokiego stężenia amoniaku (powyżej 7 M) [33].

Cennych substratów dla przemysłu dostarczają między innymi *Pseudomonas* sp. 132, bakterie z rodzaju *Bacillus*, *Actinomycetes*, grzyby białej zgnilizny drewna *Schizophyllum commune*, czy mikroskopowe grzyby strzępkowe *Paecilomyces variotii* [4, 14, 19, 20, 22, 23].

Szczep *Pseudomonas* sp. 132, przeprowadza biokonwersję kwasu cynamonowego do acetofenonu. Produktem pośrednim w tej przemianie jest kwas 3-keto-3-fenylopropionowy, który jako związek niestabilny ulega spontanicznej dekarboksylacji (Rys. 3). Reakcja ta znalazła zastosowanie w przemyśle spożywczym [14]. *Actinomycetes* wykazują również zdolność do rzadkiej biokonwersji kwasu cynamonowego w odpowiedni amid [4]. Szczepy z rodzaju *Bacillus* w odpowiednich warunkach

przeprowadzają odwracalną konwersję kwasu cynamonowego do kwasu 3-fenylpropionowego [20].

Grzyby białej zgnilizny drewna *Schizophyllum commune* przeprowadzają częściowy rozkład kwasów cynamonowego, *p*-kumarowego i ferulowego w dwóch reakcjach – redukcji i rozszczepienia łańcucha bocznego. Kwas cynamonowy w wyniku redukcji grupy karboksylowej w pozycji  $\gamma$  łańcucha bocznego oraz hydrogenacji podwójnego wiązania pomiędzy atomami węgla  $C_\alpha$ - $C_\beta$  ulega przekształceniu do 3-fenyl-1-propanolu (Rys. 3). Kwas *p*-kumarowy w wyniku procesów  $\beta$ -oksydacji ulega przekształceniu do finalnego produktu – kwasu *p*-hydroksybenzoesowego lub w wyniku redukcji do 3-(*p*-hydroksyfenyl)-1-propanolu (Rys. 3). Przekształcenia kwasu ferulowego prowadzą do waniliny. W wyniku jej utlenienia powstaje kwas wanilinowy. W wyniku działania odpowiedniej demetylazy kwas ten ulega przekształceniu do kwasu protokatechowego (Rys. 3) [19, 22]. Podobną biotransformację kwasu *p*-kumarowego przeprowadzają grzyby *Paecilomyces variotii*. Finalnie pozyskiwany kwas *p*-hydroksybenzoesowy znalazł zastosowanie jako konserwant w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym oraz jako cenny monomer płynnych polimerów stosowanych w różnych gałęziach elektroniki [19, 22, 23].

## 5. Podsumowanie

Kwas cynamonowy i jego hydroksypochodne są związkami powszechnie występującymi w środowisku. Ich głównym źródłem są procesy degradacji ligninu. Do ich antropogenicznych źródeł należy przemysł petrochemiczny, farmaceutyczny, kosmetyczny. Duże stężenia tych związków zaburzają równowagę w środowisku. W związku z tym istotne są procesy ich degradacji. Związki te mogą podlegać rozkładom i zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Końcowymi produktami tych przemian są woda i dwutlenek węgla. Istnieją mikroorganizmy, które transformują fenolokwasy do cennych substratów dla wielu gałęzi przemysłu.

## Piśmiennictwo

- Abdelkafi S., Labat M., Casalot L., Chamkha M., Sayadi S.: Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain IMPC, a *p*-coumaric acid – metabolizing bacterium that decarboxylates other cinnamic acids under hypersaline conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**, 108–114 (2006)
- Angelescu E., Pavel O.D., Birjega R., Zavoianu R., Costentin G., Che M.: Solid base catalysts obtained from hydrotalcite precursor, for Knoevenagel synthesis of cinnamic acid and coumarin derivatives. *Appl. Catal. A* **308**, 13–18 (2006)
- Arai H., Yamamoto T., Ohishi T., Shimizu T., Nakata T., Kudo T.: Genetic organization and characteristics of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid degradation pathway of *Commons testesteroni* TA441. *Microbiology*, **145**, 2813–2820 (1999)
- Brunati M., Marinelli F., Bertolini C., Gandolfi R., Daffonchio D., Molinari F.: Biotransformation of cinnamic and ferulic acid with actinomycetes. *Enzyme Microb. Tech.* **34**, 3–9 (2004)
- Cavin J.-F., Barthelmebs L., Divies Ch.: Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1939–1944 (1997)
- Chamkha M., Garcia J.-L., Labat M.: Metabolism of cinnamic acid by some *Clostridiales* and emendation of the description of *Clostridium aerotolerans*, *Clostridium celerecrescens* and *Clostridium xylanolyticum*. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **51**, 2105–2111 (2001)
- Chamkha M., Labat M., Patel B.K.C., Garcia J.-L.: Isolation of cinnamic acid – metabolizing *Clostridium glycolicum* strain from oil mill wastewaters and emendation of the species description. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **51**, 2049–2054 (2001)
- Defnouv S., Ambrosio M., Garcia J.L., Traore A., Labat M.: Degradation of cinnamate via  $\beta$ -oxidation to benzoate by a defined, syntrophic consortium of anaerobic bacteria. *Curr. Microbiol.* **46**, 47–52 (2003)
- Defnouv S., Labat M., Ambrosio M., Garcia J.L., Patel B.K.C.: *Papillibacter cinnamivorans* gen. nov., sp. nov., a cinnamate-transforming bacterium from a shea cake digester. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1221–1228 (2000)
- Elder D.J.E., Morgan P., Kelly D.J.: Anaerobic degradation of *trans*-cinnamate and  $\omega$ -phenylalkane carboxylic acids by the photosynthetic bacterium and  $\beta$ -oxidation mechanism *Rhodospseudomonas palustris*: evidence for a  $\beta$ -oxidation mechanism. *Arch. Microbiol.* **157**, 148–154 (1992)
- Gawroński J., Gawrońska K., Kacprzak K., Kwit M.: Współczesna synteza organiczna. Wybór eksperymentów. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (2004)
- Greń I., Wojcieszńska D., Guzik U., Perkosz M., Hupert-Kocurek K.: Enhanced biotransformation of mononitrophenols by *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 in the presence of aromatic compounds of plant origin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 289–295 (2010)
- Guzik U., Wojcieszńska D., Hupert-Kocurek K.: Mikrobiologiczny rozkład związków aromatycznych w warunkach anoksji. *Post. Mikrobiol.* **49**, 217–226 (2010)
- Hilton M.D., Cain W.I.: Bioconversion of cinnamic acid to acetophenone by a pseudomonad: microbial production of natural flavor compound. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 623–627 (1990)
- Mendonça Neves F., Yoshiko Kawano C., Said S.: Effect of benzene compounds from plants on the growth and hyphal morphology in *Neurospora crassa*. *Braz. J. Microbiol.* **36**, 190–195 (2005)
- Michaluart P., Masferrer J.L., Carothers A.M., Subbaramaiah K., Zweifel B.S., Koboldt C., Mestre J.R., Grunberger D., Sacks P.G., Tanabe T., Dannenberg A.J.: “Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res.* **59**, 2347–2352 (1999)
- Narasimhan B., Belsare D., Pharande D., Mourya V., Dhake A.: Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *Eur. J. Med. Chem.* **39**, 827–834 (2004)
- Neradil J., Veselská R., Slanina J.: UVC – protective effect of caffeic acid on normal and transformed human skin cells *in vitro*. *Folia Biol-Prague*, **49**, 197–202 (2003)
- Nimura Y., Tsujiyama S., Ueno M.: Bioconversion of cinnamic acid derivatives by *Schizophyllum commune*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **56**, 381–387 (2010)

20. Peng X., Misawa N., Harayama S.: Isolation and characterization of thermophilic bacilli degrading cinnamic, 4-coumaric, and ferulic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1417–1427 (2003)
21. Rajan P., Vedernikova I., Cos P., Vanden Berghe D., Augustyns K., Haemers A.: Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 215–217 (2001)
22. Sachan A., Ghosh S., Mitra A.: Transforming *p*-coumaric acid into *p*-hydroxybenzoic acid by the mycelia culture of a white rot fungus *Schizophyllum commune*. *Afr. J. Microbiol. Res.* **4**, 267–273 (2010)
23. Sachan A., Gosh S., Mitra A.: Biotransformation of *p*-coumaric acid by *Paecilomyces variotii*. *Lett. Appl. Microbiol.* **42**, 35–41 (2006)
24. Said S., Neves F.M., Griffiths A.J.F.: Cinnamic acid inhibits the growth of the fungus *Neurospora crassa*, but is eliminated as acetophenone. *Int. Biodeter. Biodeg.* **54**, 1–6 (2004)
25. Staniforth V., Chiu L.-T., Yang N.-S.: Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogen-activated kinases in mouse. *Carcinogenesis*, **27**, 1803–1811 (2006)
26. Szwajgier D., Pielecki J., Targoński Z.: Antioxidant activities of cinnamic and benzoic acid derivatives. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **4**, 129–142 (2005)
27. Trivedi D.R., Dastidar P.: Instant gelation of various organic fluids including petrol at room temperature by a new class of supramolecular gelators. *Chem. Mater.* **18**, 1470–1478 (2006)
28. Usha P., Sasikala Ch., Ramana Ch.V.: Light-dependent assimilation of *trans*-cinnamate by *Rhodobacter shaeroides* OU5. *Curr. Microbiol.* **54**, 410–413 (2007)
29. Ward P.G., O'Connor K.E.: Induction and quantification of phenylacetyl-CoA ligase enzyme activities in *Pseudomonas putida* CA-3 grown on aromatic carboxylic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **251**, 227–232 (2005)
30. Wojcieszńska D., Guzik U., Greń I., Perkosz M., Hupert-Kocurek K.: Induction of aromatic ring-cleavage dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 in cometabolic systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 805–811 (2011)
31. Wojcieszńska D., Guzik U., Hupert-Kocurek K., Siupka P.: Mikrobiologiczny rozkład chlorofenoli, uciążliwych odpadów przemysłu chemicznego. *Przem. Chem.* **90**, 1515–1519 (2011)
32. Xiuxia D., Humei L., Siqing L., Janjin C., Xianyi W., Jangbin Z., Jiongshan M.: microwave assisted synthesis of benzylcinnamate catalyzed by NKC-9 macroporous resin. *Spec. Petrochem.* **2**, (2009)
33. Yamada S., Nabe K., Izuo N., Nakamichi K., Chibata I.: Production of L-phenylalanine from *trans*-cinnamic acid with *Rhodotorula glutinis* containing L-phenylalanine ammonia-lyase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 773–778 (1981)



Łukasz Kuryk<sup>1\*</sup>, Magdalena Wieczorek<sup>1</sup>, Bogumiła Litwińska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny  
Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Rys historyczny. 3. Budowa. 3.1. Genom. 3.2. Kapsyd. 4. Namnażanie wirusa polio. 4.1. Wniknięcie do komórki. 4.2. Synteza białek wirusowych. 4.3. Replikacja RNA. 5. Przebieg zakażenia wirusem polio. 6. Neurowirulencja. 7. Tropizm tkankowy wirusa polio. 8. Szczepionki przeciwko wirusowi polio. 9. Program eradykacji *poliomyelitis*. 10. Podsumowanie

### Polio – a mysterious virus

**Abstract:** Poliovirus is a very small virus; single stranded RNA of positive polarity constitutes its genetic material. It belongs to the *Picornaviridae* family and may cause the development of poliomyelitis (viral inflammation of the anterior horn of the spinal cord). At the beginning of the twentieth century, the epidemics of polio were very frequent and this fact caused an increased interest in this virus. At present, there are two types of polio virus vaccines: OPV (oral polio vaccine), which contains three serotypes of live attenuated virus and inactivated vaccine IPV (inactivated polio vaccine) containing inactive virus particles. In 1988, the World Health Organization (WHO) introduced the program of global eradication of wild-type polio virus around the world (Global Polio Eradication Initiative). The outbreaks of wild-type polio still occur in Asia and Africa. Possibility of reversion of vaccine strains of polio virus to wild type carries the fear of re-transmission of the pathogen. It is the most intensively studied enterovirus, but still remains a puzzle.

1. Introduction. 2. Historical background. 3. Structure. 3.1. Genome. 3.2. Capsid. 4. Cellular life cycle of poliovirus. 4.1. Cell entry. 4.2. Synthesis of viral proteins. 4.3. RNA Replication. 5. Poliovirus pathogenesis. 6. Neurovirulence. 7. Poliovirus tissue tropism. 8. Vaccines against poliovirus. 9. The polio eradication initiative. 10. Summary

**Słowa kluczowe:** eradykacja, neurowirulencja, szczepionki przeciwko polio, wirus polio

**Key words:** eradication, neurovirulence, vaccines against poliovirus, poliovirus

## 1. Wstęp

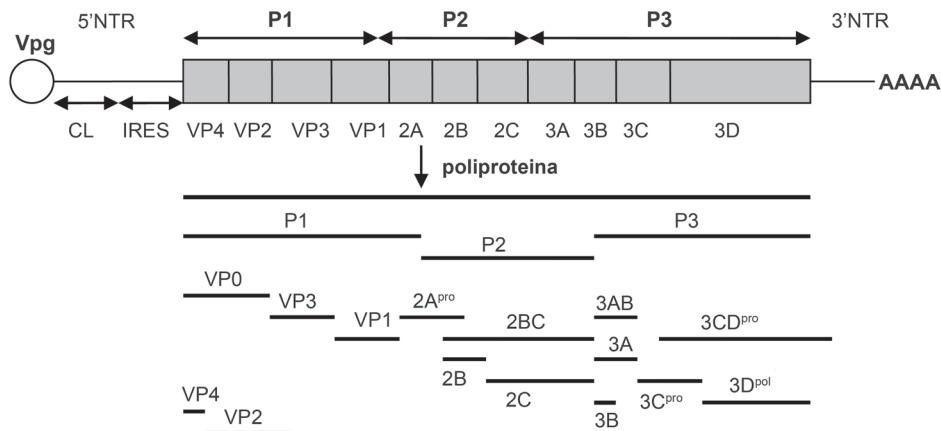
Wirus polio należy do rodziny *Picornaviridae*, jest bardzo małym wirusem, którego materiałem genetycznym jest pojedyncza nić RNA. Jest czynnikiem etiologicznym *poliomyelitis*, synonimy tej choroby to: nagminne porażenie dziecięce, wirusowe zapalenia rogów przednich rdzenia kręgowego, choroba Heinego-Medina. *Poliomyelitis* znane było już w czasach starożytnych, świadczy o tym staroegipski nagrobek, datowany na 1400 lat p.n.e., przedstawiający mężczyznę ze stopą zniekształconą w sposób typowy dla postaci porażonej. Dopiero w początkach XX wieku, kiedy miały miejsce bardzo liczne epidemie *poliomyelitis*, wyraźnie wzrosło zainteresowanie tym wirusem. Efektem badań naukowych było wynalezienie szczepionki przeciw wirusowi polio. Dzięki tej szczepionce *poliomyelitis* można było objąć ogólnosiątkowym programem eradykacji prowadzonym przez WHO.

Mimo, iż minęło już ponad 100 lat od ustalenia, że wirus jest czynnikiem etiologicznym *poliomyelitis* w dalszym ciągu pozostaje wiele pytań bez odpowiedzi na temat patogenności wirusa polio. Zdobyta wiedza i tysiące przeprowadzonych badań nie są w stanie w pełni wyjaśnić mechanizmów rozwoju choroby.

## 2. Rys historyczny

Pierwszy opis kliniczny *poliomyelitis* przedstawił Anglik – Underwood w 1793 roku, a szczegółowy obraz choroby Niemiec – Heine w 1840 roku. W tamtych czasach była to sporadycznie występująca choroba, miały miejsce tylko niewielkie ogniska epidemiczne [58]. Natomiast początek wieku XX przyniósł epidemię *poliomyelitis*, która miała swój początek w USA i Europie. Wybuch epidemii był wielkim zaskoczeniem dla środowisk medycznych, które traktowały tę chorobę jako rzadkość [71]. W 1908 roku, austriaccy uczeni Karl Landsteiner i Erwin Popper pobrali materiał od chorego na *poliomyelitis*, i po przesączeniu przez filtr wstrzyknęli dootrzewnowo małpie, u której rozwinęły się charakterystyczne objawy choroby. W ten sposób udowodnili, że *poliomyelitis* jest chorobą wirusową. Badania nad tym wirusem prowadzone przez kolejne 40 lat przyczyniły się do poznania patogenności, immunogenności i antygenowości szczepów, co zaowocowało opracowaniem dwóch efektywnych szczepionek. Konsekwencją wprowadzenia wspomnianych szczepionek w latach 60 było zaprzestanie badań nad patogennością [41, 72]. Badania skupiły się na biologii molekularnej, strukturze oraz nastąpił rozkwit badań nad genetyką wirusa

\* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Chocimska 24, 00-791 Warszawa; lkuryk@pzh.gov.pl



Rys. 1. Struktura genomu wirusa polio oraz potranslacyjna obróbka proteolityczna białek

polio. Identyfikacja receptora komórkowego CD155, który umożliwia wirusowi polio wniknięcie do komórki, przyczyniła się do wyprowadzenia transgenicznych myszy wrażliwych na zakażenie wirusem polio i spowodowała wznowienie badań nad patogennością wirusa. Badania dotyczące etiopatogenezy *poliomyelitis* są intensywnie prowadzone na całym świecie w związku z tym, że światowy program eradykacji *poliomyelitis* jest bardzo zaawansowany i zmierza ku zakończeniu [58, 71].

### 3. Budowa

#### 3.1. Genom

Genom wirusa polio stanowi pojedyncza nić RNA o dodatniej polarności, składająca się z około 7440 nukleotydów. Małe wirusowe białko, VPg jest kowalencyjnie związane z końcem 5' nici RNA. Koniec ten – 5' NTR zbudowany jest z 742 nukleotydów [17, 38, 70], pierwsze 88 nukleotydy tworzą drugorzędową strukturę liścia koniczyny (clover leaf), która uczestniczy w inicjacji kompleksu replikacyjnego podczas syntezy dodatkowo

nici RNA [3, 75]. Najważniejszą strukturą końca 5' jest jednak struktura IRES (internal ribosomal entry site), tzw. wewnętrzne miejsce replikacji. Inicjacja translacji z udziałem IRES ma inny przebieg niż inicjacja zachodząca przez kap-zależny system. IRES poprzedza otwartą ramkę odczytu (open reading frame, ORF) [34, 56], kodującą poliproteinę budowaną przez 2209 aminokwasów [17, 38, 70]. Poliproteina podlega obróbce proteolitycznej przez proteiny 2A<sup>pro</sup> i 3C<sup>pro</sup>/3CD<sup>pro</sup> [43]. Region genomu ulegający procesowi translacji (ORF) koduje białka strukturalne (P1) oraz niestrukturalne (P2 i P3) (Rys. 1). Końcowy odcinek genomu wirusa polio to region 3' NTR, zawiera on 70 nukleotydów i jest zakończony sekwencją poli(A), która bierze czynny udział w replikacji RNA [58].

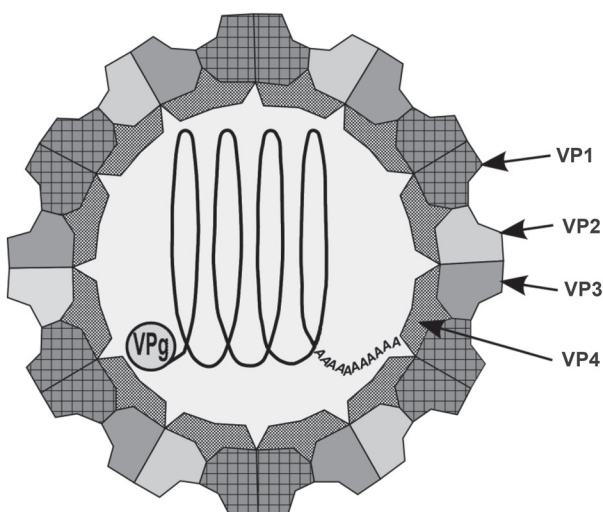
#### 3.2. Kapsyd

Genom wirusa polio zamknięty jest w ikosaedralnym kapsydie składającym się z 60 protomerów tworzonym przez białka strukturalne (VP1, VP2, VP3 i VP4) kodowane w regionie P1. Monomery VP1, VP2 i VP3 występują na powierzchni ikosaedralnego kapsydu, podczas gdy VP4 po jego wewnętrznej stronie (Rys. 2). W kapsydie wirusa polio występuje wąskie wklęsnięcie powierzchni każdej trójkątnej ściany określane mianem kanionu, utworzone przez stykające się ze sobą monomery. Struktura kanionu jest miejscem wiązania receptora komórkowego CD155. Taki typ wiązania pozwala wirusowi unikać działania układu odpornościowego, ponieważ cząsteczki immunoglobuliny są zbyt duże i nie mogą penetrować do wnętrza kanionu [58, 81].

### 4. Namnażanie wirusa polio

#### 4.1. Wniknięcie do komórki

Wirus polio swoiście przyłącza się do powierzchni wrażliwej komórki gospodarza za pośrednictwem receptora CD155 [40, 54, 80]. CD155 jest transbło-



Rys. 2. Schemat budowy cząsteczki wirusa polio (objaśnienia w tekście)

nową glikoproteiną składającą się z trzech zewnątrzkomórkowych domen: D1-D3 [59]. CD155 pośredniczy w adhezji komórki do zewnątrzkomórkowego matriksu. Wewnątrzkomórkowa C-terminalna domena ma powinowactwo do Tctex-1, podjednostki kompleksu motorycznego dyneiny [64]. Część wirusa, a dokładnie kanion obecny w strukturze kapsydu, łączy się z częścią N-końcową domeny glikoproteiny, co prowadzi do usunięcia reszty lipidowej z kieszonki tworzonej przez VP1. Następstwem tego procesu jest destabilizacja cząstki wirusowej, rozluźnienie jej struktury. Następuje otwarcie kanału przez który białko VP4 wychodzi z kapsydu, ostatecznie zostaje uwolniony kwas nukleinowy [31]. Następnie materiał genetyczny wirusa wnika do wnętrza komórki (cytoplazmy) gdzie ulega translacji i replikacji [5, 14, 28, 48].

Istnieje kilka teorii tłumaczących mechanizm transportu RNA do wnętrza komórki. Jedną z nich zakłada, iż po związaniu się cząstki wirusa z receptorem CD155, dochodzi do formowania cząsteczki 135S zwanej cząstką A [16, 19], która nabywa właściwości hydrofobowe, charakteryzuje się ona brakiem białka VP4. Dochodzi do wzajemnych oddziaływań receptor – cząstka A, co prowadzi do powstania porów na powierzchni błony komórkowej, przez które jest wstrzykiwany RNA wirusa do cytoplazmy [23, 58]. Inna teoria zakłada wnikanie materiału genetycznego wirusa polio za pomocą endocytozy; potwierdzają to doświadczenia w których wirusa polio znajdowano w endosomach, jednakże potencjalny mechanizm tego transportu nie został wyjaśniony [44, 63].

## 4.2. Synteza białek wirusowych

Następstwem zakażenia komórki wirusem polio jest wniknięcie jego materiału genetycznego do cytoplazmy, który funkcjonuje jako mRNA i podlega translacji, w wyniku której powstaje poliproteina. Następnie poliproteina ulega proteolitycznemu cięciu, którego produkty funkcjonują jako prekursor białek kapsydu i białek replikacyjnych [89]. Proces ten przeprowadzają trzy proteazy:  $2A^{pro}$  i  $3C^{pro}/3CD^{pro}$  [47]. Obróbka poliproteiny przebiega w trzech etapach. Na początku proteaza  $2A^{pro}$  przeprowadza cięcie na własnym końcu aminowym, w wyniku którego uwalniany jest prekursor kapsydu P1. W drugim etapie w wyniku cięcia *cis* przeprowadzonego przez proteazę  $3CD^{pro}$  dochodzi do rozszczepienia P3 od kompleksu białka [47]. Na tym etapie powstają również białka strukturalne VP0, VP1 i VP3 oraz niestrukturalne 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg),  $3C^{pro}$ ,  $3D^{pol}$  w wyniku cięcia *trans* białek prekursorowych przez  $3CD^{pro}$ . Ostatnie cięcie proteolityczne ma miejsce w czasie dojrzewania cząstek wirusowych, już po zapakowaniu kwasu nukleinowego do kapsydu, w wyniku autokatalitycznego cięcia VP0 powstaje VP4 i VP2 [4] (Rys. 1).

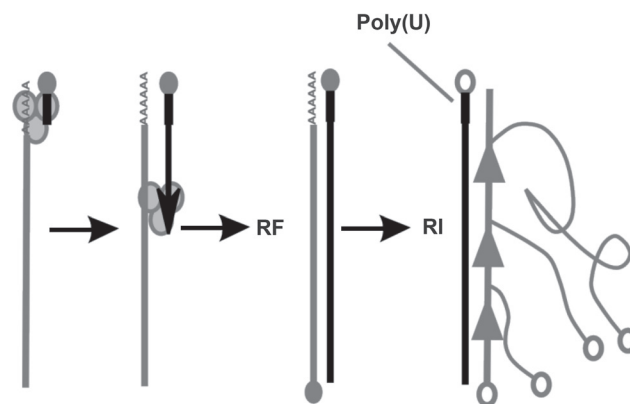
Ważne jest to, że wirusowe proteazy  $2A^{pro}$  i  $3C^{pro}$  hamują funkcje komórki gospodarza.  $2A^{pro}$  trawi p220, komponentę kompleksu eIF-4F, w wyniku czego dochodzi do inaktywacji kap-zależnej translacji komórkowej [42, 82]. Z kolei  $3C^{pro}$  unieczynnia czynnik transkrypcyjny TFIIC i tnie białko wiążące sekwencję TATA (TBP, TATA-binding protein) [90], co prowadzi do całkowitego zahamowania syntezy białek komórkowych.

## 4.3. Replikacja RNA

Uproszczony schemat procesu replikacji wirusowego RNA przedstawia się następująco (Rys. 3):

Wirusowe, jednoniciowe (+) RNA → synteza jednoniciowego (-) RNA → RF (replikacyjna forma dwuniciowego RNA) → synteza jednoniciowego (+) RNA → RI (forma pośrednia RNA) → jednoniciowy (+) RNA. [89]

Liczne badania mutacji i badania genetyczne wykazują, iż białka niestrukturalne wirusa polio są zaangażowane w proces replikacji RNA [67]. Najważniejszą funkcję w tym procesie pełni jednak RNA zależna polimeraza RNA  $3D^{pol}$ . Enzym ten katalizuje syntezę nici (-) oraz (+) kwasu rybonukleinowego. Polimeraza RNA posiada dwie aktywności katalityczne [20]. Po pierwsze katalizuje syntezę nici na podstawie komplementarnej matrycy oraz dokonuje addycji reszt urydyny do VPg (VPg-pU-pU). Urydylowane VPg (3B) służy jako białkowy starter w replikacji wirusowego RNA. Od dawna postulowano, iż urydylacja VPg ma miejsce tylko na ogonku poly(A) nici o dodatniej polarności, jednakże brakowało jednoznacznych dowodów potwierdzających tą hipotezę. Dużym przełomem w zrozumieniu tego procesu było odkrycie wewnętrznej struktury RNA o strukturze szpilki do włosów, zwanej inaczej elementem *cre* (cis-replicating element) [51, 52]. Sekwencja *cre* u wirusa polio zlokalizowana jest w kodującym regionie 2C [25]. Wzór urydylacji VPg jest warunkowany konserwatywną sekwencją GXXXAAACXXXXXA [68, 69, 74, 93] zawartą w pętli struktury szpilki do włosów i jest regulowany przez proteinazę  $3CD^{pro}$  [68, 69].



Rys. 3. Schemat replikacji materiału genetycznego wirusa polio (objaśnienia w tekście)

Paradoksalnie, urydylacja i synteza nici (-) wymagają nieuszkodzonej struktury liścia kończyny na 5' końcu [50]. Struktura ta oddziałuje z 3' poli(A) końcem w momencie zakończenia procesu translacji i rozpoczęcia syntezy nici (-). W wyniku czego powstaje kołowa cząsteczka genomu. Mechanizm ten pozwala na replikację tylko cząsteczek o pełnej długości [30].

W komórkach zakażonych wirusem polio jest około 50 razy więcej (+) RNA aniżeli nici o ujemnej polarności [58]. Replikacja przebiega w cytoplazmie (struktura rozety membrano-podobnej pochodzącej z retikulum endocytoplazmatycznego) i jest indukowana za pomocą wirusowych białek 2C i 2BC [6, 12, 85]. Hydrofobowa domena 3AB kotwiczcy białko w strukturze błonowej a dzięki powinowactwu 3AB do 3D<sup>pol</sup> i 3CD<sup>pro</sup>, tworzy się kompleks replikacyjny. Sam proces replikacji przeprowadza RNA zależna polimeraza RNA 3D<sup>pol</sup> [31].

Składanie i dojrzewanie cząstek wirusa polio jest słabo poznane. W genomie wirusa polio nie zidentyfikowano sygnału odpowiedzialnego za pakowanie RNA do kapsydu.

Cykl komórkowy wirusa jest bardzo szybki i wydajny, powoduje śmierć komórek gospodarza w ciągu 7–8 godzin od momentu zakażenia. Cykl replikacyjny jest cyklem litycznym, jednakże znane są przypadki zakażenia przewlekłego bez wywoływania lizy komórek gospodarza [13].

Badania *in vivo* wykazały, że zakażenie wirusem polio może prowadzić do apoptozy. Przypuszczalnym celem programowej śmierci komórek jest limitowanie namnażania i rozprzestrzeniania się wirusa. Proces ten jest stymulowany przez samego wirusa, bowiem aktywatorem apoptozy są wirusowe proteinazy 2A<sup>pro</sup> i 3C<sup>pro</sup> [2]. Z drugiej strony wirus polio może również być inhibitorem apoptozy, co potwierdziły badania z udziałem 2B/2BC, 2C<sup>ATPaza</sup> i 3A, które znoszą apoptozę. Świadczy to, iż funkcje proapoptotyczne i antyapoptotyczne wirusa polio koegzystują ze sobą podczas zakażenia, co wydaje się bardzo ważnym elementem w procesie patogenezy [2, 58].

## 5. Przebieg zakażenia wirusem polio

Wrota zakażenia stanowi jama ustna. Po wnikięciu poliowirusy namnażają się w tkance limfatycznej gardła i układu pokarmowego [8, 78]. Okres inkubacji na ogół trwa od 7 do 14 dni, ale obserwowano przypadki w których wynosił od 2 do 35 dni. Precyzyjne miejsce i typ komórek wykorzystywanych przez wirusa do replikacji nie jest do końca poznany i określony. Wirus polio był izolowany z tkanek limfatycznych układu pokarmowego, takich jak migdałki, kępkę Peyera znajdujące się w błonie śluzowej i podśluzowej jelita cienkiego oraz z jelita krętego i krezkowych węzłów chłonnych [8, 10, 53, 77, 78].

U większości osób zakażonych wirusem polio pojawia się przemijająca wiremia. Wirus rozprzestrzenia się do tkanek siateczkowo-śródbłonkowych nie wywołując objawów klinicznych. U 4–8% zakażonych osób dochodzi do pojawienia się symptomów chorobowych określanych jako „minor illness”, wlicza się do nich gorączkę, ból głowy i gardła (tzw. postać poronna) [8, 53, 78]. Wirus namnaża się w jelicie człowieka i jest wydalany z kałem, niosąc ryzyko transmisji patogenu.

## 6. Neurowirulencja

W bardzo rzadkich przypadkach, u około 1–2% zakażonych osób, dochodzi do rozwoju *poliomyelitis*. Wówczas wirus polio atakuje układ nerwowy, replikując się w neuronach w obrębie rdzenia kręgowego, pnia mózgu lub kory mózgowej [71]. Rozwój objawów w obrębie OUN (ośrodkowy układ nerwowy) może być potraktowany jako „wypadek” podczas zakażenia, gdyż nie przynosi żadnych zysków dla wirusa oraz komórki nerwowe nie są wymagane do replikacji wirusa polio. Molekularny mechanizm tego procesu do dnia dzisiejszego nie został wyjaśniony. Nie udało się poznać i zrozumieć przebiegu oraz rozwoju *poliomyelitis* w OUN. Wiedza dotycząca patogenności wirusa polio opiera się na badaniach przeprowadzonych na modelach mysich oraz na naczelnych (od 1941 r. – do dzisiaj) i w dalszym ciągu nie wyjaśnia rozwoju i przebiegu patogenezy u ludzi [9, 15, 18, 29, 32, 33, 35, 36, 40, 41, 77, 79, 87].

*Poliomyelitis* powoduje selektywną destrukcję neuronów ruchowych, prowadząc do paraliżu, a w niektórych przypadkach do zatrzymania oddychania i śmierci [92].

Dominują dwie teorie tłumaczące mechanizm transportu wirusa polio do OUN. Pierwsza z nich zakłada, że cząsteczki zakaźne wirusa przekraczają barierę krew-mózg, niezależnie od receptorów swoistych dla wirusa polio [2, 58, 92]. Druga hipoteza poparta badaniami na myszach CD155 tg [27, 66, 73] mówi, że wirus jest transportowany z mięśni do rdzenia kręgowego i mózgu na zasadzie wstecznego transportu aksonalnego. Według tej teorii receptory dla wirusa polio zlokalizowane są u ludzi na powierzchni synaps. Wirus polio łączy się z receptorem, którego cytoplazmatyczna domena oddziałuje z białkami motorycznymi – dyneinami. Następnie patogen wnika do wnętrza aksonu na zasadzie endocytozy i cząsteczki wirusa są transportowane wzdłuż mikrotubul przez akson do ciała komórki nerwowej, gdzie dochodzi do odpłaszczenia i replikacji. W obu teoriach warunkiem przedostania się wirusa do układu nerwowego jest obecność wirusa we krwi (wiremia). Wykazano możliwość replikacji wirusa polio w komórkach krwi (monocytach) co może mieć znaczenie w procesie krążenia wirusa w organizmie oraz jego transportu do OUN [22, 71].



Istotne dowody na przedostawanie się wirusa do OUN uzyskano na podstawie licznych badań i obserwacji przeprowadzonych u ludzi i u małp. Wykazano, iż inokulacja wirusa polio do nerwu kulszowego u małp prowadzi do rozprzestrzeniania się wirusa wzdłuż włókien nerwowych w nerwach obwodowych i rdzeniu kręgowym. Co więcej, w wyniku inokulacji domięśniowej dochodzi u małp do porażenia w pierwszej kolejności tej kończyny, do której wstrzyknięto patogen, po czym wirus przedostaje się do rdzenia kręgowego [58]. U dzieci, które zostały zaszczerpione w 1943 roku niecałkowicie inaktywowaną szczepionką przeciwko wirusowi polio (wypadek Cuttera), obserwowano również porażenie zaszczerpionych kończyn [59]. Dowody na neuronalne rozprzestrzenianie się wirusa pochodzą także z eksperymentów na transgenicznym myszom CD 155 [27]. Potwierdzono, iż po zakażeniu wirusem w pierwszej kolejności dochodzi zawsze do porażenia kończyny, do której drogą iniekcji wprowadzano wirusa.

Co ciekawe wykazano, że uszkodzone mięśnie są czynnikiem predysponującym do wystąpienia *poliomyelitis*, co zostało zaobserwowane między innymi w Rumuni [84]. Doświadczalnie zjawisko to odtworzono na transgenicznym myszom, wywołując *poliomyelitis* (provocation *poliomyelitis*). Ustalono, że uszkodzone mięśnie szkieletowe stymulują aksonalny transport wirusa do rdzenia kręgowego [84]. Mechanizmu tego procesu nie udało się do końca wyjaśnić, ale pewnych wskazówek dotyczących możliwości przemieszczania się wirusa polio w układzie nerwowym dostarczyło odkrycie mówiące, iż cytoplazmatyczna domena CD155 łączy się z Tctex-1 [57]. Odkrycie to sugeruje hipotezę aksonalnego transportu wirusa polio. Zgodnie z jej założeniem w miejscu połączenia mięśni i neuronu ruchowego cząsteczka wirusa polio (160S) łączy się z domeną CD155, po czym wnika do wnętrza neuronu na zasadzie endocytozy. Pęcherzyki transportujące wirusa polio są związane z Tctex-1 poprzez domenę CD155, która pozostaje na zewnątrz pęcherzyka. Po dostarczeniu cząsteczki wirusa do wnętrza komórki nerwowej następuje uwolnienie wirusowego RNA i rozpoczęcie procesu replikacji [58].

## 7. Tropizm tkankowy wirusa polio

Wirus polio zakaża tylko określone komórki oraz tkanki i jedynie w momencie wiremii znajduje się w wielu różnych organach [7, 78]. Przez wiele lat uważano, że tropizm wirusa związany jest z obecnością swobodnego receptora komórkowego. Po odkryciu, że CD155 jest receptorem dla wirusa polio okazało się, że ulega on ekspresji w wielu tkankach, także tych, które nie ulegają zakażeniu. Wysłunięto wnioski, że obecność receptora CD155 na powierzchni komórki, czyni ją wrażliwą na

zakażenie wirusem polio, a tropizm tkankowy wiąże się z późniejszym etapem zakażenia [21, 39, 54]. Sugerowano, że tropizm tkankowy wirusa polio jest uzależniony od różnic w procesie translacji zależnym od IRES w różnych typach komórek, ale hipoteza ta nie została potwierdzona [11, 26, 64, 65, 91].

Tropizm tkankowy wielu wirusów regulowany jest poprzez wczesną odpowiedź immunologiczną związaną z syntezą interferonu alfa/beta (IFN $\alpha/\beta$ ) [24, 76]. Podobne obserwacje poczyniono dla wirusa polio. Zakażenie wirusem polio myszy transgenicznym z ludzkim receptorem CD155, ale nie posiadającym receptora dla IFN $\alpha/\beta$  umożliwiło replikację wirusa nie tylko w OUN, ale także w wątrobie, śledzionie oraz trzustce. CD155 ulega ekspresji we wszystkich wymienionych organach, ale wirus polio ulega replikacji tylko w mózgu i rdzeniu kręgowym myszy, które posiadają receptor dla IFN $\alpha/\beta$ . Zakażenie wirusem polio myszy transgenicznym CD155 prowadzi do silnej ekspresji genów stymulowanych obecnością IFN (ISG – IFN-stimulated genes) w tkankach, które nie są zazwyczaj miejscem replikacji wirusa polio. W przeciwieństwie do niewielkiej ekspresji ISG w mózgu i rdzeniu kręgowym, w czasie zakażenia. Może to sugerować, że IFN $\alpha/\beta$  warunkuje tropizm tkankowy wirusa polio u transgenicznym myszy CD155 i warunkuje ochronę wrażliwych organów takich jak śledziona czy wątroba [71].

Identyfikacja IFN $\alpha/\beta$  jako czynnika warunkującego tropizm tkankowy wirusa polio spowodowała pojawienie się spekulacji na temat mechanizmów patogenez. Po namnożeniu wirusa w tkance limfatycznej układu pokarmowego, następuje etap wiremii kiedy wirus wraz z krwią roznoszony jest po całym organizmie i trafia do różnych organów. Przypuszcza się, że wymagana jest replikacja wirusa w pewnych tkankach by wirus mógł dostać się do ośrodkowego układu nerwowego. W przypadku 99% zakażeń wczesna odpowiedź związana z syntezą IFN $\alpha/\beta$  hamuje replikację wirusa i tym samym przeciwdziała przedostaniu się wirusa do układu nerwowego. W 1–2% przypadków, w których po zakażeniu występują porażenia, odpowiedź związana z syntezą IFN $\alpha/\beta$ , jest defektywna, co prowadzi do wzmożonej replikacji wirusa oraz do inwazji układu nerwowego [71].

Doświadczenie na transgenicznym myszom CD155, wskazujące na IFN $\alpha/\beta$  jako czynnik limitujący zakażenie wirusem polio, jest mocno zaskakujące biorąc pod uwagę, że w czasie zakażenia w komórce dochodzi do zahamowania: kap-zależnej translacji, DNA-zależnej syntezy RNA, sekrecji białek komórkowych, transportu jądrowego oraz supresji odpowiedzi związanej z NF- $\kappa$ B [60]. Biorąc pod uwagę jak wirus polio wpływa na metabolizm komórki trudno sobie wyobrazić, że IFN $\alpha/\beta$  jest w stanie zahamować rozwój zakażenia, tym bardziej, że działanie interferonu oparte jest na działaniu szlaków komórkowych hamowanych przez wirusa polio. Co

więcej, replikacja wirusa w hodowlach komórkowych nie jest hamowana przez IFN $\alpha/\beta$ , ale trudno odnosić doświadczenia prowadzone *in vitro* w hodowlach komórkowych do tak złożonego układu jakim jest organizm człowieka [71].

## 8. Szczepionki przeciwko polio

Najskuteczniejszym sposobem zapobiegania zakażeniom wirusem polio są szczepienia ochronne. W chwili obecnej dostępne są dwa rodzaje szczepionek: szczepionka OPV (oral polio vaccine) w skład której wchodzi żywe, atenuowane trzy serotypy wirusa oraz szczepionka inaktywowana IPV (inactivated polio vaccine) zawierająca nieaktywne cząsteczki wirusa typu 1, 2 i 3 [71].

Szczepionka IPV została opracowana przez Joansa Salka w połowie lat pięćdziesiątych w Stanach Zjednoczonych. Trzy serotypy wirusa polio zostały poddane działaniu formaliny, co skutecznie zniósło zjadliwość bez wpływania na ich właściwości antygenowe. Pierwsza licencja na wspomnianą szczepionkę została wydana w USA w 1955 roku, redukując liczbę zakażeń o ok. 99%. Skuteczność szczepionki została przetestowana w Skandynawii oraz Holandii. Pojawiły się jednakże obawy związane ze stosowaniem szczepionki IPV. Nasunęły się pytania, czy zabita szczepionka będzie skuteczna w rejonach mniej rozwiniętych o większej ekspozycji na dzikiego wirusa polio. Wówczas zrodziły się pomysły na opracowanie żywej, atenuowanej szczepionki, która stymulowałaby miejscową syntezę przeciwciał IgA w układzie pokarmowym i tym samym wywoływałaby wyższą odporność u zaszczepionych osób. Szczepionka OPV została opracowana przez Alberta Sabiną i wprowadzona do użycia we wczesnych latach 60. Skuteczność szczepionki sprawdziła się i przyczyniła do zahamowania epidemii *poliomyelitis* i transmisji dzikiego wirusa polio [55].

Należy także nie zapominać, że pierwszy na świecie atenuowany szczep wirusa polio uzyskał nasz rodak – Hilary Koprowski. Jego prace nad atenuacją wirusa polio wiązały się z zakażaniem szczura bawelnianego. Po raz pierwszy szczepionka Koprowskiego została podana w 1950 roku, a pierwsze masowe szczepienia miały miejsce w 1958 r. w Kongo. W 1959 r. dzięki inicjatywie ówczesnego dyrektora Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie profesora Feliksa Przemyckiego rozpoczęto masowe szczepienia szczepionką Koprowskiego, co spowodowało zahamowanie epidemii, która trwała w Polsce od 1951 roku.

Prowadzenie pasażu szczepu wirusowego w komórkach podobnych, ale nie identycznych do komórek w których wirus się namnaża w sposób naturalny, prowadzą do selekcji wirusowych subpopulacji, które zachowują możliwość zakażenia komórek gospodarza

przy znacznie obniżonej wirulencji. Proces ten nazywamy atenuacją i jest to mechanizm prowadzący do otrzymania szczepionek zawierających żywe szczepy wirusowe. Atenuowane szczepy szczepionkowe polio typu 1 i 3 zostały wyizolowane z wcześniej zakażonych komórek nerwowych małp. Prekursorowe szczepy wirusa polio typu 1 (Mahoney) i 3 (Leon) zostały dobrze opisane i poznane, co pozwoliło na określenie genetycznych różnic pomiędzy formami szczepionkowymi a ich szczepami rodzicielskimi. Prekursor szczepu szczepionkowego typu 2 nie jest znany. Rodzicielski szczep szczepu szczepionkowego typu 2 uległ atenuacji w wyniku domózgowej iniekcji wykonanej u małp. Wykazano, iż sekwencja genomu szczepionkowego polio typu 2 różni się od wszystkich znanych dotychczas sekwencji wirulentnych wirusów tego typu (np. szczepu Lansing). Mutacje prowadzące do atenuacji typu 2 nie zostały szczegółowo zidentyfikowane z powodu braku szczepu rodzicielskiego [58].

Porównując sekwencję genomów szczepów szczepionkowych typu 1 i typu 3 z sekwencjami odpowiednich prekursorów wykazano nieoczekiwane i zaskakujące różnice. Szczep szczepionkowy typu 1 posiada 57 różnic w sekwencji nukleotydów i 21 zmian w sekwencji aminokwasów w porównaniu do wyjściowego szczepu Mahoney [62], z kolei różnice pomiędzy szczepem szczepionkowym typu 3, a szczepem Leon ograniczają się do 10 zmian w sekwencji nukleotydowej i trzech zmian w sekwencji aminokwasów [83]. Znaczące różnice w ilości mutacji prowadzących do atenuacji typu 1 w porównaniu do typu 3 mają wyraźny wpływ na bezpieczeństwo szczepionki. Z tego powodu rewersja szczepu szczepionkowego typu 1 do wariantu o zwiększonej neurowirulencji jest bardzo rzadka, natomiast większość przypadków paraliżu po podaniu szczepionki (VAPP – vaccine associated paralytic *poliomyelitis*) była spowodowana szczepem typu 3 [89].

Na podstawie przeprowadzonych badań, których celem było porównanie zmian w sekwencjach nukleotydów szczepów szczepionkowych typu 1 i 3 powodujących osłabienie neurowirulencji wykazano istotne różnice w dwóch *loci*. Zmiana w pierwszym *loci* dotyczy regionu poliproteiny kodującej kapsyd (domena P1). Domena P1 szczepu szczepionkowego typu 1 zawiera 22 mutacje w sekwencji nukleotydów prowadzące do 12 zmian w sekwencji aminokwasów. Z kolei domena P1 szczepu szczepionkowego typu 3 posiada tylko 2 różnice w sekwencji nukleotydów co przekłada się na 2 zmiany w sekwencji aminokwasów. Mutacje w regionie P1 u obu typów skutkują pojawieniem się cechy termowrażliwości (fenotyp ts) [49]. Ponadto szczep szczepionkowy typu 1 posiada dodatkowo 2 różnice w sekwencji aminokwasów polimerazy RNA (3D<sup>pol</sup>) [68, 69, 86].

Zmiana w drugim *loci* genomu szczepów szczepionkowych wirusa polio dotyczy domeny V regionu 5' IRES.

W tym przypadku pojedyncze mutacje punktowe prowadzą do osłabienia zjadliwości poszczególnych serotypów (różne mutacje dla każdego szczepu) [1, 46]. Pojedyncze zmiany w sekwencji nukleotydów doprowadziły do obniżenia wydajności namnażania się dzikiego polio w komórkach nerwowych i wytworzenia atenuowanego fenotypu w organizmie transgenicznych myszy CD 155 [45] i małp [88].

Badania innych naukowców z kolei podważają rolę mutacji w domenie V regionu 5' IRES w atenuacji szczepu typu 3. Sugerują, iż ta mutacja punktowa (nukleotyd 471) [37] w żaden sposób nie prowadzi do osłabienia zjadliwości wirusa polio typu 3. Dlaczego więc szczepionka przeciwko temu serotypowi jest bezpieczna? Po pierwsze typ 3 jest najmniej wirulentnym wirusem, powoduje *poliomyelitis* u jednej osoby na 1000 zakażonych. Po drugie mutacja w IRES jak i w regionie kodującym kapsyd może przyczynić się jedynie do ograniczenia rozprzestrzeniania się szczepu PV3 z układu pokarmowego do systemu nerwowego, jednakże w chwili obecnej nie wyjaśniono tego mechanizmu. Niektórzy naukowcy są bardziej sceptyczni w kwestii atenuacji typu 3, dla nich brak rozwoju choroby u osób zaszczepionych nie jest dowodem na brak zakażenia komórek nerwowych [58, 89].

W chwili obecnej nie milkną obawy związane ze stosowaniem żywej szczepionki. Jak wiadomo szczepionka OPV, podawana doustnie imituje naturalne zakażenie, co niesie ryzyko rewersji formy szczepionkowej do dzikiej. Sporadycznie również zdarzają się przypadki VAPP (Vaccine Associated Paralysis Polio), która jest jednostką chorobową wywoływaną atenuowanym szczepem polio. Jest to zespół objawów podobnych do *poliomyelitis*, które występują przeciętnie z częstotliwością 1 na 750 000 dawek szczepionki OPV [61, 71].

## 9. Program eradykacji *poliomyelitis*

W maju 1988 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wprowadziła program światowej eradykacji dzikiego wirusa polio (Global Polio Eradication Initiative). Założoną datą osiągnięcia celu było rok 2000. Program ten jest nadal kontynuowany i obecnie mówi się o eradykacji *poliomyelitis* a nie eradykacji wirusa polio. W wyniku działań prowadzonych w ramach tego programu zredukowano zachorowalność na *poliomyelitis* z ponad 350 000 przypadków w 1988 roku do 784 znanych przypadków w 2003 roku, a w 2011 r. odnotowano 228 zachorowań. W dalszym ciągu walczy się z ogniskami zachorowań wywołanych dzikim polio w Azji i w Afryce, a więc na ostateczny sukces należy poczekać. WHO jest obecnie ostrożne w prognozowaniu ostatecznej daty eliminacji *poliomyelitis*. Od 1999 roku typ 2 dzikiego wirusa polio nie został wyizolowany

na całym świecie, co może świadczyć o eradykacji tego serotypu [58].

Niepokojącym zjawiskiem jest możliwość rewersji szczepów szczepionkowych wirusa polio do typu dzikiego, co niesie obawy ponownej transmisji tego patogenu i z tego powodu w wielu krajach nie podaje się już szczepionki zawierającej żywe, atenuowane szczepy wirusa lecz szczepionki inaktywowane. Planowane jest w przyszłości całkowite zastąpienie żywej szczepionki preparatem inaktywowanym.

## 10. Podsumowanie

W pierwszej połowie XX wieku, kiedy miały miejsce bardzo częste epidemie *poliomyelitis*, nastąpił wzrost zainteresowania wirusem polio. Efektem badań naukowych było wynalezienie skutecznej szczepionki przeciw wirusowi polio i dzięki temu eradykację *poliomyelitis* można było objąć ogólnosiwiatowym programem, który jest realizowany pod egidą WHO od lat 80-tych XX wieku. Mimo intensywnych prac wykonywanych w ramach tego programu, w dalszym ciągu odnotowuje się jeszcze w Azji i w Afryce ogniska zachorowań wywołanych dzikim wirusem i na pełen sukces wyeliminowania tego wirusa należy poczekać.

Pomimo tego, że minęło już ponad 100 lat od ustalenia, że wirus jest czynnikiem etiologicznym *poliomyelitis*, w dalszym ciągu pozostaje wiele pytań bez odpowiedzi na temat patogenezы wirusa polio. Wiedza zdobyta poprzez tysiące przeprowadzonych badań nie jest w stanie w pełni wyjaśnić mechanizmów rozwoju choroby i chociaż wirus polio jest najintensywniej badany enterowirusem nadal pozostaje on „wirusem-zagadką”.

## Piśmiennictwo

1. Agol V.I., Drozdov S.G., Ivannikova T.A., Kolesnikova M.S., Korolev M.B., Tolskaya E.A.: Restricted growth of attenuated poliovirus strains in cultured cells of a human neuroblastoma. *J. Virol.* **63**, 4034–4038 (1989)
2. Agol V.I., Picornavirus genome: an overview (w) *Molecular Biology of Picornaviruses*, red. B.L. Semler, E. Wimmer, ASM Press, Washington, 2002, 127–148
3. Andino R., Rieckhof G.E., Baltimore D.: A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell*, **63**, 369–380 (1990)
4. Basavappa R., Syed R., Flore O., Icenogle J.P., Filman D.J., Hogle J.M.: Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci.* **3**, 1651–1669 (1994)
5. Bernhardt G., Harber J., Zibert A., deCrombrughe M., Wimmer E.: The poliovirus receptor: identification of domains and amino acid residues critical for virus binding. *Virology*, **203**, 344–356 (1994)

6. Bienz K., Egger D., Troxler M., Pasamontes L.: Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J. Virol.* **64**, 1156–1163 (1990)
7. Bodian D.: Emerging concept of poliomyelitis infection. *Science*, **12**, 105–108 (1955)
8. Bodian D., Horstmann D.M., Polioviruses (w) Viral and Rickettsial Infections of Man, red. F.L. Jr. Horsfall, I. Tamm, J.B. Lippincott, Philadelphia, 1956, 430–473
9. Bodian D.: Pathogenesis of poliovirus in normal and passively immunized primates after virus feeding. *Fed. Proc.* **11**, 462–472 (1952)
10. Bodian D.: The enhancement of susceptibility of monkeys to polioviruses of high and of low virulence. *Am. J. Hyg.* **64**, 92–103 (1956)
11. Borman A.M., Le Mercier P., Girard M., Kean K.M.: Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res.* **25**, 925–932 (1997)
12. Cho M.W., Teterina N., Egger D., Bienz K., Ehrenfeld E.: Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology*, **202**, 129–145 (1994)
13. Colbere-Garapin F., Christodoulou C., Crainic R., Pelletier I.: Persistent poliovirus infection of human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7590–7594 (1989)
14. Colston E., Racaniello V.R.: Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J.* **13**, 5855–5862 (1994)
15. Couderc T., Christodoulou C., Kopecka H., Marsden S., Taffs L.F., Crainic R., Horaud F.: Molecular pathogenesis of neural lesions induced by poliovirus type 1. *J. Gen. Virol.* **70**, 2907–2918 (1989)
16. De Sena J., Mandel B.: Studies on the in vitro uncoating of poliovirus. II. Characteristics of the membrane-modified particle. *Virology*, **78**, 554–566 (1977)
17. Dorner A.J., Dorner L.F., Larsen G.R., Wimmer E., Anderson C.W.: Identification of the initiation site of poliovirus polyprotein synthesis. *J. Virol.* **42**, 1017–1028 (1982)
18. Fairbrother R.W., Hurst E.W.: The pathogenesis of experimental poliomyelitis. *J. Pathol. Bacteriol.* **33**, 17–45 (1930)
19. Fenwick M.L., Cooper P.D.: Early interactions between poliovirus and ERK cells: some observations on the nature and significance of the rejected particles. *Virology*, **18**, 212–223 (1962)
20. Flanagan J.B., Baltimore, D.: Poliovirus-specific primer-dependent RNA polymerase able to copy poly(A). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3677–3680 (1977)
21. Freistadt M.E., Kaplan G., Racaniello V.R.: Heterogeneous expression of poliovirus receptor-related proteins in human cells and tissues. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5700–5706 (1990)
22. Freistadt M.S., Fleit H.B., Wimmer E.: Poliovirus receptor on human blood cells: a possible extraneural site of poliovirus replication. *Virology*, **195**, 798–803 (1993)
23. Fricks C.E., Hogle J.M.: Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* **64**, 1934–1945 (1990)
24. Garcia-Sastre A., Durbin R.K., Zheng H., Palese P., Gertner R., Levy D.E., Durbin J.E.: The role of interferon in influenza virus tissue tropism. *J. Virol.* **72**, 8550–8558 (1998)
25. Goodfellow I., Chaudhry Y., Richardson A., Meredith J., Almond J.W., Barclay W., Evans D.J.: Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J. Virol.* **74**, 4590–4600 (2000)
26. Gromeier M., Alexander L., Wimmer E.: Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2370–2375 (1996)
27. Gromeier M., Wimmer E.: Mechanism of injury-provoked poliomyelitis. *J. Virol.* **72**, 5056–5060 (1998)
28. Harber J., Bernhardt G., Lu H.H., Sgro J.Y., Wimmer E.: Canyon rim residues, including antigenic determinants, modulate serotypespecific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology*, **214**, 559–570 (1995)
29. Hashimoto I., Hagiwara A., Komatsu T.: Ultrastructural studies on the pathogenesis of poliomyelitis in monkeys infected with poliovirus. *Acta Neuropathol.* **64**, 53–60 (1984)
30. Herold J., Andino R.: Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell.* **7**, 581–591 (2001)
31. Hogle J.M.: Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 677–702 (2002)
32. Horie H., Koike S., Kurata T., Sato-Yoshida Y., Ise I., Ota Y., Abe S., Hioki K., Kato H., Taya C.: Transgenic mice carrying the human poliovirus receptor: new animal models for study of poliovirus neurovirulence. *J. Virol.* **68**, 681–688 (1994)
33. Howe H.A., Bodian, D.: Poliomyelitis in the chimpanzee: a clinical pathological study. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **69**, 149–169 (1941)
34. Jang S.K., Davies M.V., Kaufman R.J., Wimmer E.: Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo. *J. Virol.* **63**, 1651–1660 (1989)
35. Jubelt B., Gallez-Hawkins G., Narayan O., Johnson R.T.: Pathogenesis of human poliovirus infection in mice. I. Clinical and pathological studies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **39**, 138–148 (1980)
36. Jungeblut C.W., Sanders M.: Studies of a murine strain of poliomyelitis virus in cotton rats and white mice. *J. Exp. Med.* **72**, 407–435 (1940)
37. Kauder S.E., Racaniello V.R.: Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.* **113**, 1743–1753 (2004)
38. Kitamura N., Semler B.L., Rothberg P.G., Larsen G.R., Adler C.J., Dorner A.J., Emini E.A., Hanecak R., Lee J.J., van der Werf S., Anderson C.W., Wimmer E.: Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, **291**, 547–553 (1981)
39. Koike S., Horie H., Dise I., Okitsu H., Yoshida M., Iizuka N., Takeuchi K., Takegami T., Nomoto A.: The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO J.* **9**, 3217–3224 (1990)
40. Koike S., Ise I., Nomoto A.: Functional domains of the poliovirus receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4104–4108 (1991)
41. Koike S., Taya C., Kurata T., Abe S., Ise I., Yonekawa H., Nomoto A.: Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 951–955 (1991)
42. Krausslich H.G., Nicklin M.J., Toyoda H., Etchison D., Wimmer E.: Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J. Virol.* **61**, 2711–2718 (1987)
43. Krausslich, H.-G., Wimmer E.: Viral proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 701–754 (1998)
44. Kronenberger P., Schober D., Prchla E., Blaas D., Fuchs R.: Use of free-flow electrophoresis for the analysis of cellular uptake of picornaviruses. *Electrophoresis*, **18**, 2531–2536 (1997)
45. La Monica N., Almond J.W., Racaniello V.R.: A mouse model for poliovirus neurovirulence identifies mutations that attenuate the virus of humans. *J. Virol.* **61**, 2917–2920 (1987)

46. La Monica N., Racaniello V.R.: Differences in replication of attenuated and neurovirulent poliovirus in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J. Virol.* **63**, 2357–2360 (1989)
47. Lawson M.A., Semler B.L.: Alternate poliovirus nonstructural protein processing cascades generated by primary sites of 3C proteinase cleavage. *Virology*, **19**, 309–320 (1992)
48. Liao S., Racaniello V.: Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J. Virol.* **71**, 9770–9777 (1997)
49. Lwoff A.: Factors influencing the evolution of viral disease at the cellular level and in the organism. *Bact. Rev.* **23**, 109–124 (1959)
50. Lyons T., Murray K.E., Roberts A.W., Barton D.J.: Poliovirus 5'-terminal cloverleaf RNA is required in *cis* for VPg uridylylation and the initiation of negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **75**, 10696–10708 (2001)
51. McKnight K.L., Lemon S.M.: Capsid coding sequence is required for efficient replication of human rhinovirus 14 RNA. *J. Virol.* **70**, 1941–1952 (1996)
52. McKnight K.L., Lemon S.M.: The rhinovirus type 14 genome contains an internally located RNA structure that is required for viral replication. *RNA*, **4**, 1569–1584 (1988)
53. Melnick, J.L., Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses (w) *Virology*, red. B.N. Fields, Raven Press, New York, 1996, 655–712
54. Mendelsohn C., Wimmer E., Racaniello V.R.: Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, **56**, 855–865 (1989)
55. Minor P.D., Poliomyelitis (w) *Encyclopedia of Virology*, red. B. Mahy, M. Van Regenmortel, Elsevier Ltd., Oxford, **4**, 2008, 242–249
56. Molla A., Jang S.K., Paul A.V., Reuer Q., Wimmer E.: Cardioviral internal ribosomal entry site is functional in a genetically engineered dicistronic poliovirus. *Nature*, **356**, 255–257 (1992)
57. Mueller S., Cao X., Welker R., Wimmer E.: Interaction of the poliovirus receptor CD155 with the dynein light chain Tctex-1 and its implication for poliovirus pathogenesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 7897–7904 (2002)
58. Mueller S., Wimmer E., Cello J.: Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. *Virology*, **111**, 175–193 (2005)
59. Nathanson N., Langmuir A.D.: The Cutter incidence. III. Comparison of the clinical character of vaccinated and contact cases occurring after use of high rate lots of Cutter vaccine. *Am. J. Hyg.* **78**, 61–81 (1963)
60. Neznanov N., Chumakov K.M., Neznanova L., Almasan A., Banerjee A.K., Gudkov A.V.: Proteolytic cleavage of the p65-RelA subunit of NF-kappaB during poliovirus infection. *J. Biol. Chem.* **280**, 24153–24158 (2005)
61. Nkowane B., Wassilak S., Orenstein W., Bart K., Schonberger L., Hinman A., Kew O.: Vaccine-associated paralytic poliomyelitis United States: 1973 through 1984. *JAMA*, **257**, 1335–1340 (1987)
62. Nomoto A., Omata T., Toyoda H., Kuge S., Horie H., Kataoka Y., Genba Y., Nakano Y., Imura N.: Complete nucleotide sequence of the attenuated poliovirus Sabin 1 strain genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5793–5797 (1982)
63. Ohka S., Matsuda N., Tohyama K., Oda T., Morikawa M., Kuge S., Nomoto A.: Receptor (CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome. *J. Virol.* **78**, 7186–7198 (2004)
64. Ohka S., Nomoto A.: The molecular basis of poliovirus neurovirulence. *Dev. Biol. (Basel)*, **105**, 51–58 (2001)
65. Ohka S., Ohno H., Tohyama K., Nomoto A.: Basolateral sorting of human poliovirus receptor alpha involves an interaction with the mu1B subunit of the clathrin adaptor complex in polarized epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 941–948 (2001)
66. Ohka S., Yang W.X., Terada E., Iwasaki K., Nomoto A.: Retrograde transport of intact poliovirus through the axon via the fast transport system. *Virology*, **250**, 67–75 (1998)
67. Paul A.: Possible unifying mechanism of picornavirus genome replication (w) *Molecular Biology of Picornaviruses*, red. B.L. Semler, E. Wimmer, ASN Press, Washington, 2002, 227–246
68. Paul A.V., Mugavero J., Yin J., Hobson S., Schultz S., Van Boom J.H., Wimmer E.: Studies on the attenuation phenotype of polio vaccines: poliovirus RNA polymerase derived from Sabin type 1 sequence is temperature sensitive in the uridylylation of VPg. *Virology*, **272**, 72–84 (2000)
69. Paul A.V., Rieder E., Kim D.W., van Boom J.H., Wimmer E.: Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J. Virol.* **74**, 10359–10370 (2000)
70. Racaniello V.R., Baltimore D.: Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4887–4891 (1981)
71. Racaniello V.R.: One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*, **344**, 9–16 (2006)
72. Ren R., Costantini F.C., Gorgacz E.J., Lee J.J., Racaniello V.R.: Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell*, **63**, 353–362 (1990)
73. Ren R., Racaniello V.R.: Poliovirus spreads from muscle to the central nervous system by neural pathways. *J. Infect. Dis.* **166**, 747–752 (1992)
74. Rieder E., Paul A.V., Kim D.W., van Boom J.H., Wimmer E.: Genetic and biochemical studies of poliovirus *cis*-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J. Virol.* **74**, 10371–10380 (2000)
75. Rivera V.M., Welsh J.D., Maizel J.V.: Comparative sequence analysis of the 5' noncoding region of the enteroviruses and rhinoviruses. *Virology*, **165**, 42–50 (1988)
76. Ryman K.D., Klimstra W.B., Nguyen K.B., Biron C.A., Johnston R.E.: Alpha/beta interferon protects adult mice from fatal Sindbis virus infection and is an important determinant of cell and tissue tropism. *J. Virol.* **74**, 3366–3378 (2000)
77. Sabin A., Ward R.: Nature of non-paralytic and transitory paralytic poliomyelitis in rhesus monkeys inoculated with human virus. *J. Exp. Med.* **73**, 757–770 (1941)
78. Sabin A.B.: Pathogenesis of poliomyelitis. Reappraisal in the light of new data. *Science*, **123**, 1151–1157 (1956)
79. Samuel B.U., Ponnuraj E., Rajasingh J., John T.J.: Experimental poliomyelitis in bonnet monkeys: clinical features, virology and pathology. *Dev. Biol. Stand.* **78**, 71–78 (1993)
80. Selinka H.C., Zibert A., Wimmer E.: Poliovirus can enter and infect mammalian cells by way of an intercellular adhesion molecule 1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3598–3602 (1991)
81. Semler B. L., and Ertel K. J., *Picornaviruses: molecular biology* (w) *Encyclopedia of Virology*, red. B. Mahy, M. Van Regenmortel, Elsevier Ltd., Oxford, **4**, 2008, 129–140
82. Sonenberg N.: Regulation of translation by poliovirus. *Adv. Virus Res.* **33**, 175–204 (1987)
83. Stanway G., Hughes P.J., Mountford R.C., Reeves P., Minor P.D., Schild G.C., Almond J.W.: Comparison of the complete nucleotide sequence of the neurovirulent poliovirus P3/Leon/37 and its attenuated Sabin vaccine derivative P3/Leon/12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1539–1543 (1984)

84. Strebel P.M., Ion-Nedelcu, N., Baughman A.L., Sutter R.W., Cochi, S.L.: Intramuscular injections within 30 days of immunization with oral poliovirus vaccine—a risk factor for vaccine-associated paralytic poliomyelitis (see comments). *N. Engl. J. Med.* **332**, 500–506 (1995)
85. Teterina N.L., Gorbalenya A.E., Egger D., Bienz K., Ehrenfeld E.: Poliovirus 2C protein determinants of membrane binding and rearrangements in mammalian cells. *J. Virol.* **71**, 8962–8972 (1997)
86. Toyoda H., Yang C.F., Takeda N., Nomoto A., Wimmer E.: Analysis of RNA synthesis of type 1 poliovirus by using an in vitro molecular genetic approach. *J. Virol.* **61**, 2816–2822 (1987)
87. Wenner H.A., Kamitsuka A., Lenahan M., Archetti I.: The pathogenesis of poliomyelitis, site of multiplication of poliovirus in cynomolgus monkeys after alimentary infection. *Arch. Ges. Virusforschung*, **9**, 537–558 (1959)
88. Westrop G.D., Wareham K.A., Evans D.M.A., Dunn G., Minor P.D.: Genetic basis of attenuation of Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *J. Virol.* **63**, 1338–1344 (1989)
89. Wimmer E., Hellen C.U., Cao X.: Genetics of poliovirus. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 353–436 (1993)
90. Yalamanchili P., Harris K., Wimmer E., Dasgupta A.: Inhibition of basal transcription by poliovirus: a virus- encoded protease (3Cpro) inhibits formation of TBP-TATA box complex *in vitro*. *J. Virol.* **70**, 2922–2929 (1996)
91. Yanagiya A., Ohka S., Hashida N., Okamura M., Taya C., Kamoshita, N., Iwasaki K., Sasaki Y., Yonekawa H., Nomoto A.: Tissue-specific replicating capacity of a chimeric poliovirus that carries the internal ribosome entry site of hepatitis C virus in a new mouse model transgenic for the human poliovirus receptor. *J. Virol.* **77**, 10479–10487 (2003)
92. Yang W.X., Terasaki T., Shiroki K., Ohka S., Aoki J., Tanabe S., Nomur, T., Terada E., Sugiyama Y., Nomoto A.: Efficient delivery of circulating poliovirus to the central nervous system independently of poliovirus receptor. *Virology*, **229**, 421–428 (1997)
93. Yin J., Paul A.V., Wimmer E., Rieder E.: Functional dissection of a poliovirus *cis*-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *J. Virol.* **77**, 5152–5166 (2003)

Edyta Abramczuk<sup>1\*</sup>, Katarzyna Pancer<sup>1</sup>, Bogumiła Litwińska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny,  
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w lutym 2013 r.

1. Wstęp. 2. Ogólna charakterystyka hPIV oraz zakażeń przez nie wywołanych. 3. Zakażenia hPIV u pacjentów po przeszczepach narządów. 4. Diagnostyka i leczenie. 5. Podsumowanie

#### Human parainfluenza viruses as the cause of viral infections in patients after stem cells or lung transplantation

**Abstract:** The characteristics of human parainfluenza viruses (hPIVs) are presented. These viruses are well known as the agents of respiratory tract infections (RTI) in children. The incidence of hPIV infections varies depending on the year/season. The reinfections occur throughout the life. In immunocompromised patients such reinfections might be a cause of severe disease (pneumonia, GVPD) leading also to death. Nowadays, transplantation has become a successful worldwide practice. According to WHO, more than 50.000 stem cells transplantations are carried out annually, the lung transplantation – 3500/year. In lung recipients, hPIV is the first agent of RTI; in stem cells recipients – the second (after RSV). The hPIVs infections have been observed in 1,5–10% of lung recipients and in 2,2–60% of stem cells recipients and the predominant virus was hPIV-3. The patients after transplantation receive high doses of corticosteroids which increase the risk of hPIV-pneumonia, a life threatening disease, and quick diagnosis is required. Moreover, hPIVs are also the cause of nosocomial infections. Such outbreak/cases occur simultaneously to the activity of the viruses in the environment. In immunocompromised patients the shedding of hPIVs is significantly longer than in immunocompetent persons, also the infection can be asymptomatic for the weeks. Such patients, visitors of their families, especially children, and staff members are the source of nosocomial hPIVs infections. Considering the lack of specific and effective anti-hPIVs therapy it is very important to prevent them. The most effective way of prevention is the compliance with the fundamental hygienic behaviours and the restriction of contact with ill people.

1. Introduction. 2. General characteristic of hPIVs and infection caused by them. 3. hPIV infection in patients after organ transplants. 4. Diagnosis and treatment. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** wirusowe zakażenia dróg oddechowych, wirusy paragrypy, zakażenia wirusowe po transplantacjach płuc i szpiku  
**Key words:** viral respiratory tract infections, parainfluenza viruses, viral infections after bone marrow and lung transplantation

## 1. Wstęp

Wirusy paragrypy (human parainfluenza viruses, hPIV) stanowią jeden z głównych czynników wywołujących zakażenia dróg oddechowych, szczególnie u dzieci do lat 5. O ile pierwotne zakażenia hPIV stanowią u dzieci przyczynę poważnych schorzeń, często wymagających hospitalizacji, to reinfekcje, które występują w ciągu całego życia człowieka na ogół są ograniczone do zakażeń górnych dróg oddechowych [41]. Wirusy paragrypy mogą jednak, w określonych przypadkach, również u osób dorosłych powodować nawet do 12% zakażeń dolnych dróg oddechowych o ciężkim przebiegu. Stanowią one przyczynę ognisk zachorowań w domach opieki oraz na oddziałach gdzie przebywają pacjenci w stanie immunosupresji, zarówno dzieci, jak i dorośli. Z uwagi na zwiększającą się liczbę wykonywanych przeszczepów, szczególnie szpiku i płuc, obserwowany jest wzrost wirusowych zakażeń dróg oddechowych (hPIV, RSV, grypa), będących jedną z przyczyn powikłań i odrzucenia przeszczepu, jak również śmierci biorców narządów.

## 2. Ogólna charakterystyka hPIV oraz zakażeń przez nie wywołanych

Wirusy paragrypy należą do rodziny *Paramyxoviridae*, podrodziny *Paramyxovirinae* [7, 17], liczącej pięć rodzajów: *Avulavirus*, *Henipavirus*, *Respirovirus*, *Rubulavirus* oraz *Morbillivirus*. Na podstawie cech genetycznych i antygenowych wyróżniono 5 typów wirusa paragrypy (1, 2, 3, 4a i 4b). Wirusy typu 1 i 3 zaliczane są do rodzaju *Respirovirus*, natomiast wirusy hPIV-2, hPIV-4a i hPIV-4b do *Rubulavirus* [1, 7, 17].

Wirusy paragrypy to helikalne cząsteczki o średnicy 150–400 nm [32]. Genom stanowi cząsteczka jednoniciowego RNA o ujemnej polarności (ssRNA(-)) [4, 32] zawierająca 15 500 nukleotydów i geny kodujące sześć głównych białek: 2 białka powierzchniowe: hemaglutyninę-neuraminidazę (HN) i białko fuzyjne (F) [8]; białko matriksowe (M) oraz białka, które razem z RNA tworzą rdzeń nukleokapsydu: nukleoproteiny (N/NP), fosfoproteiny (P) i RNA zależną polimerazę RNA (L) [44]. W zależności od typu wirusa paragrypy obserwowano różnice w wielkości poszczególnych białek: np.

\* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel/fax + 48 22 54 21 385; e-mail: eabramczuk@pzh.gov.pl

masa cząsteczkowa fosfoprotein hPIV typu 2 i 4 waha się w zakresie 49 000–53 000 D, natomiast typu 1 i 3 od 83 000 do 90 000 D. Wykazano także, że możliwe jest kodowanie dodatkowych białek niestrukturalnych np. białka C kodowanego przez hPIV typów 1, 2 i 3 czy białka V, które występuje u hPIV-2 [17].

Drogą szerzenia się zakażeń wirusami paragrypy jest droga kropelkowa oraz kontakt z wydzielinami i aerozolami zawierającymi cząsteczki wirusowe [4, 22]. Początkowo dochodzi do zakażenia górnych dróg oddechowych (błona śluzowa nosa i gardła), skąd wirus może rozprzestrzeniać się do dalszych odcinków układu oddechowego, między innymi do płuc.

Pierwszym etapem zakażenia hPIV jest łączenie się wirusowych glikoprotein HN z receptorami obecnymi na powierzchni komórek gospodarza. Receptorami dla wirusów paragrypy są cząsteczki zawierające kwas sialowy (gangliozydy, sialoglikoproteiny), ale stwierdzono różnice w swoistości wiązania poszczególnych hPIV do receptorów w zależności od ich struktury przestrzennej i chemicznej. Jest to jedna z przyczyn istnienia różnic w patogenności tych wirusów [48, 54]. Następnie, przy udziale białka F, osłonka wirusowa ulega fuzji z błoną plazmatyczną komórki, co prowadzi do uwolnienia nukleokapsydu do cytoplazmy. Genom staje się matrycą w procesie transkrypcji i replikacji kwasu nukleinowego. Do tworzenia cząstek potomnych dochodzi podczas łączenia powstałych w cytoplazmie nukleokapsydów z inkrustującymi błonę cytoplazmatyczną białkami HN i F. Cząstki potomne uwalniane są w procesie pączkowania z błony plazmatycznej i następnie zakażane są kolejne komórki. W przypadku wirusów paragrypy, tak jak i innych paramyksowirusów, np. wirusa odry, istnieje jeszcze inna możliwość rozprzestrzeniania się zakażenia. Jest nią zdolność łączenia się zakażonych komórek i tworzenie tzw. syncytii (komórek olbrzymich), w których potomne cząstki wirusowe mogą zakażać sąsiadujące komórki bez wywoływania lizy zakażonych komórek [7, 32].

Uważa się, że wirusy paragrypy stanowią drugi, po RSV, czynnik ostrych wirusowych zakażeń oddechowych u dzieci. W zależności od roku/pory roku stanowią ok. 10–30% zakażeń dróg oddechowych u dzieci, które wymagają leczenia szpitalnego, a w przypadku osób dorosłych do 12% chorych poddawanych jest hospitalizacji [17]. Wirusy paragrypy mogą wywołać szereg chorób układu oddechowego, o różnym przebiegu [41].

Zakażenia hPIV-1 występują często u małych dzieci, szczególnie u dzieci 2–3-letnich. Objawy zakażenia to najczęściej: krup wirusowy, świszczący oddech, ale mogą także prowadzić do rozwoju zapalenia płuc lub zapalenia oskrzelików płucnych. Szacuje się, że ponad 50% przypadków wirusowego krupu wywołanych jest przez hPIV-1. Czynnikiem etiologicznym krupu może być także hPIV-2. Uważa się, że 60% zakażeń hPIV-2 dotyczy małych dzieci <5 roku życia, najwięcej zacho-

rowań przypada na wiek od 1 do 2 lat ale rzadko są przyczyną zakażeń dolnych dróg oddechowych [12]. Zakażenia hPIV-3 są natomiast związane z jeszcze młodszymi dziećmi, <6 miesiąca życia i szacuje się, że ok. 40% tych zakażeń ma miejsce w czasie pierwszego roku życia. W przebiegu zakażeń hPIV-3 często obserwuje się zapalenie płuc i *bronchiolitis*.

Nadal niewiele wiadomo na temat epidemiologii zakażeń hPIV-4, które na ogół są ograniczone do górnych dróg oddechowych. Dane serologiczne wskazują, że pierwsze zakażenie tym wirusem ma miejsce we wczesnym okresie życia, a następnie dochodzi do częstych reinfekcji.

W tabeli I zebrano wybrane piśmiennictwo dotyczące badań nad częstością zakażeń hPIVs w różnych grupach wiekowych oraz w różnych krajach, także w Polsce (wyniki własne).

Zakażenia wirusami paragrypy występują w ciągu całego roku, ale obserwowane są różnice dotyczące częstości występowania poszczególnych typów wirusa w zależności od pory roku jak i w poszczególnych latach. Wirusy paragrypy typu 1 są na ogół wykrywane w próbkach materiału klinicznego pobranego od chorych w okresie jesienno-zimowym (wrzesień-styczeń); hPIV-2 – najczęściej wywołuje sporadyczne zachorowania w czasie całego roku, chociaż zdarzają się ogniska epidemiczne, szczególnie wczesną zimą; w przypadku hPIV-3 – szczyt krzywej epidemicznej przypada na wiosnę i lato (kwiecień-sierpień). W tzw. sezonie grypowym (jesienno-zimowym) obserwowany jest niski udział wirusa hPIV-3 w zakażeniach oddechowych [16, 49, 45]. Należy zaznaczyć, że częstość zakażeń wywołanych przez poszczególne typy hPIV może się znacznie różnić w poszczególnych latach. Zaobserwowano, że w latach wzrostu liczby zakażeń hPIV-1 następuje obniżenie liczby zachorowań wywołanych hPIV-3 i przeciwnie. Stąd w latach, w których odnotowuje się niską liczbę zakażeń hPIV-1 okres występowania hPIV-3 może się wydłużyć do jesieni [12]. Zaobserwowano także zjawisko zastępowania jednego typu wirusa przez inny, np. w Chile w latach 2001–2002 dominował hPIV-3, który w następnych 2 latach zastąpiony został przez hPIV-2. W tym czasie zachorowania wywołane przez hPIV-1 były na stałym poziomie [50]. W badaniach dzieci, prowadzonych w Chinach w latach 2007–2010 stwierdzono, że każdego roku wiosną i latem dominowały zachorowania hPIV-3, ale wystąpiła różnica w częstości zakażeń hPIV-4, stwierdzano je głównie w latach 2007–2008 [43].

### 3. Zakażenia hPIV u pacjentów po przeszczepach narządów

U osób dorosłych, ze sprawnie funkcjonującym układem immunologicznym, zakażenia hPIV ograniczone są na ogół do górnych dróg oddechowych. Natomiast



Tabela I

Częstość zakażeń wywołanych przez wirusy paragrypy wśród dzieci i dorosłych w różnych regionach świata

Kraj/lata	Grupa badana	Liczba badanych	hPIVs (+)	Piśmiennictwo
Chiny/2010–2011	≥ 14 lat	416	4 (0,96%)	[59]
Bangladesz/2009–11	dzieci	515	115 (22%)	[18]
Belgia/2009–2010	< 5 lat	139	10* (7%)	[19]
Francja/2009–2010	dzieci i dorośli	286	9 (3%)	[49]
Polska/2009–2010	< 5 lat	287	18** (6,3%)	#
Francja/2009	dzieci i dorośli	413	63 (15,3%)	[45]
Chiny/2007–2010	0,5 mies. – 16 lat	2009	246 (12,2%)	[43]
Kenia/2007–2010	<= 5 lat	6264	591 (9,4%)	[2]
Chiny/2008–2009	≥ 14 lat	197	5 (2,5%)	[5]
Wielka Brytania/2006–2009	dzieci i dorośli	hPIV-1-12830 hPIV-2-11989 hPIV-3-12831	hPIV-1 – 0,56% hPIV-2 – 0,33% hPIV-3 – 2,6%	[14]
Hiszpania/2005–2008	< 14 lat	626	29 (4,6%)	[13]
Chiny/2005–2007	≥ 14 lat	5808	252 (4,3%)	[42]
Australia/2003–2004	1 dzień – 80 lat	315	9 (2,9%)	[4]
Chile/2001–2004	dzieci	3043	64 (2,1%)	[50]
USA/2000–2001	≤ 5 lat	592	40 (7%)	[21]
USA/1998–2000	≥ 18lat	154	16 (10,4%)	[16]
USA/1991–1992	≥ 18lat	3051	44 (1,44%)	[31]
USA/1974–1993	< 5 lat	5099	256 (5,6%)	[41]

Objaśnienia: \* – wykrywanie hPIV2 oraz hPIV4 łącznie; \*\* – wykrywanie łącznie hPIV-1 oraz hPIV-3; # – badania własne (w druku)

u osób z defektem immunologicznym lub poddawanych terapii immunosupresyjnej wirusy te mogą wywołać także zakażenia dolnych dróg oddechowych. U osób po transplantacji często prowadzi to do komplikacji i niekiedy do odrzucenia przeszczepu, a czasem jest nawet powodem śmierci, zwłaszcza u osób po przeszczepach płuc [25, 60].

Pierwszy zabieg transplantacji płuc przeprowadzono w Stanach Zjednoczonych w roku 1963, ale dopiero w latach 80-tych uzyskano satysfakcjonujące wyniki po wykonaniu przeszczepu tego narządu. Na całym świecie odnotowuje się rocznie 3400 zabiegów transplantacji płuc (World Health Organization) [57]. Jest to metoda wykorzystywana w leczeniu ciężkich, nieuleczalnych innymi metodami schorzeń dolnych dróg oddechowych, takich jak: rozedma płuc, zwłóknienie płuc i mukowiscydoza [29]. Pomimo rozwoju nowych metod kontrolowania i zabezpieczania biorców organów przed zakażeniem, problem zakażeń wirusowych jest nadal aktualny. Wirusy powodujące zakażenia dróg oddechowych, w tym: hPIV, RSV, adenowirusy, wirusy grypy, hMPV, oraz rinowirusy (HRV) coraz częściej stanowią istotny czynnik w analizach zachorowalności i śmiertelności u osób po przeszczepach [20]. U osób po przeszczepach płuc, spośród wirusów zakażających układ oddechowy, najczęściej stwierdza się zakażenia hPIV. Mimo, iż śmiertelność w tej grupie pacjentów nie jest wysoka, zakażenia

te często są powodem odrzucenia organu oraz przyczyniają się do rozwoju wtórnych zakażeń [20, 47].

Czynniki takie jak: długotrwała terapia immunosupresyjna, kontakt przeszczepianego organu ze środowiskiem zewnętrznym względnie przerwanie ciągłości tkanki limfatycznej w przeszczepionym narządzie dodatkowo sprawiają, że infekcje u biorców płuc występują częściej niż u innych osób. Tkanka limfatyczna w płucach odgrywa ważną rolę w zwalczaniu zakażenia hPIV, dlatego jej uszkodzenie, które często występuje u biorców tego narządu, utrudnia eliminację wirusa z organizmu, a tym samym przyczynia się do rozwoju zakażenia [52].

Analiza częstości zakażeń hPIV u biorców płuc wykazała, że do zakażenia dochodziło średnio u 5,3/100 pacjentów [3, 51]. Badania prowadzone przez inne zespoły potwierdzają, że w zależności od pory roku, w której wykonywany jest zabieg, wieku chorych, częstość zakażeń hPIV wśród biorców płuc waha się od 1,5% do 10% (Tab. II). Szacuje się także, że wśród biorców płuc, u których wystąpiło zakażenie dolnych dróg oddechowych, czynnikiem etiologicznym zachorowania w 10% do 60% przypadków były wirusy paragrypy [3, 51].

U biorców płuc zakażenia wirusami paragrypy mogą być przyczyną zarówno zakażeń górnych dróg oddechowych o łagodnym przebiegu, jak i ciężkich chorób wymagających mechanicznej wentylacji, takich

Tabela II

## Zakażenia ludzkim wirusem paragrypy (hPIV) u osób po przeszczepie płuc

Miejsce/Rok	Objawy	Wiek chorych	Liczba chorych	Częstość zakażeń hPIV	Odstęp między przeszczepem a zakażeniem hPIV	Dominujący typ hPIV	Piśmiennictwo
USA/2002–2007	URTI, LRTI	bd	55	10%	hPIVs	<2 lata	[27]
Dallas (USA)/1999–2000	URTI	35 ± 15 r.ż.	93	6%	hPIV-1,2,3	2,8 lat	[55]
Pittsburgh/1990–2000	URTI	bd	454	5,2%	hPIV-3 hPIV-1 i 2	6 mies – 5 lat	[52]
Durham (USA)/1992–1998	LRTI	≥ 18 r.ż.	176	2,8%	hPIV	6 dni – 2 lata	[29]
Durham (USA)/1992–1997	URTI	≥ 18 r.ż.	122	1,6%	hPIV-3	13dni – 2 lata	[36]

Objaśnienia: bd – brak danych; LRTI – zakażenia dolnych dróg oddechowych; URTI – zakażenia górnych dróg oddechowych

jak zapalenie płuc czy zapalenie oskrzelików [32, 55]. Zróznicowane mogą być objawy w przebiegu zakażenia hPIV u biorców płuc. Zespół V i l c h e z i wsp. w badaniach prowadzonych w latach 1990–2000 r. jako główne objawy uznali: kaszel, skrócony oddech, wysoką temperaturę [52]. Natomiast M a t a r i i wsp. w obserwacjach z lat 1992–1998, za charakterystyczne objawy uznali zakażenia dolnych dróg oddechowych, kaszel, rzęzenie oraz duszność [29]. Zdarza się, że w wyniku zakażenia hPIV dochodzi do zmian w płucach, bez zewnętrznych objawów klinicznych [3, 56]. Czas wystąpienia infekcji wirusowej po zabiegu u biorców płuc jest różny, jednak większość przypadków ma miejsce w okresie pierwszego roku po przeszczepie, średnio 9 miesięcy po operacji (Tab. II).

Zakażenia hPIV u biorców mogą być również przyczyną nieprawidłowego funkcjonowania przeszczepionego płuca [20, 47]. Zakażenia wirusowe powodujące mechaniczne uszkodzenie przeszczepu, aktywują szereg procesów, prowadząc do jego odrzucenia. Badania sekcyjne wykazały, że w płucach osób poddanych immunosupresji obserwowano tworzone przez wirusa syncytia, nie stwierdzono takich zmian w przypadku osób ze sprawnym układem odpornościowym [46]. Wynikiem przebytego zakażenia wirusami paragrypy może być zarostowe zapalenie oskrzelików (OB) będące najczęstszą przyczyną odrzucenia przeszczepu. Takie objawy stwierdzono u 32% chorych około 6 miesięcy po wykryciu zakażenia hPIV [55].

Zakażenia hPIV są przyczyną zgonu od 1,6% do 10% biorców płuc (ogólnie zakażenia wirusowe są przyczyną zgonu 40% pacjentów po transplantacji tego narządu) [26]. U biorców płuc rokowania w przebiegu zakażenia hPIV w znacznej mierze zależą od tego czy doszło do zakażenia dolnych dróg oddechowych.

Kolejna grupa pacjentów, u której często wykrywane są zakażenia hPIV to osoby po przeszczepach szpiku kostnego. Po raz pierwszy skuteczny zabieg allogenicznego przeszczepu szpiku kostnego przeprowadzono w roku 1968 na Uniwersytecie w Minnesocie, u dziecka z zespołem ciężkiego niedoboru odpornościowego. Według danych WHO [2012] co roku na świecie prze-

prowadzanych jest ponad 50 000 zabiegów transplantacji macierzystych komórek, z czego większość to przeszczepy autologiczne [58]. Przeszczep szpiku kostnego wykonywany jest przy leczeniu niektórych zaburzeń hematologicznych, takich jak: przewlekła białaczka szpikowa, ostra białaczka limfatyczna, niedokrwistość aplastyczna czy ciężki złożony niedobór immunologiczny. U 30–60% dorosłych i 10–25% dzieci po przeszczepach szpiku kostnego występują komplikacje, które mogą doprowadzić nawet do zgonu pacjenta. Jedną z przyczyn takich komplikacji są zakażenia wirusowe. U biorców szpiku zakażenia hPIV stwierdza się u 2–19% badanych, co stawia te wirusy na drugim miejscu, po RSV, jako czynnik etiologiczny zakażeń [11, 24, 37 40,]. Ryzyko zakażenia hPIV u osób po przeszczepie autologicznym jest niższe niż u osób, których dawcą było rodzeństwo lub osoby niespokrewnione. Ponadto wykazano, że inne czynniki, takie jak wiek, dieta, obecność/brak zakażenia CMV, GVHD (reakcja biorcy wobec przeszczepu, która może prowadzić do odrzutu) nie mają wpływu na częstość występowania zakażeń hPIV u biorców szpiku [51].

Wirusy paragrypy mogą wywoływać u biorców szpiku kostnego infekcje górnych dróg oddechowych (URTI) [25, 30, 33, 40], a u ok. 25–60% zakażonych rozwija się zapalenie płuc [25, 58] (Tab. III). Wirusy paragrypy są również wykrywane w próbkach pobranych od biorców, u których nie stwierdza się charakterystycznych objawów. Najczęściej zakażenia bezobjawowe obserwowano po przeszczepie macierzystych komórek krwiotwórczych, w tym szpiku kostnego.

Długotrwała obecność hPIV w drogach oddechowych może prowadzić do przewlekłego stanu zapalnego, a w konsekwencji do nieodwracalnych zmian w układzie oddechowym [37]. Ponadto hPIV, poprzez degradację nabłonka układu oddechowego, umożliwiając penetrację innym patogenom (tj. grzyby, bakterie, inne wirusy), będącymi głównym ryzykiem śmierci osób po transplantacji szpiku kostnego w wyniku rozwoju zapalenia płuc [6, 28].

Zgodnie z danymi w piśmiennictwie, najczęściej dochodzi do zakażenia hPIV w środowisku pozaszpitalnym, ale obserwowano równolegle ogniska zakażeń

Tabela III

## Zakażenia hPIV u osób po przeszczepie szpiku kostnego

Miejsce/Rok	Objawy	Wiek chorych	Liczba badanych	Częstość zakażeń hPIV [%]	Izolowany typ hPIV	Piśmiennictwo
USA/2010	LRTI	śr. 55 lat	196	6%	hPIV-3	[11]
Włochy/2007–2008	16-URTI, 16-LRTI	śr. 3,5 lat	116	16%	hPIV-3	[38]
USA/2005	URTI i LRTI	29–72 lat	13	bd	hPIV-3	[30]
USA/2002–07	URTI, LRTI	śr. 55 lat	200	60%	hPIV-1, 2, 3	[6]
USA/2000-04	URTI	śr. 47 lat	122	14%	hPIV-1, 3	[37]
USA/2000	URTI, LRTI	24–67 lat	64	18,8%	hPIV-3	[9]
USA/1998–99	bd	bd	397	23%	hPIV-3	[34]
USA/1990–99	URTI, LRTI	bd	3577	7%	hPIV 1, 2, 3, 4	[35]
Anglia/1990–96	URTI, LRTI	śr. 32 lat	456	6,7%	hPIV-3	[10]
USA/1991–94	34-URTI, 27-LRTI	śr. 40 lat	1173	5,2%	hPIV-3	[25]
USA/1974–90	URTI, LRTI	śr. 14 lat	1253	2,2%	hPIV 1, 2, 3, 4	[56]

Objaśnienia: URTI – zakażenie górnych dróg oddechowych; LRTI – zakażenia dolnych dróg oddechowych; bd – brak danych

szpitalnych [11, 33, 38, 56, 58]. Wirusy paragrypy mogą przetrwać na skórze, ubraniach lub innych powierzchniach nawet do kilku miesięcy i ponadto czas wydalania wirusa przez chorego może być długi na co wpływa między innymi sprawność i funkcjonowanie układu odpornościowego. Różnica w wydalaniu wirusa hPIV przez chorego o obniżonej wydolności układu odpornościowego w stosunku do chorego immunokompetentnego wynosiła nawet 50 dni (odpowiednio mediana: 72 dni vs. 18 dni) [9]. Z tego powodu przy określaniu ryzyka zakażenia hPIV biorców szpiku lub płuc uwaga zwykle skupia się na chorych, ale pracownicy szpitala oraz odwiedzający również powinni być traktowani jako potencjalne źródło zakażenia [9, 32]. Ze względu na szybkie rozprzestrzenianie się wirusów w środowisku oraz ich bezobjawowe nosicielstwo określenie źródła infekcji nie zawsze jest możliwe [10, 20, 37]. Czasami źródłem zakażenia jest dawca [33], ale należy brać pod uwagę możliwość zakażenia biorcy przeszczepu hPIV na kilka dni przed operacją, a także możliwość przewlekłego zakażenia (nawet 98 dni), które może spowodować wystąpienie objawów już po transplantacji [56].

Śmiertelność w wyniku zakażenia hPIV u biorców szpiku jest wyższa niż wśród biorców płuc. Dane w piśmiennictwie wskazują na bardzo duże różnice śmiertelności między poszczególnymi badaniami (od 5% do 70%), ale większość autorów podawała, że w grupie biorców szpiku zakażonych hPIV, infekcje te były przyczyną zgonu dla ok. 30–40% pacjentów [10, 11, 24, 30, 35, 39]. Ryzyko wystąpienia komplikacji w wyniku zakażenia hPIV lub zgonu występuje na ogół u pacjentów z zapaleniem płuc ewentualnie bronchiolitis. Zaobserwowano, że zakażenie hPIV może być jedynym czynnikiem zakaźnym, który wywołał komplikacje i śmierć pacjenta lub występować jako współzakażenie. Najczęściej obserwowano współzakażenia z RSV [50, 51].

#### 4. Diagnostyka i leczenie

U osób z upośledzoną odpornością zakażenia wirusowe mogą wywoływać atypowe objawy choroby, dlatego ważne jest prowadzenie szybkiej diagnostyki różnicującej pomiędzy zakażeniami wirusowymi a bakteryjnymi lub grzybiczymi. Ponadto, ze względu na bezobjawowe zakażenia hPIV u biorców szpiku kostnego, strategię oparte na kontroli zakażeń poprzez leczenie objawowe nie zawsze znajdują zastosowanie [37]. Diagnostyka zakażeń hPIV jest istotna jeszcze z tego względu, że z uwagi na brak swoistej terapii jedynym sposobem kontroli i zapobiegania dalszym zakażeniom jest przestrzeganie podstawowych zasad higieny oraz ograniczenie kontaktu biorców przeszczepu z osobami, u których występują objawy zakażenia układu oddechowego [53].

Materiałem do badań diagnostycznych w zakażeniach hPIV są wydzieliny dróg oddechowych: płwocina, wymaz z nosogardzieli, popłuczyny nosowe, popłuczyny oskrzelowe, popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL) (najczęściej stosowane są w przypadku diagnostyki osób po przeszczepie płuc). Badania serologiczne (IFA, ELISA) mają niewielkie zastosowanie w diagnostyce tych zakażeń u osób po przeszczepach, ponieważ odpowiedź immunologiczna w tej grupie pacjentów jest zwykle zaburzona/obniżona; ponadto są to przede wszystkim dorośli, u których na ogół stwierdza się obecność przeciwciał klasy IgG swoistych dla wirusów paragrypy 1–4. Klasyczna diagnostyka hPIV opiera się na izolacji wirusa w liniach komórkowych, hemadsorpcji z wykorzystaniem krwinek czerwonych świnki morskiej oraz serotypowaniu techniką immunofluorescencji. Czas potrzebny do wykonania tych badań jest jednak zbyt długi i dlatego znacznie częściej stosowane są metody biologii molekularnej – wykrywanie i ewentualnie analiza genomu wirusa (RT-PCR, sekwencjonowanie) [47].

W leczeniu zakażeń wywołanych RNA wirusami, często stosowane są rybawiryna i kortykosteroidy. Rybawiryna posiada szerokie spektrum zastosowań, jednakże w przypadku leczenia zakażeń hPIV u biorców szpiku nie stwierdzono jej skuteczności, zarówno w obniżeniu śmiertelności jak i skróceniu czasu przewlekłego zakażenia/nosicielstwa [35]. Co więcej, w badaniach przeprowadzonych w roku 2001 [10] u części osób zakażonych hPIV zastosowanie rybawiryny spowodowało wydłużenie przebiegu zakażenia. Nie potwierdzono również, że wcześniejsze zastosowanie leczenia rybawiryną zapobiega rozszerzeniu się zakażenia z górnych dróg oddechowych do dolnych. Należy podkreślić, że jednym z czynników ryzyka rozwinięcia zapalenia płuc w przebiegu zakażenia hPIV-3 u pacjentów po przeszczepie szpiku było podawanie leków sterydowych. Znaczący, negatywny wpływ leczenia kortykosteroidami ( $P_o = 0,0009$ ) obserwowano już przy dawce  $>1$  mg/kg/dobę. Natomiast przy dawce  $\geq 2$  mg/kg/dobę współczynnik ryzyka wynosił 19,8 (95%CI 5,5–68,3) [35]. W tym samym badaniu stwierdzono także, że zakażenie hPIV dolnych dróg oddechowych pacjentów po przeszczepie szpiku miało znaczny wpływ na wzrost śmiertelności w tej grupie chorych (współczynnik ryzyka = 3,4;  $P_o < 0,0001$ ). Tak więc do tej pory nie opracowano metody skutecznego leczenia zakażeń hPIV u biorców przeszczepu płuc lub szpiku.

Obecnie trwają badania nad szczepionkami przeciwko hPIV, które przeznaczone byłyby głównie dla dzieci. Coraz częściej wykorzystywane są żywe, atenuowane, wrażliwe na temperaturę szczepki wirusów paragrypy pozbawione zdolności transmisji z człowieka na człowieka np. cp45, zawierająca atenuowany szczep PIV-3 [15]. Dotychczasowe wyniki potwierdzają wstępnie ich bezpieczeństwo i immunogenność. Istnieje jednak potrzeba dalszych badań w grupie pacjentów poddawanych immunosupresji, gdyż atenuowane wirusy zawarte w szczepionce mogą stanowić zagrożenie dla tych osób.

## 5. Podsumowanie

Wraz z postępowaniem medycyny, zwiększa się liczba i rodzaje przeszczepianych tkanek/organów i tym samym rośnie liczba osób poddawanych terapii lekami o działaniu immunosupresyjnym. Leczenie immunosupresyjne stosowane jest także w terapii wielu innych schorzeń np. stawowych, laryngologicznych. Zakażenia wirusowe wśród chorych poddanych terapii immunosupresyjnej będą stanowiły coraz poważniejszy problem dotyczący coraz większej liczby chorych. Wirusowe zakażenia oddechowe, występujące powszechnie, są jednym z czynników które mogą powodować komplikacje, odrzucanie przeszczepów a nawet zgon chorych. Zaka-

żenia wirusami oddechowymi u biorców przeszczepu obserwowane są równolegle do tych występujących w środowisku, jednakże immunosupresja powoduje zwiększenie liczby przewlekłych lub bezobjawowych zakażeń hPIV. Zakażenia hPIV u biorców płuc stanowią główną przyczynę wirusowych zakażeń oddechowych, natomiast u biorców szpiku – drugi co do częstości, po RSV, czynnik etiologiczny. Ze względu na brak możliwości ukierunkowanego leczenia, brak skutecznej szczepionki, zakażenia hPIV dolnych dróg oddechowych mogą mieć fatalne następstwa. Z tego względu konieczne jest prowadzenie szybkiej diagnostyki czynników zakaźnych, które wywoływać mogą podobne objawy (RSV, hPIV, IFV, HRV i in.). W przebiegu zakażenia RSV lub IFV można zastosować skuteczny lek, a pacjentom w otoczeniu chorego podać szczepionki lub preparaty immunoglobulin zapobiegające infekcji. W przypadku zakażeń hPIV, nie ma obecnie takich możliwości. Jedyną drogą zapobiegania jest stosowanie zasad higieny oraz ograniczenie kontaktów z osobami z objawami zakażeń dróg oddechowych.

## Piśmiennictwo

1. Aguilar H.C., Lee B.: Emerging paramyxoviruses: molecular mechanisms and antiviral strategies. *Expert Rev. Mol. Med.* **13**, e6. Doi:10.1017/S1462399410001754 (2012)
2. Ahmed J.A., Eidex R.B.: Epidemiology of respiratory viral infections in two long-term refugee camps in Kenya, 2007–2010. *BMC Infect. Dis.* **12**, 1–8 (2012) (cytowana praca jest dziełem 18 autorów)
3. Billings J.L., Hertz M.I., Wendt C.H.: Community respiratory virus infections following lung transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* **3**, 138–148 (2001)
4. Burke C.W., Mason J.N., Surman S.L., Jones B.G., Dalloneau E., Hurwitz J.L., Russell C.J.: Illumination of Parainfluenza Virus Infection and Transmission in Living Animals Reveals a Tissue-Specific Dichotomy. *PLoS Pathogens*, **7**, e1002134 (2011)
5. Cao B., Wang C.: Viral and Mycoplasma pneumoniae community-acquired pneumonia and novel clinical outcome evaluation in ambulatory adult patients in China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **29**, 1443–1448 (2010) (cytowana praca jest dziełem 13 autorów)
6. Chemaly R.F., Champlin R.: The characteristic and outcomes of parainfluenza virus infections in 200 patients with leukemia or recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, **119**, 2737–2745 (2012) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
7. Collier L., Oxford J.: Choroby wieku dziecięcego wywołane przez paramyksowirusy (w) *Wirusologia*, red. Collier L., Oxford J., Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 1993, s. 139–151
8. Coronel E.C., Takimoto T., Murti K.G., Varich N., Portner A.: Nucleocapsid Incorporation into Parainfluenza Virus Is Regulated by Specific Interaction with Matrix Protein. *Virology*, **75**, 1117–1123 (2001)
9. Cortez K.J., Erdman D.D., Peret T.C.T., Gill V.J., Childs R., Barrett A.J., Bennett J.E.: Outbreak of Human Parainfluenza Virus 3 Infections in a Hematopoietic Stem Cell transplant Population. *J. Infect. Dis.* **184**, 1093–1097 (2001)

10. Elizaga J., Olavarria E., Apperley J.F., Goldman J.M., Ward K.N.: Parainfluenza Virus 3 Infection after Stem Cell Transplant: Relevance to Outcome of Rapid Diagnosis and Ribavirin Treatment. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 413–418 (2001)
11. Emily R.M., Syndor M.D., Greer A., Bud A.P., Pehar M., Munshaw S., Neofytos D., Perl T.M., Valsamakis A.: An outbreak of human parainfluenza virus 3 infection in an outpatient hematopoietic cell transplantation clinic. *Am. J. Infect. Control.* **xxx**, 1–5 (2012)
12. Fry A.M., Curns A.T., Harbour K., Hutwagner L., Holman R.C., Anderson L.J.: Seasonal Trends of Human Parainfluenza Viral Infections: United States, 1990–2004. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 1016–1022 (2006)
13. García-García M.L., Calvo C., Falcón A., Pozo F., Pérez-Breña P., De Cea J.M., Casas I.: Role of Emerging Respiratory Viruses in Children With Severe Acute Wheezing. *Pediatr. Pulmonol.* **45**, 585–591 (2010)
14. Gaunt E.R., Harvala H., McIntyre C., Templeton K.E., Simmonds P.: Disease burden of the most commonly detected respiratory viruses in hospitalized patients calculated using the disability adjusted life year (DALY). *J. Clin. Virol.* **52**, 215–221 (2011)
15. Greenberg S.B., Atmar R.L.: Parainfluenza Viruses—New Epidemiology and Vaccine Developments. *US Infect. Dis.* **2**, 93–95 (2007)
16. Hasman H., Pachucki C.T., Unal A., Nguyen D., Devlin T., Peebles M.E., Kwilas S.A.: Aetiology of influenza-like illness in adults includes parainfluenza type 4. *J. Med. Microbiol.* **58**, 408–413 (2009)
17. Henrickson K.J.: Parainfluenza Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 242–264 (2003)
18. Homaira N., Azziz-Baumgartner E.: Incidence of Respiratory Virus-Associated Pneumonia in Urban Poor Young Children of Dhaka, Bangladesh, 2009–2011. *PLoS ONE*, **7**, e32056 (2012) (cytowana praca jest dziełem 20 autorów)
19. Hombrouck A.H., Thomas I.: Viral aetiology of influenza-like illness in Belgium during the influenza A(H1N1) 2009 pandemic. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 999–1007 (2012) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
20. Ison M.G.: Respiratory viral infections in transplant recipients. *Antivir. Ther.* **12**, 627–638 (2007)
21. Iwane M.K., Schwartz B.: Population-Based Surveillance for Hospitalizations Associated With respiratory Syncytial Virus, and Parainfluenza Viruses Among Young Children. *Pediatrics*, **113**, 1758–1764 (2004) (cytowana praca jest dziełem 14 autorów)
22. Jalal H., Bibby D.F., Bennett J., Sampson R.E., Brink N.S., MacKinnon S., Tedder R.S., Ward K.N.: Molecular Investigations of an Outbreak of Parainfluenza Virus Type 3 and Respiratory Syncytial Virus Infections in a Hematology Unit. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1690–1696 (2007)
23. Laurichesse H., Dedman D., Watson J.M., Zambon M.C.: Epidemiological features of parainfluenza virus infections: Laboratory surveillance in England and Wales, 1975–1997. *Eur. J. Epidemiol.* **15**, 475–484 (1999)
24. Lee A.V., Bibby D.F., Oakervee H., Rohatiner A., Ushiro-Lumb I., Clark D.A., Mattes F.M.: Nosocomial transmission of parainfluenza 3 virus in hematological patients characterized by molecular epidemiology. *Transpl. Infect. Dis.* **13**, 433–437 (2011)
25. Lewis V.A., Whimbey E.: Respiratory Disease Due to Parainfluenza Virus in Adult Bone Marrow Transplant Recipients. *Clin. Infect. Dis.* **23**, 1033–1037 (1996) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
26. Liu V., Dhillon G.S., Weill D.: A multi-drug regimen for respiratory syncytial virus and parainfluenza virus infections in adult lung and heart-lung transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* **12**, 38–44 (2010)
27. Liu M., Mallory G.B., Schecker M.G., Worley S., Arrigain S., Robertson J., Elidemir O., Danziger-Isako V.: Long-term impact of respiratory viral infection after pediatric lung transplantation. *Pediatric Transplantation*, **14**, 431–436 (2010)
28. Martino R., Porras R.P., Rabella N., Williams J.V., Rámila E., Margall N., Labeaga R., Crowe Jr J.E., Coll P., Sierra J.: Prospective Study of the Incidence, Clinical Features, and Outcome of Symptomatic Upper and Lower Respiratory Tract Infections by Respiratory Viruses in Adult Recipients of Hematopoietic Stem Cell Transplants for Hematologic Malignancies. *Biol. Blood Marrow. Transplant.* **11**, 781–796 (2005)
29. Matar L.D., McAdams H.P., Palmer S.M., Howell D.N., Henshaw N.G., Davis R.D., Tapson V.F.: Respiratory Viral Infections in Lung Transplant Recipients: Radiologic Findings with Clinical Correlation. *Radiology*, **213**, 735–742 (1999)
30. Maziarz R.T., Sridharan P., Slater S., Meyers G., Post M., Erdman D.D., Peret T.C.T., Taplitz R.A.: Control of an Outbreak of Human Parainfluenza Virus 3 in Hematopoietic Stem cell Transplant Recipients. *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* **16**, 193–198 (2010)
31. Marx A., Gary H.E. Jr, Marson B.J., Erdman D.D., Breiman R.F., Török T.J., Plouffe J.F., File T.M. Jr, Anderson L.J.: Parainfluenza Virus Infection Among Adults Hospitalized for Lower Respiratory Tract Infection. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 134–140 (1998)
32. Moscona A.: Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. *J. Clin. Invest.* **115**, 1688–1698 (2005)
33. Nichols W.G., Corey L., Gooley T., Davis C., Boeckh M.: Parainfluenza virus infections after hematopoietic stem cell transplantation: risk factors, response to antiviral therapy, and effect on transplant outcome. *Blood*, **98**, 573–578 (2001)
34. Nichols W.G., Erdman D.D., Han A., Zukerman C., Corey L., Boeckh M.: Prolonged Outbreak of Human Parainfluenza Virus 3 Infection in a Stem Cell Transplant Outpatient Department: Insight from Molecular Epidemiology Analysis. *Biol. Blood Marrow. Transplant.* **10**, 58–64 (2004)
35. Nichols W.G., Gooley T., Boeckh M.: Community-Acquired Respiratory Syncytial Virus and Parainfluenza Virus Infections After Hematopoietic Stem Cell Transplantation: The Fred Hutchinson Cancer Research Center Experience. *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* **7**, 11–15 (2001)
36. Palmer S.M., Henshaw N.G., Howell D.N., Miller S.E., Davis R.D., Tapson V.F.: Community Respiratory Viral Infection in Adult Lung Transplant Recipients. *Chest*, **113**, 944–950 (1998)
37. Peck A.J., Englund J.A., Kuypers J., Guthrie K.A., Corey L., Marrow R., Hackman R.C., Cent A., Boeckh M.: Respiratory virus infection among hematopoietic cell transplant recipients: evidence for asymptomatic parainfluenza virus infection. *Blood*, **110**, 1680–1688 (2007)
38. Piralla A., Percivalle E., Di Cesare-Merlone A., Locatelli F., Gerna G.: Multicenter nosocomial outbreak of parainfluenza virus type 3 infection in a pediatric oncohematology unit: a phylogenetic study. *Haematologica*, **94**, 833–839 (2009)
39. Rafik S., M.D. Truant A.L., Suh B.: Infections in Hemopoietic Stem Cell Transplant Recipients, Part I. *Clin. Microbiol. Newsletter*, **32**, 135–141 (2010)
40. Rafik S., MD, Truant A.L., Suh B.: Infections in Hemopoietic Stem Cell Transplant Recipients, Part II. *Clin. Microbiol. Newsletter*, **32**, 143–148 (2010)
41. Reed G., Jewett P.H., Thompson J., Tollefson S., Wright P.F.: Epidemiology and Clinical Impact of Parainfluenza Virus Infections in Otherwise Healthy Infants and Young Children <5 Years Old. *J. Infect. Dis.* **175**, 807–813 (1997)

42. Ren L., Wang J.: Prevalence of human respiratory viruses in adults with acute respiratory tract infections in Beijing, 2005–2007. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 1146–1153 (2009) (cytowana praca jest dziełem 21 autorów)
43. Ren L., Wang J.: Human parainfluenza virus type 4 infection in Chinese children with lower respiratory tract infections: A comparison study. *J. Clin. Virology*, **51**, 209–212 (2011) (cytowana praca jest dziełem 18 autorów)
44. Schmitt P.T., Ray G., Schmitt A.P.: The C-Terminal End of Parainfluenza Virus 5 NP Protein Is Important for Virus-Like Particle Production and M-NP Protein Interaction. *J. Virology*, **84**, 12810–12823 (2010)
45. Schnepf N., LeGoff J.: High Burden of Non-Influenza Viruses in Influenza-Like Illness in the Early Week of H1N1v Epidemic in France. *PLoS ONE*, **6**, e23514 (2011) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
46. Schomacker H., Schaap-Nutt A., Collins P.L., Schmidt A.C.: Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. *Curr. Opin. Virology*, **2**, 1–6 (2012)
47. Soldatou A., Davies E.G.: Respiratory virus infection in the immunocompromised host. *Pediatric Respiratory Rev.* **4**, 193–204 (2003)
48. Suzuki T., Portner A., Scroggs R.A., Uchikawa M., Koyama N., Matsuo K., Suzuki Y., Takimoto T.: Receptor Specificities of Human Respiroviruses. *J. Virology*, **75**, 4604–4613 (2001)
49. Thiberville S.D., Ninove L., Hai V.V., Botelho-Nevers E., Gazin C., Thirion L., Salez N., de Lamballerie X., Charrel R., Brouqui P.: The Viral Etiology of an Influenza-like Illness During the 2009 Pandemic. *J. Med. Virol.* **84**, 1071–1079 (2012)
50. Vega-Briceño L.E., Pulgar D.B., Potin M.S., Ferrer M.G., Sánchez I.D.: Características clínicas y epidemiológicas de la infección por virus parainfluenza en niños hospitalizados. *Rev. Chil. Infect.* **24**, 377–383 (2007)
51. Versluys A.B., Rossen J.W.A., van Ewijk B., Schuurman R., Bierings M.B., Boelens J.J.: Strong Association between Respiratory Viral Infection Early after Hematopoietic Stem Cell Transplantation and the Development of Life-Threatening Acute and Chronic Alloimmune Lung Syndromes. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **16**, 782–791 (2010)
52. Vilchez R.A., McCurry K., Dauber J., Iacono A., Keenan R., Zeevi A., Griffith B., Kusane S.: The Epidemiology of Parainfluenza Virus Infection in Lung Transplant Recipients. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 2004–2008 (2001)
53. Vilchez R.A., Dauber J., McCurry K., Iacono A., Kusane S.: Parainfluenza Virus Infection in Adult Lung Transplant Recipients: An Emergent Clinical Syndrome with Implications on Allograft Function. *Am. J. Transplant.* **3**, 116–120 (2003)
54. Villar E., Barroso I.M.: Role of sialic acid-containing molecules in paramyxovirus entry into the host cell: A minireview. *Glycocon. J.* **23**, 5–17 (2006)
55. Weinberg A., Zamora M.R., Li S., Torres F., Hodges T.N.: The value of polymerase chain reaction for the diagnosis of viral respiratory tract infections in lung transplant recipients. *J. Clin. Virology*, **26**, 171–175 (2002)
56. Wendt C.H., Weisdorf D.J., Jordan M.C., Balfour H.H., Hertz M.I.: Parainfluenza virus respiratory infection after bone marrow transplantation. *New England J. Medicine*, **14**, 921–926 (1992)
57. World Health Organization 16 lipca 2012 roku (online) <http://www.who.int/transplantation/gkt/statistics/en/>
58. World Health Organization 16 lipca 2012 roku (online) <http://www.who.int/transplantation/hsctx/en/>
59. Yu X., Lu R., Wang Z., Zhu N., Wang W., Julian D., Chris B., Lv J., Tan W.: Etiology and Clinical Characterization of Respiratory Virus Infections in Adult Patients Attending an Emergency Department in Beijing. *PLoS ONE*, **7**, e32174 (2012)
60. Zambon M., Bull T., Sadler C.J., Goldman J.M., Ward K.N.: Molecular Epidemiology of Two Consecutive Outbreaks of Parainfluenza 3 in a Bone Marrow Transplant Unit. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2289–2293 (1998)

Monika Jach<sup>1</sup>, Renata Łoś<sup>2</sup>, Maciej Maj<sup>2\*</sup>, Anna Malm<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biologii Molekularnej, Instytut Biotechnologii, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II  
al. Kraśnicka 102, 20-718 Lublin

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Wydział Farmaceutyczny  
z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. dr W. Chodźki 1, 20-093 Lublin

Wpłynęło w styczniu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Otrzymywanie, selekcja i właściwości szczepów probiotycznych. 3. Bezpieczeństwo probiotyków. 4. Otrzymywanie produktów probiotycznych. 5. Probiotyki przyszłości – farmabiotyki? 6. Podsumowanie

### Probiotics – technological and manufacturing aspects

**Abstract:** Probiotics are bacteria of natural human microbiota which have positive effect on the host organism physiology. Probiotic strains which are selected from wild strains have to possess certain qualities such as: being competitive against pathogens, synthesizing appropriate metabolic products and ability to adhere. Probiotic strains also have to show properties which allow them to be safe to use as well as render them resistant to conditions occurring during production processes and in human gastrointestinal tract. Inversely – the production processes used in the preparation of probiotics, have to be adjusted to maintain acceptable survival rates of bacteria.

Pharmabiotics are a particular kind of probiotics, modified using genetic engineering to achieve desirable traits, either functional or technological.

1. Introduction. 2. Preparation, selection and properties of probiotic strains. 3. Safety of probiotics. 4. Production of probiotic products. 5. Pharmabiotics – probiotics of the future? 6. Summary

**Słowa kluczowe:** probiotyki, produkcja probiotyków, farmabiotyki

**Key words:** probiotics, probiotics production, pharmabiotics

## 1. Wstęp

Terminem probiotyki określa się bakterie naturalnego mikrobiomu wywołujące wielokierunkowe, korzystne efekty dla funkcjonowania organizmu człowieka, zarówno miejscowe jak i ogólnoustrojowe. Pojęciem tym określa się również preparaty lub produkty zawierające ściśle zdefiniowane żywe drobnoustroje o właściwościach probiotycznych w odpowiedniej ilości, wpływające na mikrobiom określonego miejsca w organizmie człowieka i dzięki temu wywierające efekty zdrowotne [41, 62]. Istnieją również pewne przesłanki mogące świadczyć o rozszerzeniu definicji probiotyków w przyszłości – badania na zwierzętach wykazują działanie efektów zdrowotnych po podaniu zabitych bakterii czy też jedynie ich materiału genetycznego. Efekt wywoływany może być tu przez działanie immunostymulującego DNA (ISS-DNA) [32, 38]. Obecnie probiotyki dostępne są w postaci produktów leczniczych, suplementów diety oraz żywności funkcjonalnej.

Należy zaznaczyć, że poszczególne szczepy, nawet należące do tego samego gatunku, mogą wykazywać zróżnicowane efekty probiotyczne. Aby zastosować probiotyk należy wybrać preparat zawierający znany, zidentyfikowany szczep bakterii o dobrze udokumento-

wanym w badaniach klinicznych działaniu probiotycznym. Należy również wyraźnie zróżnicować probiotyki o działaniu powodującym ogólną poprawę stanu zdrowia oraz modulację funkcji fizjologicznych organizmu człowieka zawarte w żywności funkcjonalnej czy suplementach diety, od probiotyków zarejestrowanych jako leki, działających zapobiegawczo, a tym bardziej leczniczo, w odniesieniu do zdefiniowanej jednostki chorobowej.

## 2. Otrzymywanie, selekcja i właściwości szczepów probiotycznych

Do drobnoustrojów o działaniu probiotycznym należą przede wszystkim bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* z grupy bakterii kwasu mlekowego, których wspólną cechą jest zdolność beztlenowego rozkładu węglowodanów na drodze fermentacji mlekowej. Oprócz nich do bakterii kwasu mlekowego zaliczane są także inne mikroorganizmy z rodzaju *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* [30], *Bacillus* spp. [23], niektóre szczepy *Escherichia coli* (np. *E. coli* Nissle 1917) oraz *Propionibacterium* spp., jak również drożdżaki z rodzaju

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. dr W. Chodźki 1, 20-093 Lublin; tel. 081 742 37 72; e-mail: mikrob.farm@umlub.pl

Tabela I  
Cechy funkcjonalne szczepów probiotycznych

<ul style="list-style-type: none"> <li>• pochodzenie z mikrobiomu człowieka,</li> <li>• ściśle określona przynależność rodzajowa i gatunkowa, potwierdzona metodami biologii molekularnej,</li> <li>• brak działania patogenego, inwazyjnego oraz karcynogenego,</li> <li>• oporność na działanie soku żołądkowego i kwasów żółciowych po podaniu doustnym,</li> <li>• zachowywanie właściwości probiotycznych po procesie technologicznym oraz względnie długim okresie przechowywania,</li> <li>• zdolność do produkcji substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, w tym kwasów organicznych, nadtlenu wodoru oraz bakteriocyn,</li> <li>• właściwości powierzchniowe umożliwiające adhezję do komórek nabłonkowych,</li> <li>• antagonizm wobec typowych patogenów przewodu pokarmowego lub układu moczowo-płciowego,</li> <li>• konkurencja o receptory z komórkami drobnoustrojów patogennych takich jak <i>Escherichia coli</i> i <i>Salmonella typhimurium</i>,</li> <li>• korzystny wpływ na organizm gospodarza, potwierdzony w prawidłowo przeprowadzonych, kontrolowanych badaniach klinicznych [15, 51],</li> </ul>
--

Tabela II  
Cechy technologiczne szczepów probiotycznych [28]

<ul style="list-style-type: none"> <li>• łatwość produkcji dużej ilości biomasy,</li> <li>• oporność na procedury utrwalania takie, jak zamrażanie czy liofilizacja,</li> <li>• żywotność i stabilność cech bakterii w czasie przechowywania i dystrybucji produktów probiotycznych,</li> <li>• wysoka przeżywalność przechowalnicza w gotowym produkcie,</li> <li>• brak pogorszenia cech organoleptycznych gotowych produktów</li> <li>• oporność na bakteriofagi</li> <li>• stabilność genetyczna</li> </ul>
---

*Saccharomyces*, np. *S. boulardii* [15, 34]. Do produkcji żywności funkcjonalnej i preparatów probiotycznych najczęściej stosuje się bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Streptococcus* [19]. Przykłady drobnoustrojów o znaczeniu probiotycznym przedstawia Tabela III.

Precyzyjne zdefiniowanie szczepu drobnoustroju jest najistotniejszą charakterystyką probiotyku. Wymagania

stawiane szczepom probiotycznym są bardzo wysokie. Kryteria, jakie powinny spełniać probiotyki zgodnie z zaleceniami FAO/WHO przedstawia Tabela I i II [13, 16, 21, 29, 62]. Szczepy stosowane w preparatach probiotycznych dla ludzi powinny pochodzić z mikrobiomu człowieka. Probiotyki pochodzenia jelitowego uzyskuje się przez selekcjonowanie szczepów bakterii wyizolowanych z przewodu pokarmowego zdrowych noworodków, biorąc pod uwagę fakt, że bakterie zasiedlające ich jelita w kilka dni po urodzeniu reprezentują pionierskie, zdolne do szybkiej i skutecznej kolonizacji przewodu pokarmowego gatunki oraz dodatkowo są szybko rozpoznawane przez komórki układu immunologicznego zwane komórkami prezentującymi antygen [61]. W przypadku probiotyków dopochwowych, szczepy powinny być izolowane z układu moczowo-płciowego zdrowych, młodych kobiet.

Tabela III

Przykłady szczepów mikroorganizmów probiotycznych wykorzystywanych przemysłowo o udowodnionej skuteczności w badaniach klinicznych

<b><i>Lactobacillus</i> spp.</b>	
<i>L. acidophilus</i>	Wrzodziejące zapalenie jelita; leczenie zaburzeń motorycznych jelit [54]
<i>L. acidophilus</i> w kombinacji z <i>L. bulgaricus</i>	Zmniejszenie ryzyka wystąpienia biegunki poantybiotykowej [54]
<i>L. acidophilus</i> w kombinacji z <i>B. longum</i>	Zmniejszenie ryzyka wystąpienia biegunki poantybiotykowej [54]
<i>L. acidophilus</i> w kombinacji z <i>B. lactis</i>	Zmniejszenie częstości działań niepożądanych, związanych z leczeniem <i>Helicobacter pylori</i> [54]
<i>L. acidophilus</i> CRL639	Hamowanie wzrostu <i>H. pylori</i> in vitro [53]
Kombinacja: <i>L. acidophilus</i> + <i>B. bifidum</i> + <i>L. bulgaricus</i> + <i>Str. thermophilus</i>	Zmniejszenie ryzyka wystąpienia biegunki podróży (wstępne wyniki) [57]
Kombinacja (VSL#3): <i>L. acidophilus</i> , <i>B. breve</i> + <i>B. longum</i> + <i>B. infantis</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>L. paracasei</i> + <i>L. bulgaricus</i> + <i>Str. thermophilus</i>	<i>Pouchitis</i> (zapalenie operacyjne wytworzonego woreczka kałowego) [54, 55]; leczenie biegunki zespołu jelita drażliwego [54]
<i>L. casei rhamnosus</i> Lcr35	Leczenie zaparcia czynnościowego [57]
<i>L. casei</i> Shirota	Pomocniczo w leczeniu zaburzeń defekacji u dorosłych [54, 57]
<i>L. casei</i> DN-114 001	Zwiększenie odsetka eradykacji <i>H. pylori</i> , zmniejszenie ryzyka działań niepożądanych związanych z leczeniem [57]
Kombinacja (napój jogurtowy): - <i>L. casei</i> DN-114 001 + <i>Str. thermophilus</i> + <i>L. bulgaricus</i>	Zapobieganie bieguncie związanej ze stosowaniem antybiotyków i bieguncie związanej z zakażeniem <i>Clostridium difficile</i> u osób powyżej 50 roku życia [57]



Tabela III c.d.

<i>L. rhamnosus</i> GG	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego [55]; zmniejszenie nasilenia i rozległości atopowego zapalenia skóry [53]; zapobieganie bieguncie związanej ze stosowaniem antybiotyków [40, 54]; konkurencja o receptory lub przyleganie do komórek nabłonkowych, uniemożliwiająca dostęp patogenów do nabłonka jelitowego; wytwarzanie związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym; zwiększona sekrecja mucyn; umiarkowana skuteczność w zapobieganiu bieguncie pozaszpitalnej w populacji dziecięcej; umiarkowana skuteczność w leczeniu ostrej biegunki infekcyjnej; prawdopodobne zmniejszenie ryzyka wystąpienia nawrotów biegunki wywołanej przez <i>C. difficile</i> ; zmniejszenie częstości działań niepożądanych, związanych z leczeniem <i>H. pylori</i> [54]
Kombinacja: <i>L. rhamnosus</i> Pen + <i>L. rhamnosus</i> E/N + <i>L. rhamnosus</i> Oxy	Zapobieganie bieguncie związanej ze stosowaniem antybiotyków [57]
<i>L. rhamnosus</i> 19070-2 w kombinacji z <i>L. reuteri</i> DSM 12246	Skuteczne leczenie ostrej biegunki infekcyjnej [54]
<i>L. reuteri</i>	Biegunki rotawirusowe; skrócenie czasu trwania ostrej biegunki infekcyjnej u dzieci [57]
<i>L. bulgaricus</i>	Produkcja bakteriocyn przez niektóre szczepy; korzystne działanie jogurtu poprzez uwalnianie przez bakterie w nim zawarte laktazy, powodującej częściowy lub całkowity rozkład laktozy [54]
<i>L. plantarum</i> 299v	Konkurencja o receptory lub przyleganie do komórek nabłonkowych, uniemożliwiająca dostęp patogenów do nabłonka jelitowego; zwiększona sekrecja mucyn; prawdopodobne zmniejszenie ryzyka wystąpienia nawrotów biegunki wywołanej przez <i>C. difficile</i> [54]
<i>L. plantarum</i> DSM 9843	Leczenie zaburzeń motorycznych jelit [54]
<i>L. johnsonii</i> LA1	Hamowanie wzrostu <i>H. pylori</i> in vitro [54]
<i>L. lactis</i> DN-173 010	Leczenie zaparcia czynnościowego [57]
<b><i>Bifidobacterium</i> spp.</b>	
<i>B. animalis</i>	Skracanie pasażu jelitowego – żywienie ludzi starszych [52]
<i>B. lactis</i> Bb-12 (dawniej <i>B. bifidum</i> ) w kombinacji z <i>Streptococcus thermophilus</i>	Wysoka aktywność fosfoketolazy; zmniejszenie nasilenia i rozległości atopowego zapalenia skóry [53]; zapobieganie bieguncie związanej ze stosowaniem antybiotyków [40, 57], zapobieganie bieguncie rotawirusowej u dzieci przewlekle hospitalizowanych [54]
<b>Inne</b>	
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Wrzodziejące zapalenie jelita grubego [54, 55]; podtrzymywanie remisji w chorobie Leśniewskiego-Crona [54]; pomocniczo w leczeniu zaburzeń defekacji u dorosłych [54, 57]
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Biegunka ostra i poantybiotykowa [40]; modyfikacja receptorów dla toksyn bakteryjnych na drodze enzymatycznej, receptor dla toksyny A <i>Clostridium difficile</i> ; zmniejszenie ryzyka wystąpienia nawrotów biegunki wywołanej przez <i>C. difficile</i> ; podtrzymywanie remisji w chorobie Leśniewskiego-Crona; zmniejszenie częstości działań niepożądanych, związanych z leczeniem <i>H. pylori</i> [54]; zmniejszenie ryzyka wystąpienia biegunki podróży [57]
<i>Enterococcus faecium</i> SF68	Zmniejszenie ryzyka wystąpienia biegunki poantybiotykowej [54]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Zapobieganie bieguncie związanej ze stosowaniem antybiotyków [40]; korzystne działanie jogurtu poprzez uwalnianie przez bakterie w nim zawarte laktazy, powodującej częściowy lub całkowity rozkład laktozy [54]

Selekcja szczepów o najkorzystniejszych właściwościach probiotycznych odbywa się wielokierunkowo. Jedną z istotnych cech probiotyków są ich właściwości przeciwbakteryjne, skierowane przeciwko patogenom przewodu pokarmowego lub układu moczowo-płciowego kobiet. Probiotyki wywierają bezpośredni wpływ na wzrost bakterii chorobotwórczych. Znacznie ograniczając adhezję patogenów do receptorów na powierzchni

komórek nabłonkowych, unieczynniając toksyny bakteryjne czy konkurując o substancje odżywcze. Probiotyki wywierają również pośredni wpływ wytwarzając substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, np. bakteriocyny czy kwasy organiczne [10, 24, 25]. W warunkach *in vivo* wymienione czynniki działają jednocześnie i często synergistycznie [18]. Szczep można uznać, że posiada dobre właściwości antagonistyczne,

gdy działa hamująco *in vitro* na wzrost bakterii patogennych. W badaniu wykorzystuje się szczepy referencyjne bakterii chorobotwórczych (np. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, szczepy enteropatogenne czy uropatogenne *E. coli*). Dodatkowo wykazano wyższą efektywność działania preparatów wieloszczepowych w porównaniu do pojedynczych szczepów, włączając szczepy które są składnikami mieszaniny [6]. Równocześnie należy pamiętać, że szczepy użyte do produkcji preparatu probiotycznego wieloszczepowego nie mogą wykazywać względem siebie właściwości antagonizacyjnych. Dlatego w każdym produkcie kombinacja mikroorganizmów musi być dokładnie sprawdzona pod względem ich wzajemnego oddziaływania [43].

O właściwościach antagonizacyjnych danego szczepu bakterii probiotycznej decydować będą także mechanizmy oddziaływania między mikroorganizmami związane przede wszystkim z kwaśnymi produktami metabolizmu tych bakterii takich jak kwas mlekowy, octowy czy masłowy. Według zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), bakterie probiotyczne powinny produkować kwas mlekowy, z tym, że produkcja izomeru L(+) kwasu mlekowego powinna wynosić powyżej 50% całkowitej ilości produkowanego kwasu. W wyniku fermentacji bakterie produkują od 0,6 do 3% kwasu mlekowego [30]. Kwas L(+) mlekowy, jako identyczny z powstającym w mięśniach, jest w pełni metabolizowany przez człowieka [28]. Zaletą danego szczepu bakteriynego będzie synteza kwasu mlekowego z bardzo niskim udziałem izomeru D(-) kwasu mlekowego lub całkowitym jego brakiem. Zakwaszenie treści jelitowej sprzyja utrzymaniu równowagi mikrobiomu jelita grubego, a kwas masłowy może stanowić dodatkowe źródło energii dla kolonocytów [51], wywierając efekt troficzny na błonę śluzową jelit.

Proporcje wytwarzanych kwasów organicznych zależą oczywiście od szczepu bakterii metabolizujących określone substraty [51]. Niektóre bakterie mlekowe wytwarzają także kwas octowy, który łatwo wnika do wnętrza komórek i hamuje rozwój mikroorganizmów znacznie silniej niż kwas mlekowy. Inne kwasy organiczne, np. kwas mrówkowy, propionowy, benzoesowy czy mewalony, są produkowane przez bakterie w znacznie mniejszych ilościach. Śladowe ilości wymienionych kwasów często wzmacniają jednak działanie głównych czynników antibakteryjnych [18]. Jednocześnie bakterie kwasu mlekowego tolerują niskie pH (ok. 3–4) [6, 29]. Optymalne temperatury wzrostu bakterii probiotycznych wynoszą 20–28°C (gatunki mezofilne) i 37–45°C (gatunki termofilne) [28, 30]. Dodatkowo niskie pH treści jelitowej zwiększa rozpuszczalność soli wapniowych i magnezowych ułatwiając ich wchłanianie [51].

Bakterie probiotyczne charakteryzują się metabolizmem fermentacyjnym, a głównym produktem przemian węglowodanów, jak już wspomniano powyżej, jest kwas

mlekowy. Bakterie te wykorzystują mono- i disacharydy oraz niektóre oligo- i polisacharydy. Podczas hodowli bakterii kwasu mlekowego w mleku podstawowym substratem fermentacji jest laktoza [30], która jest rozkładana na glukozę i galaktozę. Możliwość rozkładania laktozy przez dany szczep jest bardzo ważna zwłaszcza podczas stosowania probiotyków przez pacjentów z nietolerancją laktozy. Podczas selekcji sprawdzana jest aktywność beta-galaktozydazowa danego szczepu [25].

Ważna z punktu widzenia skuteczności probiotyku jest ocena jego zdolności przylegania do komórek nabłonka jelit lub pochwy oraz żywotności w miejscu docelowym. Ważną cechą szczepu probiotycznego są jego właściwości powierzchniowe, decydujące o zdolności przylegania (adherencji). Przy selekcji szczepu należy wykonać badania sprawdzające jego hydrofobowe właściwości powierzchniowe [11, 25] oraz jakościowo produkcja śluzu przez bakterie. Bakterie probiotyczne powinny przylegać do komórek organizmu człowieka. Badanie siły przylegania przeprowadza się na ludzkich liniach komórkowych [22]. Konkurencja *in vivo* o adhezję do powierzchni nabłonka między mikrobiomem probiotycznym i komensalnym z jednej strony, a mikroorganizmami chorobotwórczymi z drugiej, decyduje o utrzymaniu odpowiednich relacji między tymi dwoma populacjami i tym samym ma zasadniczy wpływ na zdrowie człowieka. W adhezji bakterii decydującą rolę odgrywają hydrofobowość i ładunek powierzchniowy komórek bakteryjnych, ich struktury powierzchniowe takie, jak rzęski, fimbrie, białka i wielocukry powierzchniowe oraz powinowactwo tych struktur do receptorów komórek nabłonkowych [27]. Zdolność do adhezji jest cechą indywidualną poszczególnych szczepów bakterii [11]. Siła adhezji może decydować o właściwościach probiotycznych danego szczepu. Podczas przesuwania się masy pokarmowej w kierunku odbytnicy następuje oderwanie słabo przytwierdzonych bakterii oraz skrawków nabłonka wraz z zasiedlonymi tam bakteriami. W ten sposób tworzy się nowa powierzchnia do zasiedlenia przez bakterie. Proces ten jest jedną z przyczyn zmian w składzie mikrobiomu jelitowego. Wymiana gatunków na powierzchni jelit oraz fakt, że niektóre bakterie probiotyczne mogą mieć dłuższy kontakt z organizmem ludzkim poprzez silniejsze właściwości adhezyjne, może decydować o ich lepszej skuteczności prozdrowotnej [18].

Probiotyczne znaczenie mają tylko te komórki bakterii, które dotrą do miejsca oczekiwanego ich działania. W przypadku szczepów, które będą stosowane doustnie, selekcja musi obejmować wybranie bakterii opornych na działanie soku żołądkowego i żółci, aby mogły przetrwać pasaż przez przewód pokarmowy [7]. Wynik badania *in vitro* powinien potwierdzać brak lub minimalny spadek gęstości badanego szczepu po inkubacji ze sztucznym sokiem żołądkowym [7, 25]. Szczep nie powinien wyka-

zywać wrażliwości na niskie pH soku żołądkowego, trawienie przez pepsynę i sole żółci.

Ze względu na fakt, iż właściwości probiotyków są swoiste dla danego szczepu, sugeruje się, aby identyfikacja szczepu następowała za pomocą metod fenotypowych (morfologia kolonii na podłożu wzrostowym, morfologia mikroskopowa, fermentacja węglowodanów) oraz za pomocą metod genotypowych. Typowanie genetyczne powinno opierać się na najnowszych metodach biologii molekularnej takich, jak reakcja PCR ze starterami swoistymi dla danego gatunku, sekwencjonowanie 16S rRNA [16], elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), losowej amplifikacji polimorficznego DNA (RAPD) lub innych międzynarodowo uznawanych metod. Ustalenie obecności pozachromosomalnych elementów genetycznych, takich jak plazmidy, może pomóc w sklasyfikowaniu i określeniu charakterystyki szczepu. Wskazaniem jest, aby wszystkie szczepy były deponowane w ogólnie dostępnych, międzynarodowych kolekcjach drobnoustrojów [62].

W preparatach probiotycznych korzystnie jest stosować szczepy izolowane z populacji, w której mają mieć później zastosowanie. Wiadomo bowiem, że skład mikrobiomu organizmu człowieka, zwłaszcza mikrobiomu jelitowego, jest inny u mieszkańców różnych rejonów świata i zmienia się w zależności od diety i wieku [28].

Obecnie także uważa się, iż pałeczki kwasu mlekowego wchodzące w skład preparatu probiotycznego powinny pozytywnie modulować funkcje immunologiczne śluzówki jelit oraz układ odpornościowy organizmu [26, 33]. Probiotyki mogą stymulować zarówno odpowiedź humoralną jak i komórkową [24, 45]. Między innymi wykazano, że stosowanie szczepu probiotycznego powoduje wzrost liczby komórek syntetyzujących przeciwciała typu IgA na powierzchni błony śluzowej jelit [45] i co ciekawe, także dotyczy to błony śluzowej oskrzeli [36]. Różne szczepy probiotyczne są zdolne do aktywacji makrofagów i indukcję produkcji czynnika TNF- $\alpha$  oraz interleukin (IL-1, IL-6, IL-12 i IL-18), które zwiększają proces fagocytozy. Zwiększoną odpowiedź immunologiczną obserwowano także u zdrowych ochotników, którym podawano *L. rhamnosus*, gdzie zaobserwowano reakcję limfocytów T na antygeny chorobotwórczych bakterii jelitowych [42, 45].

W celu uzyskania efektu probiotycznego niezbędne jest zastosowanie minimalnej liczby jednostek tworzących kolonie (colony forming units, CFU) na dawkę [8]. Dawki stosowane w badaniach interwencyjnych (w celach leczniczych lub profilaktycznych) są bardzo zróżnicowane. Uważa się jednak, że minimalna dawka terapeutyczna wynosi od  $10^6$ – $10^9$  [12] do  $10^8$ – $10^{10}$  CFU/dziennie [16]. Kanadyjski Natural Health Products Directorate zaleca minimalną dawkę w wysokości  $5 \times 10^9$  CFU/dziennie przez 5 kolejnych dni [8]. Badania wykazały, że codzienne wzbogacenie diety w  $10^9$ – $10^{12}$  ko-

mórek bakterii probiotycznych już po kilku tygodniach stosowania może spowodować wzrost liczby naturalnych komórek bójczych w surowicy krwi, zwiększyć aktywność makrofagów i limfocytów [29, 44].

### 3. Bezpieczeństwo probiotyków

Stosowane w probiotykach drobnoustroje nie mogą być patogenne [16], czyli powinny posiadać status GRAS (generally recognized as safe). Ponadto, w aspekcie toksyczności ostrej i przewlekłej probiotyki są uważane za bezpieczne. Nawet podanie dożołądkowe myszom dawki dobowej *L. rhamnosus* w wysokości  $10^{11}$  CFU nie wpływało na funkcje wątroby i śledziony oraz nie stwierdzono zmian w krezkowych węzłach chłonnych. Ustalona dawka letalna LD<sub>50</sub> (dawka powodująca śmiertelność 50% badanych zwierząt w ciągu doby) dla *L. rhamnosus* przewyższa 50 g suchej masy bakterii na kilogram masy ciała myszy. Pomimo różnic międzygatunkowych, można założyć, że bezpieczna dawka bakterii probiotycznych dla człowieka o masie ciała 70 kg wynosi 35 g suchej masy bakterii [60]. Prowadzone badania nad ewentualną toksycznością przewlekłą bakterii kwasu mlekowego nie wykazały widocznych efektów toksycznych, w tym zaburzeń funkcji wątroby i śledziony. *L. rhamnosus* był podawany zwierzętom w wodzie pitnej w dobowej dawce  $10^2$ ,  $10^4$  i  $10^8$  CFU na jedną mysz. Dodatkowo stwierdzono, że myszy, które przyjmowały w wodzie pitnej bakterie probiotyczne szybciej przybierały na wadze [1]. Dowiedziono także, że pałeczki kwasu mlekowego oraz inne bakterie probiotyczne nie wywołują efektów karcynogennych. Co ciekawe, stwierdzono, że bakterie probiotyczne mogą hamować rozwój raka okrężnicy u szczurów wywołwanego karcynogenem (azoksymetanem) [14, 26]. Preparaty zawierające żywe szczepy *Lactobacillus* pochodzenia ludzkiego mogą być przyjmowane bez obawy ich przedawkowania i działań niepożądanych.

### 4. Otrzymywanie produktów probiotycznych

Probiotyki stosowane profilaktycznie lub leczniczo są najczęściej przygotowywane w postaci liofilizowanej biomasy zamkniętej w szklanych ampułkach lub fiolkach, saszetkach lub kapsułkach twardych (celulozowych lub żelatynowych). Proces liofilizacji (suszenie sublimacyjne) zapewnia najlepsze parametry jakościowe suchego preparatu bakteryjnego. Większość bakterii probiotycznych jest wrażliwa na ogrzewanie (termolabilna) i ginie w temperaturze 60–85°C [17], stąd suszenie sublimacyjne, które można prowadzić długo i w niższych temperaturach jest najszerzej stosowaną techniką produkcyjną dla otrzymania suchej biomasy.

Preparaty liofilizowane dzięki dużej powierzchni cząstek, odznaczają się na ogół dobrą rozpuszczalnością, często są silnie higroskopijne. Technologia produkcji liofilizowanych bakterii probiotycznych pozwala na uzyskanie preparatów odznaczających się trwałością i cechujących wysokim poziomem żywotności podczas suszenia i przechowywania.

Rzadziej stosowaną metodą otrzymywania suchej biomasy bakteryjnej jest suszenie rozpyłowe. Istnieje wiele danych odnoszących się do kwestii jakości probiotyków po zastosowaniu suszenia rozpyłowego. Podczas tego procesu dochodzi do uszkodzenia komórek i utraty żywotności kultur probiotycznych [17]. Dlatego konieczne jest ulepszenie procesu suszenia rozpyłowego, aby zapewnić lepszą przeżywalność, w tym stosowanie środków osłonowych, które wykazałyby lepszą skuteczność przeżycia i adaptację do środowiska szczepu probiotycznego [4, 7]. Proszek bakterii otrzymywany suszeniem rozpyłowym ma złą zwilżalność, utrudniającą rehydratację. Głównym problemem technologicznym jest tu wysoka temperatura powietrza wylotowego, ale istnieją doniesienia, że także wzrost temperatury powietrza wlotowego ma wpływ na spadek przeżywalności komórek [37]. Zaobserwowano liniowy spadek żywotności szczepu *Lactobacillus paracasei* wraz ze wzrostem temperatury wylotowej. Przeżywalność z ponad 90% w temperaturze 70–75°C, spadła do zaledwie kilku procent w temperaturze 100–105°C, osiągając wartość zerową w temperaturze 120°C [17]. Stąd ważną informacją mogącą ułatwić dobór temperatur suszenia może dostarczyć określenie termotolerancji szczepu. Wrażliwość termiczna jest cechą indywidualną każdego szczepu bakterii i często kilka szczepów nawet bardzo blisko spokrewnionych ze sobą może odznaczać się zróżnicowaną wrażliwością. Za zastosowaniem suszenia rozpyłowego do utrwalania biomasy przemawiają przede wszystkim znacznie niższe koszty, które są sześć razy niższe niż koszty liofilizacji. Ważnym kryterium przemawiającym za suszeniem rozpyłowym jest możliwość prowadzenia procesu na dużą skalę oraz niska waga uzyskiwanego produktu, pozwalająca na obniżenie kosztów transportu [37].

Stabilność i przeżywalność szczepów probiotycznych w formie suchej zależy od temperatury przechowywania i zawartej w nich wody, przy czym aktywność wody jest tu funkcją temperatury [15]. Stąd trwają ciągłe poszukiwania metod temu przeciwdziałających. Szczególnie korzystnym nośnikiem bakterii probiotycznych podczas suszenia jest mleko. Mleko jest naturalnym środowiskiem występowania bakterii kwasu mlekowego. Zapewnia buforowanie treści żołądka i lepsze przeżycie bakterii podczas lokacji przez przewód pokarmowy, a zawarta w mleku laktoza stanowi substrat wzrostowy dla bakterii [30, 31]. Przeżywalność podczas suszenia oraz stabilność podczas przechowywania udaje się także poprawić dodając substancji o charakterze ochronnym

takich jak kwas askorbinowy, glutaminian sodu, ekstrakt drożdżowy, maltodekstryny, skrobia, guma arabska, żelatyna lub nawet jogurt [2, 37].

Dla zapewnienia odpowiedniej żywotności bakterii w preparacie probiotycznym (kapsułki, tabletki, proszek) korzystne jest zapewnienie warunków chłodniczych, niskiego poziomu aktywnej wody oraz stosunkowo krótkiego czasu trwałości (12–24 miesięcy). Taki preparat powinien być przechowywany w suchym i chłodnym miejscu. Jednakże produkt konfekcjonowany z niską zawartością wody (<0,20) może być przechowywany w wyższej temperaturze (4–30°C) [15]. Przeżywalność liofilizowanych bakterii probiotycznych w dużej mierze zależy od ich właściwości ale także od sposobu produkcji, opakowania i przechowywania. Przy masowej produkcji probiotyku należy brać pod uwagę związane z żywotnością takie czynniki jak: metoda suszenia, rodzaj i rozmiar opakowania bezpośredniego, warunki przechowywania (np. temperatura, wilgotność), jakość nośnika (np. standardowego nośnika mleka w proszku), procedury nawodnienia czy postępowanie z nawodnionym produktem [62].

Wytwarzanie produktów probiotycznych będących lekami musi odbywać się zgodnie z dobrą praktyką wytwarzania (GMP). Taki produkt musi podlegać bezwzględny procedurom zapewnienia i kontroli jakości. Badania nad jakością produktów probiotycznych wykazują, że największym problemem technologicznym jest zachowanie wysokich stężeń bakterii probiotycznych (żywotności) podczas przechowywania i pasażowania przez żołądek. Wiele czynników działa toksycznie i zabójczo na bakterie mlekowe [7]. Ekspozycja na tlen, ciepło i wilgoć doprowadza do zniszczenia bakterii. Pojawiły się nowe techniki przygotowania probiotyków, na przykład z wykorzystaniem mikrokapsulek lub mikrogranulek chroniących przed działaniem kwasu żołądkowego i żółci, przez co wpływają na polepszenie przeżywalności w przewodzie pokarmowym [4, 7, 59]. Każda mikrogranulka jest powleczone specjalną polewą zabezpieczającą je przed działaniem kwasu i temperatury. W procesie mikrokapsulacji używa się takich substancji jak alginiany, gumy (żelatynowa i ksantanowa), K-karagenian, ftalan octanu celulozy, chitosan, skrobia, żelatyna, białka mleka [4]. Oprócz funkcji ochronnych [15] i kontrolujących reakcje oksydacyjne, mikrokapsułki pełnią także rolę maskowania smaku, koloru i zapachu, zapewnienia trwałego i kontrolowanego uwalniania, przedłużenia terminu ważności i wiele innych [4]. Granulki te mają równocześnie odpowiedni skład ułatwiający uwalnianie się bakterii w treści jelita cienkiego.

Probiotyk dopuszczony do sprzedaży musi zostać odpowiednio oznakowany [61, 62]. Etykieta powinna zawierać: skład opisujący rodzaj, gatunek i nazwę szczepu, minimalną ilość żywych bakterii pod koniec terminu ważności; odpowiednie warunki przechowywania oraz dane kontaktowe wytwórcy probiotyku. Nazew-

nictwo bakterii musi być zgodne z aktualnymi, naukowo rozpoznawalnymi nazwami. Pacjent po otrzymaniu probiotyku powinien być dokładnie poinstruowany, jak z nim postępować aby preparat zachował swoje parametry jakościowe.

Preparaty zawierające bakterie jelitowe mają kwaśny smak i zazwyczaj niezdecydowany aromat, który niekiedy może przeszkadzać w stosowaniu probiotyku doustnie. Często więc te parametry preparatów probiotycznych są polepszane poprzez dodatek aromatów, dosładzanie lub inne zabiegi zwiększające atrakcyjność smakowo-zapachową produktu.

Probiotykem określa się szeroki zakres produktów dostępnych na rynku. Preparaty zawierające bakterie probiotyczne są klasyfikowane pod kategorią żywność i w większości stanowią dodatki do żywności. Jednak różnią się one zasadniczo od leków, szczególnie jeśli chodzi o zakładane korzyści zdrowotne oraz wymagania jakościowe. Leki powinny mieć potwierdzoną jakość, bezpieczeństwo i skuteczność leczenia, łagodzenia lub zwalczania choroby, natomiast żywność, dodatki do pasz lub żywności wskazują na jakieś ogólne korzyści zdrowotne. Aby potwierdzić skuteczność określonego probiotyku należy przeprowadzić badanie kliniczne podwójnie ślepe, randomizowane, kontrolowane placebo fazy 2 i 3 na ludziach lub inne stosowne badanie z odpowiednią wielkością badanej grupy oraz pierwotnym punktem końcowym, służącymi określeniu efektywności szczepu/produktu. Wskazany jest także przeprowadzenie badania fazy 3 oceniającego efektywność przez porównanie probiotyków ze standardowym schematem leczenia określonego schorzenia [59]. Podczas badań klinicznych ważna jest identyfikacja i ocena efektów ubocznych. Leki w odróżnieniu od żywności podlegają także rygorystycznym wymaganiom rejestracyjnym potwierdzającym ich jakość, skuteczność i bezpieczeństwo monitorowane poprzez system zbierania działań niepożądanych (Pharmacovigilance).

Bezpieczeństwo stosowania probiotyków ocenia się również w aspekcie ich stabilności genetycznej. Niektóre szczepy probiotyczne, mogą w swoim materiale genetycznym posiadać plazmidy czy transpozony z genami lekooporności, stanowiąc potencjalny rezerwuar tych genów dla naturalnego mikrobiomu, co jest istotne zwłaszcza w erze narastającej oporności drobnoustrojów na antybiotyki czy chemioterapeutyki. W związku z tym, istotne jest wykluczenie obecności tych struktur genetycznych u szczepów probiotycznych.

## 5. Probiotyki przyszłości – farmabiotyki?

W projektowaniu probiotyków, mającym na celu otrzymanie szczepów o udoskonalonych cechach użytkowych, wykorzystuje się metody biologii molekularnej.

Modyfikacje genetyczne probiotyków dotyczą zmian zarówno w zakresie funkcjonalnym jak i technologicznym szczepów probiotycznych. Jednym ze wspomnianych wcześniej problemów związanych z produkcją probiotyków jest wysoka wrażliwość bakterii na warunki fizyczne związane z przeprowadzaniem procesów technologicznych. Najczęściej spotykane ograniczenia dotyczą wysokiej temperatury oraz niskiej aktywności wody –  $a_w$  [48]. Klasyczne, „niemolekularne” metody uodparniania szczepów na trudne warunki procesów technologicznych polegają na poddaniu szczepów uprzedniemu działaniu sub-letalnego czynnika stresowego. Metody te mogą jednak znacznie obniżyć aktywność komórkową oraz wydajność procesu produkcji preparatu. Wykorzystanie genetyki molekularnej pozwala na uniknięcie tych problemów.

Jednym z podstawowych mechanizmów chroniących bakterie przed stresem temperaturowym i niską  $a_w$  jest akumulacja osmoprotektantów – związków chroniących cytozol przed utratą wody oraz stabilizujących białka. Należą do nich m.in. trehaloza i betaina. Mechanizmy te są słabo rozwinięte u większości szczepów probiotycznych, jednak są one wysoce funkcjonalne u dzikich szczepów patogennych takich, jak np. *Listeria monocytogenes*. Dowiedziono, iż gen *betL*, warunkujący kodowanie systemu transportu betainy u *L. monocytogenes*, wklonowany do szczepu probiotycznego *Lactobacillus salivarius* UCC118 znacząco poprawia jego oporność na biotechnologiczne czynniki stresowe, wpływając na cechy takie jak osmo-, baro- i krio-oporność [46]. Podobne wyniki uzyskano po transformacji probiotycznego szczepu *Lactococcus lactis* genem *ostAB* warunkującym syntezę trehalozy u *E. coli* [58]. Innym przykładem jest zmodyfikowany genetycznie szczep *Lactobacillus paracasei* z nadekspresją genu warunkującego syntezę białka szoku cieplnego – Gro-ESL, należącego do białek opiekuńczych – chaperonów; białko to odpowiada za przywrócenie prawidłowej konformacji białek (refolding) w warunkach wysokiej temperatury [9].

Bakterie probiotyczne po podaniu doustnym muszą wykazywać również odpowiedni poziom oporności na fizykochemiczne mechanizmy obronne organizmu gospodarza. Do mechanizmów tych należy kwaśne środowisko żołądka oraz działanie żółci i enzymów trawiennych. Transformacja genem *betL* szczepu *Bifidobacterium breve* UCC2003 pozwoliła osiągnąć jego wysoką przeżywalność w środowisku o podwyższonej osmolarności i obecności soków żołądkowych. Badania na zwierzętach wykazały przy tym wyraźnie zwiększoną liczebność probiotyków w jelitach, i co za tym idzie – zwiększoną skuteczność kliniczną, mierzoną obniżoną liczbą infekcji systemowych po podaniu doustnym *L. monocytogenes*, w stosunku do zwierząt kontrolnych [47]. Podobne wyniki uzyskano klonując również inne

geny odpowiedzialne za przeżywalność dzikich szczepów patogennych w przewodzie pokarmowym, np. gen warunkujący oporność na żółć (*bilE*) występujący u *L. monocytogenes* [49].

Poza ulepszaniem szczepów probiotycznych w zakresie szeroko rozumianej oporności na czynniki stresowe, genetyczne modyfikacje probiotyków wykorzystywane mogą być również dla osiągnięcia lepszych efektów klinicznych. Możliwe jest wykorzystanie specyficznym modyfikowanych probiotyków w leczeniu infekcji jelitowych wywołanych przez enteropatogenne bakterie, wytwarzające toksyny [51]. W tym przypadku modyfikacje probiotyków polegają na ekspresji na powierzchni komórek bakteryjnych specyficznego receptora dla określonej toksyny. Przykładem jest zmodyfikowany szczep *E. coli* R1 z bardzo dużą liczbą analogów powierzchniowego receptora toksyny Stx produkowanej przez *Shigella dysenteriae*. Wykazano, iż jeden mg suchej masy tak zmodyfikowanego szczepu *E. coli* jest w stanie zneutralizować ponad 100 µg toksyny Stx [35]. Opisano również analogiczne probiotyki posiadające receptory toksyny wytwarzanej przez enteropatogenne szczepy *E. coli* czy toksyny *Vibrio cholerae*.

Podobne podejście zostało również zastosowane w projektowaniu nowych strategii w leczeniu zakażeń HIV. Prowadzone były próby z wykorzystaniem zmodyfikowanego szczepu *E. coli* wykazującego ekspresję hybrydy białka wirusowego gp41 i hemolizyny A; glikoproteina gp41 jest odpowiedzialna za wstępne etapy cyklu replikacyjnego HIV w komórce docelowej [39]. Białko hybrydowe syntetyzowane przez probiotyk jest wydzielane na zewnątrz komórki bakteryjnej i hamuje fuzję wirusa oraz jego wnikanie do komórek organizmu gospodarza. Zmodyfikowane probiotyki wykazywały zdolność kolonizacji nie tylko przewodu pokarmowego, ale również pochwy, co może stanowić potencjalną ochronę przed zakażeniem wirusowym. Prowadzone były również badania z wykorzystaniem szczepu *Streptococcus gordonii* transformowanego w celu ekspresji cyjanowiryny-N, białka pochodzącego z sinicy *Nostoc ellipsosporum*. Białko to wykazuje *in vitro* aktywność antyretrowirusową w wyniku specyficznego wiązania się do dwóch glikoprotein HIV – białka gp120 i białka gp41, ważnych z punktu widzenia wstępnych etapów cyklu replikacyjnego wirusa. Innym przykładem jest szczep *Lactobacillus jensenii* wydzielający rekombinowane białko CD4, hamujące wnikanie wirusa do komórek poprzez wiązanie się z glikoproteiną gp120 [5]. Ponieważ *L. jensenii* jest naturalnym kolonizatorem pochwy, wydaje się być odpowiednim kandydatem do „probiotycznego” zabezpieczenia tego ekosystemu przed infekcją wirusową. Jednak te nowe probiotyczne strategie walki z HIV wymagają dalszych badań *in vivo*.

Innym potencjalnym zastosowaniem probiotyków może stać się wykorzystanie ich jako nośnika antygenów

w celu przygotowania doustnych szczepionek. Probiotyki mogą być zmodyfikowane w celu służenia jako swoisty nośnik dla genów kodujących antygeny specyficzne dla danych patogenów. Przeprowadzono badania w celu wykorzystania do tego celu szczepu probiotycznego *Lactococcus lactis* [20]. Bakterie zostały uprzednio zmodyfikowane genetycznie w kierunku wyrażania ekspresji internaliny A, białka powierzchniowego warunkującego infekcję *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* jest patogenem wewnątrzkomórkowym, zaś internaliny są białkami powierzchniowymi odpowiedzialnymi za wnikanie komórek bakteryjnych do komórek gospodarza. Zmodyfikowany szczep *L. lactis* posiada zatem możliwość indukowania fagocytozy w komórkach nefagocytujących, a co za tym idzie – wnikania do komórek nabłonka jelita niczym pasożyt wewnątrzkomórkowy. Komórki bakterii ulegają wtedy lizie i uwalniają plazmid, który jest wektorem odpowiednich genów kodujących antygeny – czyli szczepionką DNA.

Podejście takie może łączyć zalety szczepionek DNA i podawania szczepionek drogą doustną.

Szczepionki DNA stymulują silną odpowiedź zarówno miejscową jak i ogólną. Zaś doustna droga podania imituje zakażenie, co stymuluje układ odpornościowy i jest w stanie indukować długoterminową odpowiedź ogólną. Dodatkową zaletą wynikającą z tej formy szczepienia jest możliwość rezygnacji z wkłuc wymagających warunków ambulatoryjnych i wyszkolonego medycznie personelu.

Zastosowanie modyfikowanych genetycznie probiotyków – farmabiotyków niesie ze sobą jednak pewne ograniczenia związane z bezpieczeństwem biologicznym. Niektórych z tych zagrożeń można z pewnością uniknąć przez zastosowanie podwyższonych norm bezpieczeństwa biologicznego. Jednakże szerokie zastosowanie farmabiotyków wymagałoby opracowania metody zapewniającej pasywne i aktywne bezpieczeństwo. Tego typu rozwiązanie może stanowić gen *thyA* – warunkujący ekspresję syntazy tymidylanowej [49]. Wyłączenie tego genu powoduje, iż szczep stanie się całkowicie zależny od obecności tyminy, zaś jej brak jest bezwzględnie letalny dla bakterii. W efekcie bakterie nie będą w stanie akumulować się w środowisku. Wydaje się, iż ta metoda może stanowić pewny sposób na zapewnienie odpowiedniego poziomu bezpieczeństwa biologicznego.

## 6. Podsumowanie

Znaczenie ludzkiego mikrobiomu na ogólną kondycję organizmu ludzkiego w obecnych czasach staje się coraz bardziej zrozumiałe. Aktualnie uznaje się wręcz, iż organizm ludzki wraz z jego symbiotycznym mikrobiomem (zwłaszcza jelitowym) stanowią superorganizm

[3]. Probiotyki wykorzystywane do wspierania roli mikroorganizmów jelitowych, mają w tej chwili znaczenie nie tylko wspierające oporność przed zakażeniami, ale również mogą być modyfikowane genetycznie w celu otrzymywania szczepów o ukierunkowanym działaniu terapeutycznym. W tym kontekście jeszcze bardziej istotne staje się zadbanie o bezpieczeństwo i skuteczność szczepów probiotycznych. W związku z tym szczepy probiotyczne selekcjonowane ze szczepów dzikich oraz szczepy modyfikowane cechować muszą się odpowiednimi właściwościami, zarówno funkcjonalnymi jak i technologicznymi. Znaczące jest tu precyzyjne wyróżnienie owych cech i konsekwentne wykorzystanie metod badania owych pożądaných właściwości szczepów. Świadomość odpowiednich własności wymaganych od szczepów probiotycznych oraz technologie pozwalające na ich usprawnianie, zagwarantować mogą odpowiednią skuteczność i stabilność farmaceutyczną preparatów probiotycznych. Badania prowadzone w tych kierunkach wraz w połączeniu z rozwijającymi się leczniczymi preparatami probiotycznymi mogą stanowić o tym, iż probiotyki będą odgrywać znaczącą rolę w przyszłości mikrobiologii farmaceutycznej i lecznictwa.

## Piśmiennictwo

- Bernardeau M., Vernoux J.P., Gueguen M.: Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. *Int. J. Food Microbiol.* **77**, 19–27 (2002)
- Bielecka M., Majkowska A.: Effect of spray drying temperature of yoghurt on the survival of starter cultures, moisture content and sensoric properties of yoghurt powder. *Nahrung/food.* **44**, 257–262 (2000)
- Binek M.: Mikrobiom człowieka – zdrowie i choroba. *Post. Mikrobiol.* **51**, 27–36 (2012)
- Burgain J., Gaiani C., Linder M., Scher J.: Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J. Food. Engineering.* **104**, 467–483 (2011)
- Chang TL-Y., Chang C-H., Simpson D.A., Xu Q., Martin P.K., Lagenaur L.A.: Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11672–11677 (2003)
- Chapman C.M.C., Gibson G.R., Rowland I.: Health benefits of probiotics: are mixture more effective than single strains? *Eur. J. Nutr.* **50**, 1–17 (2011)
- Chen S., Zhao Q., Ferguson L.R., Shu Q., Weir I., Garg S.: Development of a novel probiotic delivery system based on microencapsulation with protectans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 1447–1457 (2012)
- Coeuret V., Gueguen M., Vermoux J.P.: Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* **97**, 147–156 (2004)
- Corcoran B.M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Dockery P., Stanton C.: Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under stressful conditions induced by drying. *Appl. Environ. Microb.* **72**, 5104–5107 (2006)
- Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S.: In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Res. Int.* **40**, 629–639 (2007)
- Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S.: Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol.* **226**, 1065–1073 (2008)
- Czerwonka-Szaflarska M., Romańczuk B.: Probiotics for the prevention and treatment of selected gastrointestinal disorders in children. *F. Med. Rodz.* **4**, 135–140 (2010)
- Dunne C., O'Mahony L., Murphy E.: In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**(suppl), 386–92S (2001)
- Femia A.P., Lucern C., Dolara P., Giannini A., Biggeri A., Salvadori M., Clune Y., Collins K.J., Paglierani M., Caderni G.: Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*, **23**, 1953–1960 (2002)
- Förstner S.D., Sindelar C.W., Ouwehand A.C.: Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*, **17**, 410–413 (2011)
- Fric P.: Probiotics and prebiotics – renaissance of a therapeutic principle. *CEJ Med.* **2**, 237–270 (2007)
- Gardiner G., O'Sullivan E., Kelly J., Auty M.A.E., Fitzgerald G.F., Collins J.K., Ross R.P., Stanton C.: Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus rhamnosus* and *L. salvarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2605–2616 (2000)
- Grajek W., Sip A.: Antagonistic activity of probiotics against pathogenic microorganisms. *Zakażenia, zesz.* **1**, 49–54 (2006)
- Granato D., Branko G.F., Cruz A.G., de Assis Fonseca Faria J., Shah P.N.: Probiotic dairy products as functional foods. *Comp. Rev. Food Science Food Safety*, **9**, 455–470 (2010)
- Guimarães V.D., Gabriel J.E., Lefèvre F., Cabanes D., Gruss A., Cossart P.: Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes Infect.* **7**, 836–44 (2005)
- Gupta V., Garg R.: Probiotics. *Ind. J. Med. Microbiol.* **27**, 202–209 (2009)
- Haeri A., Khodaii Z., Ghaderian S.M.H., Panah A.S.T., Najar R.A.: Comparison of adherence patterns of a selection of probiotic bacteria to Caco-2, HEp-2, and T84 cell lines. *Ann. Microbiol.* **62**, 339–344 (2012)
- Hairul Islam V.I., Praksh Babu N., Pnadikumar P., Ignacimuthu S.: Isolation and characterization of putative probiotic bacteria strain, *Bacillus amyloliquefaciens*, from North East Himalayan Soil Based on in vitro and in vivo functional properties. *Probiotics & Antimicrob. Prot.* **3**, 175–185 (2011)
- Heczko P.B., Strus M., Jawień M., Szymański H.: Medical applications of probiotics. *Wiad. Lek.* **58**, 640–646 (2005)
- Karasu N., Simsek O., Con A.H.: Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Ann. Microbiol.* **60**, 227–234 (2010)
- Kaur I.P., Chopra K., Saini A.: Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* **15**, 1–9 (2002)
- Knight S.D., Berglund J., Choudhury D.: Bacterial adhesions: structural studies reveal chaperone function and pilus biogenesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 653–660 (2000)
- Libudzisz Z.: Probiotics and prebiotics in fermented milks. *Ped. Wsp.* **4**, 19–25 (2002)
- Libudzisz Z.: Human intestinal microflora and probiotics. *Zakażenia, zesz.* **6**, 47–51 (2004)
- Libudzisz Z., Klewicka E.: Lactic Acid Bacteria in Probiotics Products. *Zakażenia, zesz.* **4**, 57–62 (2006)
- Livney Y.D.: Milk proteins as vehicles for bioactives. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**, 73–83 (2010)

32. Maeada N., Nakamura Y., Hirose Y.: Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 1122–1125 (2009)
33. Oelschlaeger T.A.: Mechanisms of probiotic action – A review. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 57–62 (2010)
34. Pagliaro G., Battimo M.: The use of probiotics in gastrointestinal diseases. *J. Nutr. Metab.* **3**, 105–113 (2010)
35. Paton A.W., Morona R., Paton J.C.: Receptor-mimic probiotics: potential therapeutics for bacterial toxin-mediated enteric diseases. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 253–255 (2010)
36. Perdigon G., Alvarez S., Medina M., Vintini E., Roux E.: Influence of the oral administration of lactic acid bacteria on iga producing cells associated to bronchus. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **12**, 97–102 (1999)
37. Powalowski S., Cyplik P.: Methods for improving of lactic acid bacteria survival during spray drying. *Biotechnol.* **3**, 129–139 (2004)
38. Rachmilewitz D., Karmeli F., Takabayashi K.: Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology*, **122**, 1428–1441 (2002)
39. Rao S., Hu S., McHugh L., Lueders K., Henry K., Zhao Q.: Toward a live microbial microbicide for HIV: commensal bacteria secreting an HIV fusion inhibitor peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11993–11998 (2005)
40. Ruszczyński M., Szajewska H.: Probiotyki w zapobieganiu biegunce związanej ze stosowaniem antybiotyków – aktualizacja metaanalizy badań z randomizacją. *Pediatr. Współcz. (Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziec.)*, **10**, 96–104 (2008)
41. Schrezenmeier J., de Vrese M.: Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* **111**, 1–66 (2008)
42. Schulz M., Gottl C., Youn R.J., Iwen P., Vanderhoof J.A.: Administration of oral probiotic bacteria to pregnant women causes temporary infantile colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **38**, 293–297 (2004)
43. Shah N.P.: Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food-technol. Chicago: Institute of Food Technologists* **55**, 46–56 (2001)
44. Shanahan F.: Probiotics in perspective. *Gastroenterology*, **139**, 1808–1812 (2010)
45. Shandilya U.Kr., Jadhav S., Panwar V., Kansal V.K. Probiotics: Potent Immunomodulatory Tool Against Allergy. *Probiotics & Antimicro. Prot.* **3**, 151–158 (2011)
46. Sheehan V.M., Sleator R.D., Fitzgerald G.F., Hill C.: Heterologous expression of *BetL*, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2170 (2006)
47. Sheehan V.M., Sleator R.D., Hill C., Fitzgerald G.F.: Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbiology (Reading, England)*, **153**(Pt 10), 3563–3571 (2007)
48. Sleator R.D., Hill C.: New frontiers in probiotic research. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**, 143–147 (2008)
49. Sleator R.D., Hill C.: Rational design of improved pharmabiotics. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, 275–287 (2009)
50. Sleator R.D.: Probiotic therapy – recruiting old friends to fight new foes. *Gut Pathogens*, **2**, 5 (2010)
51. Stolarczyk A., Socha P., Socha J.: Probiotics and prebiotics in prophylactic and therapeutic use in children. *Terapia*, **1**, 116 (2002)
52. Steinka I.: Wybrane aspekty stosowania antybiotyków: *Ann. Acad. Med. Gedan.* **41**, 97–108 (2011)
53. Szajewska H., Mrukowicz J.Z.: Skuteczność probiotyków w leczeniu i zapobieganiu alergii pokarmowej – systematyczny przegląd piśmiennictwa. *Pediatr. Współcz. (Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziec.)*, **4**, 79–83 (2002)
54. Szajewska H.: Rola probiotyków w zapobieganiu i leczeniu chorób przewodu pokarmowego. *Pediatr. Współcz. (Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziec.)*, **7**, 53–60 (2005)
55. Szajewska H., Horvath A., Dziechciarz P.: Probiotyki, prebiotyki i synbiotyki w leczeniu nieswoistych zapaleń jelit – przegląd systematyczny. *Pediatr. Współcz. (Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziec.)*, **9**, 266–275 (2007)
56. Szajewska H.: Advances and Limitations of Evidence-Based Medicine – Impact for Probiotics. *Ann. Nutr. Metab.* **57**(suppl 1), 6–9 (2010)
57. Szajewska H.: Probiotyki w Polsce – kiedy, jakie i dlaczego? *Gastr. Klin.* **2**, 1–9 (2010)
58. Termont S., Vandenbroucke K., Iserentant D., Neiryck S., Steidler L., Remaut E.: Intracellular accumulation of trehalose protects *Lactococcus lactis* from freeze-drying damage and bile toxicity and increases gastric acid resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7694–700 (2006)
59. Young R.J., Huffman S.: Probiotics use in children. *J. Pediatr. Health Care.* **17**, 277–283 (2003)
60. Zou J.S., Shu Q., Rutherford K.J., Prasad J., Gopal P.K., Gill H.S.: Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.* **38**, 153–161 (2000)
61. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Export Consultation, Cordoba, Argentina, 1–4 października 2001.
62. Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group, London, Ontario, Canada, 30 kwietnia – 1 maja 2002.



Ksenia Szymanek-Majchrzak<sup>1\*</sup>, Andrzej Młynarczyk<sup>1</sup>, Grażyna Młynarczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Wpłynęło w marcu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Wankomycyna i inne glikopeptydy. 2.1. Charakterystyka antybiotyków. 2.2. Kryteria wrażliwości na glikopeptydy. 3. Nabyta oporność na wankomycynę. 3.1. Enterokoki VRE. 3.2. Transfer operonu *vanA* ze szczepów *Enterococcus* spp. do izolatów metycylino-opornych *Staphylococcus aureus* – możliwości i obawy. 3.3. Wankomycyno-oporne szczepy *Staphylococcus aureus* (VRSA). 3.3.1. Mechanizm oporności u VRSA warunkowany obecnością operonu *vanA*. 3.3.1.1. Heterologiczna ekspresja operonu *vanA* u wankomycyno-opornych *S. aureus*. 3.3.1.2. Wankomycyno-oporne *S. aureus* – analiza przypadków. 3.3.1.3. Epidemiologia szczepów VRSA *vanA*. 3.3.2. Szczepy VRSA – *vanA*-negatywne (dawne *Staphylococcus aureus* o obniżonej wrażliwości na wankomycynę, VISA) – pochodzenie oraz mechanizm oporności. 4. Szczepy *Staphylococcus aureus* wykazujące fenotyp hetero-VISA. 5. Opcje terapeutyczne leczenia ciężkich zakażeń o etiologii *S. aureus*, wobec których terapia wankomycyną pozostaje nieskuteczna. 6. Podsumowanie

### Resistance of *Staphylococcus aureus* strains to glycopeptides

**Abstract:** Until recently, vancomycin was perceived as an effective drug for the treatment of serious infections with MRSA etiology. For over 30 years, since the introduction of the antibiotics on the pharmaceutical market, there was no case of *Staphylococcus aureus* resistant to the glycopeptide and it seemed that strains of *S. aureus* are naturally sensitive to vancomycin. Problems began to appear at the beginning of the 90s of the twentieth century, when more and more treatment failures with the use of the glycopeptide antibiotics were being reported. Strains of *S. aureus* which may manifest decreased susceptibility or resistance to vancomycin and/or teicoplanin were recognized as the main cause of these failures. VRSA (vancomycin resistant *S. aureus*), with the genotype *vanA* conditioned by the presence of *vanA* operon transmitted from *Enterococcus* are extremely rare. More frequent are VISA (vancomycin intermediate *S. aureus*) or VRSA *vanA*-negative strains exhibiting thickened cell walls, increased content of free dipeptide D-Ala-D-Ala in peptidoglycans and disorders in autolytic processes, and hetero-VISA strains sensitive to vancomycin (MIC<sub>VA</sub> ≤ 2 mg/L), but containing subpopulations of cells exhibiting MIC values at different levels. These effects are caused by different molecular mechanisms, which are related to different regulatory systems and manifested by diverse phenotypic features, but the result is always the lack of treatment efficacy. A review of the mechanisms leading to the formation and spread of *S. aureus* isolates for which the vancomycin treatment can be ineffective has become an essential objective of this monograph.

1. Introduction. 2. Vancomycin and other glycopeptides. 2.1. Characteristics of the antibiotics. 2.2. Criteria of sensitivity to glycopeptides. 3. Transferred resistance to vancomycin. 3.1. *Enterococci* VRE strains. 3.2. The *vanA* operon transfer from *Enterococcus* spp. to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains – possibilities and apprehensions. 3.3. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (VRSA). 3.3.1. Mechanism of resistance of VRSA strains – determination the presence of *vanA* genes. 3.3.1.1. Heterologic expression of *vanA* operon in vancomycin-resistant *S. aureus*. 3.3.1.2. Vancomycin-resistance of *S. aureus* – case studies. 3.3.1.3. Epidemiology of VRSA *vanA* strains. 3.3.2. VRSA strains – *vanA*-negative (previous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*, VISA) – provenance and mechanism of resistance. 4. The hetero-VISA phenotype expression in *Staphylococcus aureus* strains. 5. Therapeutic options for the treatment of serious infections with *S. aureus* etiology for which vancomycin therapy remains ineffective. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** hetero-VISA, *Staphylococcus aureus*, VISA, VRSA, wankomycyna

**Key words:** hetero-VISA, *Staphylococcus aureus*, vancomycin, VISA, VRSA

## 1. Wstęp

*Staphylococcus aureus* jest jednym z najbardziej niebezpiecznych ludzkich patogenów. Wykazuje złożone mechanizmy patogenezы oraz posiada bogaty arsenał czynników zjadliwości. Powszechność stosowania antybiotykoterapii w leczeniu zakażeń oraz szerokie zastosowanie antybiotyków w innych dziedzinach, zwłaszcza takich jak rolnictwo, doprowadziły do wyselekcjonowania szczepów bakterii wysoce-opornych na chemioterapeutyki, wśród których gronkowce stanowią ważną grupę [64]. Szczególnie niebezpieczne okazały

się metycylino-oporne szczepy *S. aureus* (MRSA), które opisano w 1961 r. [43], oporne na wszystkie antybiotyki beta-laktamowe, oprócz najnowszych cefalosporyn specjalnie skierowanych przeciwko MRSA. Wśród tych cefalosporyn obecnie duże nadzieje wiąże się z fosami-lem ceftaroliny, dopuszczonym przez Komisję Europejską do obrotu w sierpniu 2012 (Zinfor, Astra Zeneca, do wlewu dożylnego). Jednakże lekiem z wyboru w leczeniu ciężkich zakażeń MRSA jest wciąż wankomycyna. Ponieważ przez ponad 30 lat (od wprowadzenia w 1958 r.) nie odnotowano przypadku izolacji szczepu gronkowca złocistego opornego, uważano wręcz, że

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel.: (22) 628 27 39; e-mail: xenia.szymanek@wum.edu.pl

*Staphylococcus aureus* wykazują gatunkową wrażliwość na ten glikopeptyd. Jednakże już od początku lat '90 XX wieku coraz częściej opisuje się przypadki braku skuteczności wankomycyny mimo, że izolowane szczepy, według obowiązujących wówczas kryteriów, można było zaliczyć do wrażliwych. Jednym z przypuszczalnych mechanizmów braku skuteczności leku, mimo wrażliwości *in vitro*, mogło być zjawisko tolerancji, które w przypadku wankomycyny ma miejsce wówczas, kiedy wartość MBC (minimal bactericidal concentration) jest przynajmniej 32-krotnie wyższa niż MIC (minimal inhibitory concentration) [66]. W 1996 roku, w Japonii zidentyfikowano pierwszy izolat kliniczny *S. aureus*, wykazujący obniżoną wrażliwość na wankomycynę. Nazwany został wówczas VISA, od „vancomycin intermediate *S. aureus*” lub GISA od „glycopeptide intermediate *S. aureus*”, ponieważ wykazywał także obniżoną wrażliwość na teikoplaninę. Wykryto również pierwszy szczep *S. aureus* wrażliwy na wankomycynę, ale wytwarzający subpopulacje komórek, dla których wartości MIC glikopeptydu były na zróżnicowanym poziomie (hetero-VISA, hetero-GISA) [36, 37]. U żadnego z tych szczepów nie wykryto genów, które mogłyby warunkować oporność na glikopeptydy [36, 37]. W 2002 roku w Michigan, w Stanach Zjednoczonych, wyizolowano pierwszy szczep gronkowca złocistego wykazujący wysoki poziom oporności na glikopeptydy (VRSA, vancomycin resistant *S. aureus* lub GRSA, glycopeptide resistant *S. aureus*) [14, 96]. Szczep ten, jak udowodniono uzyskał geny oporności od bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Podłoże molekularne oraz mechanizmy warunkujące obniżoną wrażliwość szczepów opisanych po raz pierwszy w Japonii oraz szczepów opisanych w Stanach Zjednoczonych diametralnie się różnią. Celem niniejszej monografii jest przybliżenie mechanizmów prowadzących do powstawania i rozprzestrzeniania się izolatów *S. aureus*, wobec których leczenie wankomycyną może z większym lub mniejszym prawdopodobieństwem okazać się nieskuteczne.

## 2. Wankomycyna i inne glikopeptydy

### 2.1. Charakterystyka antybiotyków

Wankomycyna została wyizolowana w połowie lat 50-tych XX w. z pochodzących z Borneo promieniowców *Streptomyces orientalis* (obecnie *Amycolatopsis orientalis*) [54, 68], przez E.C. Kornfelda, pracownika koncernu Eli Lilly. Do lecznictwa wankomycyna została wprowadzona w 1958 r. [68].

Wankomycyna, jest dużą cząsteczką, o masie cząsteczkowej 1485,7 Da. Jest cyklicznym heptapeptydem, zawierającym trzy cykliczne systemy, z których każdy może istnieć w postaci jednego z dwóch możliwych atropoizomerów. W naturze, spośród ośmiu możliwych

atropoizomerów, występuje tylko jeden. Cząsteczka podstawnika aglikonu stwarza dziewięć dodatkowych centrów stereochemicznych [7, 9]. Mechanizm działania wankomycyny polega na blokowaniu biosyntezy ściany komórkowej bakterii. Ze względu na brak możliwości dostępu do miejsca docelowego u bakterii Gram-ujemnych, antybiotyk jest aktywny jedynie w stosunku do większości bakterii Gram-dodatnich [7].

Ściana komórkowa jest jedną z najważniejszych struktur komórki bakteryjnej. U drobnoustrojów Gram-dodatnich składa się głównie z heteropolimeru – peptydoglikanu, zwanego mureiną [56, 79]. Synteza peptydoglikanu zachodzi w trzech etapach i w trzech różnych miejscach w komórce bakteryjnej. Pierwszy przebiega w cytoplazmie i polega na syntezie prekursorów: urydyno-di-fosforanu-N-acetylmuramyl-pentapeptydu (UDP-MurNAc-pentapeptyd) oraz UDP-N-acetyloglukozaminy (UDP-GlcNAc). Drugi etap ma miejsce w błonie komórkowej i prowadzi do połączenia MurNAc-pentapeptydu z pirofosforylo-undekaprenolem (lipid I) oraz przyłączeniu do tego kompleksu GlcNAc (lipid II). Ostatni, trzeci etap procesu biosyntezy peptydoglikanu zachodzi po zewnętrznej stronie błony komórkowej, przy współdziałaniu enzymów z rodziny białek wiążących penicylinę PBP (penicillin binding protein). W tym etapie syntezy peptydoglikanu u *S. aureus* szczególnie ważną rolę odgrywa enzym PBP2, który przeprowadza reakcję zarówno transglikozylacji, jak i wraz z około 40 innymi enzymami uczestniczy w transpeptydacji L-Lys-(Gly)<sub>5</sub>-D-Ala, prowadząc do powstania usieciowanej, trójwymiarowej struktury heteropolimeru ściany komórkowej [56, 79].

Cząsteczka wankomycyny, aby spełnić swoją bakteriobójczą funkcję, musi przeniknąć przez wszystkie warstwy peptydoglikanu i dotrzeć do miejsca, gdzie zachodzi drugi i trzeci etap syntezy muropeptydu, czyli do zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. W tym miejscu przyłącza się do dipeptydu D-Ala-D-Ala, znajdującego się na końcu pentapeptydu, w uwalnianej z lipidu II reszty heterodimeru -(GlcNAc-β-(1,4)-MurNAc-pentapeptydu)-. Antybiotyk posiada w swojej strukturze przestrzennej „kieszonkę” która idealnie pasuje do struktury przestrzennej D-Ala-D-Ala (zasada „zamka i klucza”). Poza tym cząsteczka wankomycyny może utworzyć pięć, niekowalencyjnych wiązań wodorowych z dipeptydem, co dodatkowo stabilizuje powstający kompleks. Ponieważ cząsteczka antybiotyku jest dość duża, po związaniu heterodimeru, uniemożliwia włączenie go do już istniejącej sieci peptydoglikanu, czyli blokuje reakcję transglikozylacji, jedną z ostatnich, ale kluczowych reakcji podczas biosyntezy ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich [7].

W stężeniach, jakie są możliwe do osiągnięcia w organizmie ludzkim, zakres aktywności przeciwbakteryjnej wankomycyny obejmuje większość tlenowych oraz bez-

względnie beztlenowych drobnoustrojów Gram-dodatnich [58, 62, 66].

Wankomycyna, przez wiele lat nie stanowiła leku pierwszego rzutu w terapiach zakażeń bakteriami Gram-dodatnimi, głównie ze względu na niską jakość ówczesnych preparatów (pierwsze preparaty wankomycyny, często nazywano błotem Mississippi, *Mississippi mud*) oraz niepożądane efekty nefro- oto- oraz hepato-toksyczne [68]. Zainteresowanie glikopeptydami wzrosło dopiero na przełomie lat 70–80 XX w., na skutek ogromnego rozprzestrzeniania się szczepów MRSA [67]. W tym czasie preparaty glikopeptydów zostały też znacznie udoskonalone. Dopiero po 30 latach od wprowadzenia wankomycyny, pojawiła się pierwsza nabyta oporność u bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Oczekiwano, że podobnie jak w przypadku innych genów oporności, geny oporności na glikopeptydy z enterokoków zostaną w krótkim czasie przekazane do gronkowców. Jednak, mimo obserwowanych czasem niepowodzeń terapii zakażeń gronkowcowych, przy użyciu wankomycyny, przekazanie genów oporności na ten antybiotyk do *S. aureus*, w warunkach pozalaboratoryjnych zaobserwowano dopiero po około 15 latach.

Oprócz wankomycyny szerokie zastosowanie w leczeniu, na terenie całej Europy (w tym również w Polsce) znalazł półsyntetyczny glikopeptyd, teikoplanina. Antybiotyk wprowadzony w latach 90-tych XX w., charakteryzujący się podobnym spektrum przeciwbakteryjnym do wankomycyny, ale lepszymi właściwościami farmakokinetycznymi [9, 72]. Teikoplanina, w porównaniu do wankomycyny ma dłuższy okres biologicznego półtrwania w surowicy, dzięki czemu może być podawana co 24 godziny. Wykazuje nieco wyższą aktywność przeciwbakteryjną wobec drobnoustrojów Gram-dodatnich, przez co może być stosowana w niższych stężeniach. W terapii skojarzonej z antybiotykiem aminoglikozydowym wykazuje wyższą aktywność bakteriobójczą wobec *Enterococcus* spp. niż wankomycyna i ampicylina. Ponadto teikoplanina wywołuje znacznie mniej efektów ubocznych (odnotowano tylko nieliczne przypadki ototoksyczności). Jednak niektóre szczepy *S. haemolyticus* i *S. epidermidis* wykazują obniżoną wrażliwość na teikoplaninę w porównaniu do wankomycyny. Poza tym okazało się, że pomimo oznaczonej *in vitro* wrażliwości na teikoplaninę, terapie bakteriemii o etiologii *Staphylococcus* spp. przy zastosowaniu tego antybiotyku kończyły się niepowodzeniem. Dlatego obecnie, ze względu na ryzyko wyselekcjonowania szczepów gronkowców opornych na ten i inne antybiotyki glikopeptydowe, nie zaleca się stosowania teikoplaniny w leczeniu tego typu infekcji [9, 72].

Niedawno zarejestrowana została również inna pochodna wankomycyny, telawancyna. Jest to półsyntetyczny lipoglikopeptyd, w którym, do heptapetydowej części rdzeniowej, został dołączony lipofilny łańcuch

boczny. Dzięki tej modyfikacji telawancyna wykazuje znacznie dłuższy, w porównaniu do wankomycyny, okres połowicznego rozpadu (może być podawana co 24 godziny). Ponadto łańcuch boczny ułatwia zakotwiczenie antybiotyku w strukturach osłon komórkowych, wpływa na integralność oraz przepuszczalność błony komórkowej, a tym samym zwiększa aktywność przeciwbakteryjną tego lipoglikopeptydu. Telawancyna jest antybiotykiem zalecanym do leczenia skomplikowanych zakażeń w obrębie skóry i tkanek podskórnych, wywoływanych przez drobnoustroje Gram-dodatnie, w tym również szczepy MSSA, MRSA oraz VISA i hetero-VISA (wartości MIC od 0,03 do 1 mg/L), jednak nie wykazuje aktywności wobec *vanA*-pozytywnych izolatów VRE oraz VRSA (MIC od 1 do 4 mg/L) [40, 86].

Ciągle w fazie testów klinicznych znajdują się inne pochodne wankomycyny takie jak dalbawancyna oraz oritawancyna, których jedna lub dwie dawki są wystarczające do przeprowadzenia całego procesu terapeutycznego. Jednak dalbawancyna, podobnie jak telawancyna, nie stanowi induktora ekspresji operonu *vanA* zarówno u wankomycyno-opornych szczepów enterokoków, jak i *vanA*-pozytywnych *S. aureus* [40, 62, 64, 86].

## 2.2. Kryteria wrażliwości na glikopeptydy

Wielokrotnie dokumentowane przypadki niepowodzeń terapii wankomycyną zakażeń MRSA, mimo wrażliwości szczepu oznaczonej *in vitro*, poza poszukiwaniem przyczyny tego zjawiska, skłoniły mikrobiologów i lekarzy do zastanowienia się, czy dotychczasowe wartości MIC glikopeptydów, przyjmowane jako punkty odcięcia między szczepami wrażliwymi, a opornymi nie są zbyt wysokie. Pojawiło się wiele prac, w których udokumentowano, że znacznie więcej niepowodzeń występuje w przypadkach, kiedy wartości MIC wankomycyny są większe od 2 mg/L [21, 36, 68]. Dlatego w kwietniu 2010 r. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) wprowadził nowe kryteria oporności *S. aureus* na wankomycynę (MIC  $\geq$  4 mg/L), obowiązujące w Polsce od 01.01.2011 r., które zostały przedstawione w Tabeli I [26–29]. W Tabeli I przedstawiono również wytyczne CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute), obowiązujące w Polsce do końca 2010 r. [17–20].

## 3. Nabyta oporność na wankomycynę

### 3.1. Enterokoki VRE

W 1988 roku został wyizolowany pierwszy szczep *Enterococcus faecium* wykazujący oporność na wysokie stężenia wankomycyny oraz teikoplaniny (VRE/GRE, vancomycin/glycopeptide resistant *Enterococcus*) [92].

Tabela I  
Kryteria oporności na wankomycynę i teikoplaninę, według rekomendacji CLSI oraz EUCAST, w latach 2002–2013

Rok	CLSI						EUCAST					
	MIC wankomycyny (mg/L)			MIC teikoplaniny (mg/L)			MIC wankomycyny (mg/L)			MIC teikoplaniny (mg/L)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
2002–2005	≤4	8–16	≥32	≤8	16	≥32	–	–	–	–	–	–
2006–2008	≤2	4–8	≥16	≤8	16	≥32	≤4*	8*	≥16*	≤4*	8*	≥16*
2009	≤2	4–8	≥16	≤8	16	≥32	≤4* ≤1**	8* 2**	≥16* ≥4**	≤4* ≤1**	8* 2**	≥16* ≥4**
2010	≤2	4–8	≥16	≤8	16	≥32	≤1 ≤2***	2 _***	≥4 ≥4***	≤1 ≤2***	2 _***	≥4 ≥4***
2011	–	–	–	–	–	–	≤2	–	≥4	≤2	–	≥4
2012–2013	–	–	–	–	–	–	≤2	–	≥4	≤2	–	≥4

\* od 20–06–2006 do 21–12–2009

\*\* od 22–12–2009

\*\*\* od 04–2010

Jak wykazano, oporność enterokoków na glikopeptydy jest warunkowana obecnością operonu *van*. Od pojawienia się pod koniec lat '80 XX w. pierwszych izolatów klinicznych enterokoków opornych na glikopeptydy, do chwili obecnej, zidentyfikowano dziewięć fenotypów oporności na glikopeptydy: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM oraz VanN, różniących się między sobą pochodzeniem, fenotypowym wyrażeniem cechy (D-Ala-D-Lac u szczepów o fenotypie VanA, B, D i M; D-Ala-D-Ser u wariantów VanC, E, G, L i N), lokalizacją w genomie bakteryjnym, zdolnością do koniugacyjnego przekazywania, rozpowszechnieniem wśród enterokoków i innych rodzajów drobnoustrojów oraz sposobem regulacji ekspresji genów wchodzących w skład operonu [42, 52, 53, 65, 90, 99]. Operon *vanA* zostanie dokładniej scharakteryzowany w dalszej części niniejszej pracy.

Obecnie zakażenia wywoływane przez VRE dotyczą niemal wszystkich krajów zurbanizowanych oraz rozwijających się na świecie. W epidemiologii zakażeń VRE największą rolę odgrywają dwa gatunki, tj. *E. faecium* i znacznie rzadziej *E. faecalis*. Łatwość rozprzestrzeniania się tych szczepów w środowiskach szpitalnych wynika z nakładania się dwóch zjawisk: i) przekazywania genów oporności na drodze różnych mechanizmów horyzontalnego transferu (przede wszystkim koniugacji) oraz ii) tzw. „szerzenia klonalnego”, czyli powstawania i rozprzestrzeniania się szczepów blisko spokrewnionych ze sobą. Udział VRE w międzygatunkowej (w obrębie rodzaju *Enterococcus*), a nawet międzyrodzajowej (*Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*) wymianie materiału genetycznego *in vivo* oraz *in vitro* posiada szeroką dokumentację [8, 63–65, 70]. Uznaje się, że znany już od początku lat '90-tych XX w., typ epidemiczny *E. faecium* CC17, na przestrzeni lat także powiększył rozmiar genomu o około 150 kbp (geny *esp*) [51]. Potwierdza to zdolność tych drobnoustrojów

zarówno do pobierania, jak i przekazywania elementów genetycznych innym bakteriom.

### 3.2. Transfer operonu *vanA* ze szczepów *Enterococcus* spp. do izolatów metycylino-opornych *Staphylococcus aureus* – możliwości i obawy

Od pojawienia się oporności na wankomycynę u enterokoków, prowadzono badania nad możliwością przeniesienia genów oporności z VRE do *S. aureus* [63, 70]. Próby przekazania drogą koniugacji plazmidu zawierającego transpozon Tn1546 (operon *vanA*) w warunkach laboratoryjnych, zakończyły się powodzeniem jedynie w pracach W.C. Noble z 1992 roku [70]. Transkoniuganty otrzymywane w późniejszych latach, przez innych badaczy najczęściej nie wyrażały fenotypu VanA, a przynajmniej nie na takim poziomie jak enterokoki lub wykazywały wysoką niestabilność cechy [63]. Wydawało się zatem, że możliwość transferu genów *vanA* z VRE do MRSA jest bardzo mało prawdopodobna. Jednakże drobnoustroje same zweryfikowały te wątpliwości, ponieważ w 2002 roku w Michigan, USA, wyizolowano pierwszy, naturalnego pochodzenia szczep *S. aureus*, wykazujący fenotyp o wysokiej oporności na wankomycynę (VRSA, vancomycin resistant *S. aureus*) [14, 96]. Analizy genetyczne potwierdziły obecność u tego izolatu operonu *vanA*, a wartości MIC wankomycyny dla szczepu wynosiły 1024 mg/L, a teikoplaniny 32 mg/L [14].

Z badań przeprowadzonych w 2006 roku przez Waldron oraz Lindsay wynika [95], że aby doszło do przeniesienia oraz ekspresji genów oporności na glikopeptydy z enterokoków do *S. aureus* szczep biorcy musi być mutantem defektywnym w systemie restrykcji i modyfikacji R-M typu I [95]. Jednym z genów kodujących systemu R-M u *S. aureus* jest *hsdR*. Jednak badania przeprowadzone w 2009 roku na trzech szczepach gron-

kowca złocistego, pozbawionych genu *hsdR* wykazały, że mutacja w *hsdR*, kodującego endonukleazę SauI, nie jest wystarczająca, aby w szczepie *S. aureus* uległy ekspresji geny kodowane przez DNA pochodzące z innego rodzaju bakterii [93]. Być może odpowiedzialne są za to jeszcze inne, do tej pory niezidentyfikowane modyfikacje genomu np. mutacje w genie metylazy systemu modyfikacji typu I.

Z kolei badania przeprowadzone z udziałem klinicznych izolatów VRSA [80, 96] wykazują, że warunkiem przeniesienia i ekspresji genów *vanA* do szczepów *S. aureus* jest sekwencja dwóch następujących po sobie genetycznych zdarzeń: koniugacyjnego transferu z udziałem plazmidu należącego do rodziny Inc18, a następnie wycięcia, przeniesienia i wbudowania, czyli translokacji transpozonu Tn1546 do chromosomu komórki biorcy. Potwierdzają to wyniki najnowszych badań, uzyskane przez dwie niezależne grupy badawcze, które donoszą o skutecznym HGT (horizontal gene transfer) operonu *vanA* z wankomycyno-opornych szczepów *Enterococcus* sp. do kompetentnych komórek MRSA, w warunkach *in vitro* [24, 100].

### 3.3. Wankomycyno-oporne szczepy *Staphylococcus aureus* (VRSA)

Szczepy *S. aureus* odporne na glikopeptydy (VRSA, GRSA), można zaliczyć do dwóch grup: posiadających operon *vanA* oraz *vanA*-negatywnych. Ponadto, poniżej zostaną omówione warianty, co prawda wrażliwe na glikopeptydy, ale wytwarzające subpopulacje komórek o obniżonej wrażliwości lub opornych, tzw. szczepy h-VISA.

#### 3.3.1. Mechanizm oporności u VRSA warunkowany obecnością operonu *vanA*

Począwszy od 2002 roku, kiedy w Michigan, został wyizolowany pierwszy szczep *Staphylococcus aureus* wykazujący wysoki poziom oporności na antybiotyki glikopeptydowe, do chwili obecnej, na całym świecie zostało opisanych 13 potwierdzonych przypadków zakażeń u ludzi o etiologii VRSA (wg kryteriów CLSI). U każdego z tych izolatów oporność na wankomycynę warunkowana była obecnością genów operonu *vanA*, pochodzących od *Enterococcus* spp. [11–13, 31, 61, 74, 75, 85, 86].

System *vanA* u enterokoków zlokalizowany jest na transpozonie Tn1546, o wielkości 10,851 kbp, zaliczanym do rodziny transpozonów podobnych do Tn3. Tn1546 może być wbudowany zarówno do chromosomu, jak i do dużego plazmidu koniugacyjnego. Jest on ruchomym, podlegającym replikatywnej transpozycji elementem genetycznym, oflankowanym 36- do 38-nukleotydowymi niedoskonałymi, odwróconymi sekwencjami powtórzonymi (inverted repeats, IR).

Zawiera siedem genów: *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanR*, *vanS*, *vanY* i *vanZ*, podlegających transkrypcji ze wspólnego promotora i podlegających wspólnej regulacji oraz dwie otwarte ramki odczytu ORF1 i ORF2, ulegające transkrypcji w dwóch przeciwnych kierunkach. Kodują one, odpowiednio: gen transpozazy (*tnp*) oraz gen resolwazy (*res*) [5, 35].

Do wyrażenia fenotypu oporności na wankomycynę typu VanA niezbędne są geny: *vanH*, *vanA* oraz *vanX*. Produkt VanH, jest 322-aminokwasowym białkiem, pełniącym funkcję dehydrogenazy kwasów 2-hydroksy (alfa-keto-) karboksylowych. Przeprowadza ono redukcję kwasu pirogronowego, prowadząc do powstania D-mleczanu (D-Lac). Jest to enzym wysoce specyficzny, wykazuje aktywność jedynie wobec kwasów będących izomerami optycznymi typu D [5, 6, 10]. Białko VanX, posiada aktywność D,D-dipeptydazy i katalizuje reakcję hydrolizy wiązania peptydowego pomiędzy dwoma resztami D-Ala w pentapeptydzie. W ten sposób na końcu łańcucha tetrapeptydu pozostaje reszta D-Ala z wolną grupą karboksylową [76].

Produkty reakcji dehydrogenacji pirogronianu oraz hydrolizy wiązania peptydowego w D-Ala-D-Ala, czyli D-mleczan i reszta D-Ala<sub>4</sub> tetrapeptydu prekursora peptydoglikanu, stanowią substraty dla ligazy VanA. VanA, w przeciwieństwie do ligazy D-Ala-D-Ala, jest enzymem, który wykazuje wysoką specyficzność substratową do D-Lac [10, 53, 62]. Dzięki aktywności enzymów VanH, VanA i VanX powstaje prekursor mureiny, który na końcu łańcucha bocznego zawiera D-Ala-D-Lac. Część cząsteczki depsi-peptydu posiada inną strukturę przestrzenną niż D-Ala-D-Ala, która nie pasuje do kieszonki w cząsteczce wankomycyny (wytwarza się jedno wiązanie wodorowe mniej), co skutkuje znacznie niższym (ok. 1000x) powinowactwem antybiotyku do D-Ala-D-Lac. Wankomycyna nie wiąże się z prekursorem peptydoglikanu i tym samym nie może spełnić swojej funkcji. Reakcje transglikozylacji oraz transpeptydyzacji, czyli ostatnie etapy syntezy ściany komórkowej mogą zachodzić bez zakłóceń, a komórka mikroorganizmu wykazuje fenotyp oporności na antybiotyk glikopeptydowy [53, 62, 77].

Pozostałe dwa geny ulegające transkrypcji z promotora P<sub>H</sub>: *vanY* i *vanZ* pełnią mniej istotną rolę w wyrażeniu fenotypu oporności na glikopeptydy typu VanA. VanY jest białkiem o masie cząst. 38,4 kDa, wykazuje aktywność D,D-karboksypeptydazy o szerokim spektrum substratowym, która odcina reszty D-alaniny od każdego białka lub peptydu, które posiada ten aminokwas na końcu cząsteczki, w tym również od pentapeptydu. W ten sposób, zmniejszając liczbę cząsteczek stanowiących docelowe miejsce wiązania wankomycyny, pełnią funkcję wspomagającą do wyrażenia fenotypu oporności [4, 98]. Z kolei białko VanZ najprawdopodobniej odgrywa rolę w wyrażeniu oporności na niskim

poziomie na teikoplaninę, szczególnie w sytuacji braku genów odpowiedzialnych za syntezę depsipeptydu [3].

Geny operonu *vanA* u *S. aureus*, podobnie jak u *Enterococcus* spp. podlegają regulacji, a wyrażany fenotyp VanA oporności na glikopeptydy jest systemem indukcyjnym. Induktorami mogą być zarówno glikopeptydy, jak również czynniki nieglikopeptydowe – bacytracyna, polimyksyna B i robenidyna, stosowane w medycynie, ale również np. w leczeniu chorób infekcyjnych u drobiu [53, 62, 92]. W mechanizmie regulacji uczestniczą dwa, podlegające transkrypcji z własnego promotora P<sub>R</sub>, geny: *vanR* i *vanS*. Białko VanS pełni funkcję sensora, zlokalizowanego w błonie komórkowej bakterii i wykazuje aktywność kinazy histydynowej. Aktywacja sensora następuje w obecności ligandu [62]. Cząsteczki aktywnego sensora dokonują reakcji fosforylacji substratowej drugiego białka, VanR (response regulator), które pełni funkcję pozytywnego czynnika transkrypcyjnego operonu *vanA*. Zatem w obecności ligandu, VanS pełni funkcję aktywatora dla VanR i dochodzi do wyrażenia fenotypu oporności, natomiast w sytuacji nieobecności wankomycyny białko sensora pozostaje nieaktywne, białko odpowiedzi znajduje się w stanie defosforylacji, a geny *vanA* nie ulegają ekspresji [2, 39].

### 3.3.1.1. Heterologiczna ekspresja operonu *vanA* u wankomycyno-opornych *S. aureus*

Fenotyp VanA charakteryzuje się opornością zarówno na wankomycynę, jak i na teikoplaninę. Analiza wartości MIC wankomycyny izolatów VRSA wykazała, że choć wszystkie przekraczają wartość graniczną, co pozwala je uznać za odporne (przy zastosowaniu zarówno starych, jak i obecnie obowiązujących kryteriów, zarówno CLSI, jak i EUCAST (Tabela I), to jednak są one dla poszczególnych szczepów bardzo zróżnicowane i znajdują się w granicach między 32 a 1024 mg/L. Z kolei wartości MIC teikoplaniny izolatów VRSA zawierają się w przedziale między 8 a 32 mg/L, co również pozwala je wszystkie zaklasyfikować jako odporne, ale jedynie zgodnie z obecnie obowiązującymi kryteriami EUCAST [26, 48]. Natomiast gdyby zastosować normy oporności wg CLSI z 2009 roku to część szczepów byłoby klasyfikowanych jako wrażliwe, część jako średniowrażliwe, a niektóre jako odporne na teikoplaninę. Zróżnicowany poziom ekspresji genotypu *vanA* oraz brak ujednoczonego systemu kryteriów stwarza liczne problemy z prawidłową i konsekwentną interpretacją wyników oznaczenia wartości MIC.

Istotne stało się zbadanie przyczyn oraz mechanizmu heterologicznej ekspresji operonu *vanA* u różnych szczepów *S. aureus*. W tym celu przeprowadzono analizę porównawczą genomu pierwszego izolatu VRSA-M, wykazującego wysoki poziom oporności na obydwie glikopeptydy ze szczepem, pochodzącym z tego samego roku VRSA-P, wykazującego znacznie niższe wartości

MIC glikopeptydów [11, 13, 16]. Wykazano, że szczep VRSA-M posiada transpozon Tn1546, o wielkości 10,851 kbp w dzikiej, niezmienionej formie. Natomiast transpozon izolatu VRSA-P znacznie różni się od dzikiej wersji Tn1546. Zidentyfikowano w nim dużą delecję pomiędzy pierwszym a 3098 nukleotydem na 5'-końcu transpozonu, obejmującą sekwencję kodującą genu transpozazy *tnp*; ponadto, powyżej nukleotydu 3099 zlokalizowano 809-nukleotydową insercję, podobną do IS1216 oraz w regionie intergenicznym genów *vanS* i *vanH* odnaleziono odwróconą, 1499-nukleotydową sekwencję podobną do IS1251 [16]. Tak duże modyfikacje elementu genetycznego Tn1546 w VRSA-P mogą tłumaczyć odmienną ekspresję genów oporności.

Podobne obserwacje heterologicznej ekspresji genów warunkujących oporność na wankomycynę typu VanA, poczyniono również dla wankomycyno-opornych enterokoków już w latach '90 [32, 45, 46]. Wykazano, że w procesie horyzontalnego transferu genów transpozon Tn1546, który w szczepie dawcy występował w obrębie 40 kbp fragmentu DNA, w szczepie biorcy występował na odcinkach znacznie większych, od 150 do 450 kbp [35] lub mniejszych o około 2 kbp [87]. Dokładniejsza analiza wykazała że postkoniugacyjne modyfikacje mogą polegać na wstawieniu sekwencji podobnej do IS16 w obrębie genu *vanY*, co powoduje obniżenie wartości MIC teikoplaniny [69]. Inne zmiany, które zidentyfikowano u VRE mogą polegać na wstawianiu sekwencji insercyjnych podobnych do IS1216, IS1251 lub ISEfa4 w różnych miejscach Tn1546, tj.: powyżej ORF1; w regionie międzygenowym ORF2 – *vanR*, *vanS* – *vanH*, *vanX* – *vanY*, czy w obrębie sekwencji kodującej *vanY*. W szczepach *Enterococcus* spp. wankomycyno-opornych i wykazujących wrażliwość na teikoplaninę, o genotypie *vanA*, znaleziono również liczne delecje fragmentów lub całych genów: *tnp*, *res*, *vanR*, *vanS*, *vanY*, *vanZ* oraz mutacje punktowe, typu zmiany sensu, w genach *vanR*, *vanS*, *vanA*, *vanH*, *vanY*, *vanZ* [32, 46, 87]. Wydaje się zatem, że liczne zmiany mutacyjne w obrębie sekwencji Tn1546, tj.: insercje, delecje, mutacje punktowe zarówno wśród szczepów wankomycyno-opornych enterokoków, jak i gronkowców, mogą powodować brak możliwości wyrażenia prawidłowego fenotypu VanA i tym samym heterologiczną ekspresję genów *vanA*, specyficzną nawet dla poszczególnych izolatów.

### 3.3.1.2. Wankomycyno-oporne *S. aureus* – analiza przypadków

Na całym świecie, do tej pory odnotowano 13 przypadków izolacji szczepów VRSA. Jedenaście miało miejsce w Stanach Zjednoczonych, z czego osiem w Michigan, jeden w Pensylwanii, jeden w Nowym Yorku i jeden w Delaware [31, 74, 85, 86]. Ponadto odnotowano również trzy przypadki izolacji wankomycyno-opornych

*S. aureus* w Indiach [78, 91] oraz dwa w Iranie [1], tych ostatnich jednak nie uznano ich za odpowiednio udokumentowane. Jedynymi wiarygodnymi doniesieniami spoza Ameryki są najnowsze prace Mirani i Jamil z 2013 roku, Pakistan [61] oraz Dezfulian i wsp. z 2012 roku, Iran [25].

### 3.3.1.3. Epidemiologia szczepów VRSA *vanA*

Choć od momentu, kiedy wyizolowano pierwsze kliniczne warianty VRSA *vanA*, minęła już ponad dekada, dotychczas w literaturze zostało odnotowanych jedynie 13 przypadków. Wydaje się zatem, że zdarzenia genetyczne, które muszą zajść, aby doszło do przekazania operonu *vanA* i wyrażenia cechy wankomycyno-oporności zachodzą z niezwykle niską częstością [24, 100]. Dlatego też ryzyko globalnego rozprzestrzenienia szczepów *S. aureus* niosących geny *vanA* jest stosunkowo niewielkie. Ponadto, dodatkowym czynnikiem ograniczającym rozwój globalnej epidemii jest fakt, iż niektóre z izolatów VRSA posiadają mutację w genie *ddl*, kodującym ligazę D-Ala-D-Ala [55, 59]. Efektem fenotypowym takiej modyfikacji genetycznej jest uzależnienie wzrostu i przeżycia szczepu bakteryjnego od obecności wankomycyny. W normalnych warunkach mutacje te są letalne, z powodu braku możliwości przeprowadzenia wszystkich etapów biosyntezy ściany komórkowej. Dla wariantów *vanA*-pozytywnych jedyną możliwością przeżycia jest wykorzystanie do tych procesów ligazy D-Ala-D-Lac, która wykazuje bardzo wysoką specyficzność substratową. Zatem w komórkach musi zachodzić ekspresja operonu *vanA*, tak aby powstał i enzym, i substrat dla enzymu. Dzięki temu możliwe jest przeprowadzenie alternatywnego szlaku biosyntezy ściany komórkowej mutanta. A ponieważ *vanA* jest systemem indukcyjnym, zależnym od wankomycyny, presja antybiotyku jest warunkiem przeżycia szczepu [55, 59]. Spełnienie tego kryterium jest możliwe jedynie w warunkach szpitalnych, ponieważ glikopeptydy w działaniu ogólnoustrojowym mogą być podawane jedynie poprzez iniekcję dożylną. Niewątpliwie jest to ważny czynnik ograniczający rozprzestrzenianie się klinicznych izolatów VRSA w warunkach ambulatoryjnych oraz przy udziale pacjentów nie leczonych wankomycyną.

### 3.3.2. Szczepy VRSA – *vanA*-negatywne (dawne *Staphylococcus aureus* o obniżonej wrażliwości na wankomycynę, VISA) – pochodzenie oraz mechanizm oporności

Pierwszy szczep *S. aureus* wykazujący mechanizm obniżonej wrażliwości na wankomycynę (Mu50) został zidentyfikowany w maju 1996 roku, w jednym z japońskich szpitali klinicznych [37]. Izolat pochodził od czteromiesięcznego niemowlaka płci męskiej, operowanego z powodu atrezji tętnicy płucnej. W dwa tygodnie po

zabiegu dziecko doznało zakażenia miejsca operowanego. Ponieważ wyizolowany szczep był oporny na wszystkie antybiotyki beta-laktamowe, w terapii pierwszego rzutu zastosowano wankomycynę [45 mg/kg/dobę] jednakże, pomimo długiego, 29-dniowego stosowania, leczenie okazało się nieskuteczne. W terapii drugiego rzutu przez 12 dni podawano nadal wankomycynę, ale w skojarzeniu z antybiotykiem aminoglikozydowym – arbekacyną i choć początkowo poziom reaktywnego białka C (CRP, C-reactive protein) obniżył się do granicy normy, 12 dni po zakończeniu leczenia u niemowlaka rozwinął się ropień podskórny, również o etiologii *S. aureus*. Kolejna sześć-dniowa terapia (arbekacyna plus ampicylina/sulbaktam) wydawała się być skuteczna, jednak po odstawieniu leków poziom białka CRP był podwyższony i zmienny, co świadczyło, iż infekcja miała charakter przewlekły. Dopiero przedłużenie dawkowania arbekacyny z ampicyliną i sulbaktamem przez kolejne 17 dni przyniosło oczekiwany efekt terapeutyczny [37]. Wyizolowany od małego pacjenta szczep MRSA, nazwany Mu50 (ATCC 700699) został poddany dokładnej analizie. Okazało się, że wykazywał wiele cech nietypowych, ponieważ pomimo, że nie zawierał genów *vanA* ani *vanB*, MIC wankomycyny dla tego izolatu wynosiło 8 mg/L, co w zależności od stosowanego kryterium, świadczyło o oporności lub średniej wrażliwości szczepu. Według ówczesnych kryteriów, stosowanych przez British Society for Antimicrobial Therapy, Mu50 był oporny na wankomycynę (VRSA, MIC  $\geq$  8 mg/L), natomiast według amerykańskiego kryterium NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, obecnie CLSI) – średniowrażliwy (VISA, MIC = 8–16 mg/L) [37]. Według obecnie stosowanych w Polsce rekomendacji EUCAST, w których od kwietnia 2010 r. granica wrażliwości na wankomycynę dla *S. aureus* została obniżona do  $\leq$  2 mg/L, szczep Mu50 jest wariantem VRSA. W rekomendacjach EUCAST szczepy średniowrażliwe (VISA), w ogóle nie występują [26, 48]. Natomiast zgodnie z rekomendacjami CLSI, szczepy dla których wartości MIC wankomycyny znajdują się w przedziale 4–8 mg/L, nadal są szczepami VISA (Tabela I).

Pierwsze badania szczepu Mu50 wykazały, że posiada on dwukrotnie grubszą ścianę komórkową (około 40 warstw peptydoglikanu) niż typowe, wrażliwe szczepy *S. aureus*. Produkuje też trzykrotnie więcej białek PBP2 i PBP2' oraz syntetyzuje trzykrotnie więcej prekursorów mureiny [37]. Wielu badaczy podjęło próby wyjaśnienia mechanizmu obniżonej wrażliwości na glikopeptydy u tych szczepów, jak również próby doszukania się pewnych korelacji pomiędzy nietypowymi właściwościami ściany komórkowej, a wyrażaniem się fenotypu VISA, zarówno u Mu50, jak również późniejszych izolatów.

Wzrost grubości ściany komórkowej wydawał się odgrywać kluczową rolę w obniżeniu wrażliwości szczepów na glikopeptydy [33, 83]. Zakładano, że jest

to wypadkowa kilku innych procesów, które zachodziły w komórce, tj.: wzrostu syntezy bifunkcyjnego enzymu transglikozylazy i transpeptydazy (3–5 razy); nawet 20-krotnego wzrostu wewnątrzkomórkowej produkcji N-acetylo-glukozaminy oraz syntezy i akumulacji prekursorów peptydoglikanu, czyli lipidu I oraz lipidu II w błonie cytoplazmatycznej (3–8 razy) [33] i tym samym przyspieszenia metabolizmu ściany komórkowej zarówno na etapie wbudowywania, jak i uwalniania jej składników [83]. PBP2 oraz, warunkowane obecnością genu *mecA*, PBP2' (PBP2a), rzeczywiście mogą wpływać na efektywność włączania nowych heteromerów do już istniejącej sieci peptydoglikanu, jak również na wydajność wytwarzania wiązań poprzecznych w mureinie. Jednak dalsze badania dowiodły, że nie ma to wpływu na zwiększenie oporności szczepów *S. aureus* na antybiotyki glikopeptydowe, a jedynie na beta-laktamy [22, 33]. Nie stwierdzono również oporności krzyżowej bakterii na te dwie grupy chemioterapeutyków [22].

Z kolei istotne wydają się być te zmiany, które związane są z wcześniejszymi etapami biosyntezy ściany komórkowej. Analiza sekwencji genomu oraz porównanie 362 otwartych ramek odczytu ORF (open reading frame) pomiędzy Mu50 a wzorcowym szczepem MRSA, wrażliwym na wankomycynę N315, wykazało aż 213 różnic na poziomie DNA, z czego 174 (6,6% ze wszystkich 2699 genów szczepu Mu50) dawało efekt zmiany sensu na poziomie produktu genu [49, 71]. Zmiany te dotyczyły przede wszystkim trzech grup genów: i) związanych z transportem komórkowym (14,9% ze 174 istotnie różniących się); ii) związanych z metabolizmem węglowodanów (5,7%); iii) uczestniczących w syntezie RNA oraz mechanizmach regulacyjnych (8,0%) [49, 71]. Uzyskane wyniki wydają się potwierdzać oraz wyjaśniać niektóre wcześniejsze hipotezy, ponieważ węglowodany, takie jak glukoza czy glukozamina mogą w komórce bakteryjnej być wykorzystywane jako źródło węgla w procesach biosyntezy peptydoglikanu ściany komórkowej [21, 23]. Związki te mogą ulegać włączeniu w cykl przemian metabolicznych za pośrednictwem systemu fosfotransferaz PTS (phosphotransferase system), który podczas procesów transportu komórkowego przeprowadza reakcje fosforylacji substratowej cukrów. W ten sposób np. przy udziale aminotransferazy 6-fosfoglucozamino-fruktozy, może być syntetyzowana 6-fosfoglucozamina (GlcN-6-P), która stanowi substrat do produkcji jednego z cytoplazmatycznych prekursorów mureiny. Inne białka transporterów odgrywające rolę w produkcji ściany komórkowej, to związki zaliczane do podrodziny transporterów w systemie typu ABC (ATP-binding cassette transporter), takie jak transporter fosfoheksozowy (kodowany przez gen *uhpT*), transporter fosfoglicerolowy (*glpT*) czy transporter specyficzny dla laktozy (*lacE*). Ponadto wykazano, że różnice genetyczne między szczepem Mu50, a N315, wrażliwym na wanko-

mycynę, dotyczą również trzech genów: *acsA*, syntetazy acetylo-koenzymu A; *pykA*, kinazy pirogronianowej oraz *lctE*, dehydrogenazy L-mleczanowej, związanych z cyklem przemian kwasów trójkarboksylowych (TCA, tricarboxylic acid cycle), prowadzących do powstania pirogronianu. Pirogronian z kolei uczestniczy w syntezie glutaminianu, będącego składnikiem w GlcNAc- $\beta$ -(1,4)-MurNAc-pentapeptydzie. Znalezione również zmiany w 17 genach odgrywających rolę w procesach regulacyjnych, z których pięć jest zaliczanych do tzw. dwuskładnikowych systemów regulatorowych TCSTS (two components signal transduction system). Polegały one na substytucji pojedynczego nukleotydu [44, 49, 71].

Wzmocniony transport oraz synteza prekursorów peptydoglikanu mogą w efekcie powodować powstawanie ściany komórkowej o nietypowej budowie oraz grubości. Ponadto wykazano, że w pentapeptydzie mureiny szczepu Mu50 znajduje się więcej cząsteczek glutaminianu pozbawionego reszty aminowej [34]. Początkowo przypuszczano, że przyczyną może być mutacja lub obniżenie ekspresji genu *glnA*, kodującego syntetazę glutaminy, która w procesie biosyntezy ściany komórkowej jest dawcą grupy aminowej dla prekursorów heterodimeru [34]. Okazało się, że glutamina faktycznie odgrywa kluczową rolę w powstawaniu prawidłowej cząsteczki aminokwasu, ale w jej niedoborze znaczenie odgrywa inne podłoże molekularne. Podwyższenie poziomu syntezy lipidu I oraz lipidu II powoduje spadek poziomu wewnątrzkomórkowej glukozy, która stanowi punkt wyjścia dla licznych przemian metabolicznych, w tym również dla syntezy glutaminy [21, 23]. Ponadto, sekwencjonowanie wybranych genów szczepu Mu50 oraz wrażliwego wariantu *S. aureus* N315, ujawniło substytucję nukleotydu w *nasD*, co spowodowało zastąpienie glicyny Gly<sup>478</sup> przez alaninę w produkcie genu. Powstanie nieaktywnej biologicznie reduktazy azotanu, prowadzi do obniżenia poziomu wewnątrzkomórkowego amoniaku, który stanowi jeden z dawców grupy aminowej dla glutaminy [71].

W komórkach szczepów bakteryjnych wykazujących zmniejszoną wrażliwość na wankomycynę obserwuje się zwiększenie grubości ściany komórkowej, ale zawiera ona w swojej strukturze dużą ilość pentapeptydów z glutaminianem, pozbawionym reszty aminowej na końcu. Uniemożliwia to wytwarzanie przez transpeptydazę PBP wiązania peptydowego pomiędzy L-Lys a grupą karboksylową glicyny w łańcuchu pentaglicynowym, a tym samym mostków poprzecznych pomiędzy resztą L-lizyny jednego pentapeptydu, a resztą D-alaninową innego. W efekcie powstaje peptydoglikan o zmienionym składzie jakościowo-ilościowym, zawierający zwiększoną ilość niezwiązanych dimerów D-alanino-D-alaninowych na końcach pentapeptydów oraz ze zmienioną strukturą przestrzenną, czyli mniej usiecioną [23, 34, 38].



Wzmoczone procesy metaboliczne prowadzą również do uwalniania większej ilości dimerów D-Ala-D-Ala, które nie ulegają wbudowaniu w strukturę peptydoglikanu, lecz znajdują się w przestrzeni trójwymiarowej sieci [83]. Stanowią one dodatkowe punkty uchwytu dla wankomycyny. U drobnoustrojów Gram-dodatnich cząsteczki tego antybiotyku wnikają w strukturę przestrzennej sieci, ale warunkiem zadziałania leku (wywołania efektu bakteriostatycznego lub bakteriobójczego) jest dotarcie do docelowego miejsca, czyli tuż przy błonie komórkowej [7, 23]. Zmniejszone usieciowanie mureiny ułatwia penetrację glikopeptydu, ale po drodze natrafia on na wolne dimery D-Ala-D-Ala, zarówno w oczkach sieci peptydoglikanu, jak i na końcach pentapeptydów, które stanowią swoistą „pułapkę” dla wankomycyny. Zatem może zaistnieć sytuacja w której wszystkie cząsteczki leku ulegną związaniu, a tym samym inaktywacji, zanim dotrą do właściwego miejsca swojego działania, czyli tam gdzie zachodzą reakcje polimeryzacji heterodimerów  $-(\text{GlcNAc-}\beta\text{-(1,4)-MurNAc-pentapeptyd})-$  [38, 83]. Ponadto penetracja wankomycyny może być dodatkowo utrudniona ze względu na rozbudowaną strukturę przestrzenną cząsteczek antybiotyku. Związane i uwięzione w pierwszych warstwach peptydoglikanu cząsteczki antybiotyku, uniemożliwiają przenikanie kolejnych, aktywnych do głębszych warstw sieci [21]. Badania przeprowadzone przez Cui i wsp. dowodzą, że podczas hodowli szczepów VISA na podłożu z wankomycyną (30 mg/L), stężenie antybiotyku w pożywce zmniejsza się w zależności od czasu inkubacji i jednocześnie zwiększa się wysycenie nim mureiny bakterii. Zmiany strukturalne ściany komórkowej mają jedynie wpływ na szybkość i tym samym wydajność pochłaniania wankomycyny (wprost proporcjonalnie do stopnia uszkodzenia heteropolimeru), jednakże nie decydują o wyniku ilościowym [21].

Przeprowadzone dotychczas badania nie pozostawiają wątpliwości, że pogrubiona ściana komórkowa u szczepów *S. aureus* odgrywa kluczową rolę w wyrażeniu się fenotypu obniżonej wrażliwości na wankomycynę. Okazuje się jednak, że na taki efekt wpływają nie tylko procesy wzmoczonej syntezy i kumulacji prekursorów peptydoglikanu, lecz również obniżonej aktywności autolitycznej.

Reakcje autolityczne u *S. aureus* zachodzą z udziałem około 20 różnych enzymów hydrolitycznych i odgrywają naturalną rolę w procesach fizjologicznych komórki bakteryjnej takich jak: wzrost i podziały komórki; produkcja i utylizacja muropeptydu; liza komórki indukowana inhibitorami syntezy peptydoglikanu; remodeling heteropolimeru związany np. z powstawaniem pili koniugacyjnych. Do najważniejszych hydrolaz zalicza się: amidazę N-acetyl-muramyl-L-alaninową (amidaza N-MurAc-L-Ala), N-acetyl-glukozaaminidazę (N-GlcAc-aminidaza), N-acetyl-muraminidazę (N-MurAc-aminidaza),

endopeptydazy oraz transglikozylazy. Najlepiej poznane autolizyny: amidaza N-MurAc-L-Ala (62 kDa) oraz N-GlcAc-aminidaza (51 kDa) są kodowane przez jeden wspólny gen oraz transkrypt *atl*, którego pierwotny produkt o masie 138 kDa, podczas obróbki posttranslacyjnej ulega cięciu proteolitycznemu na dwa aktywne enzymy o masach cząsteczkowych 62 i 51 kDa. Amidaza N-MurAc-L-Ala uczestniczy w odłączaniu pentapeptydu od łańcucha heteropolimeru, natomiast N-acetyl-glukozaaminidaza ma swoje miejsce rozpoznawalne pomiędzy resztą  $-(\text{N-GlcAc})-$  a pierwszym aminokwasem pentapeptydu (L-Ala). Z kolei rodzina białek Lyt pełni funkcje endopeptydaz. Najważniejsza z nich endopeptydaza glicyl-glicynowa, LytM, jest białkiem o masie 32 kDa i uczestniczy w rozcinaniu wiązań poprzecznych (mostki pentaglicynowe) sieci peptydoglikanu [94].

Już pierwsze badania prowadzone na szczepie wzorcowym VISA (Mu50) wskazywały na zaburzenia w recyklingu składników jego ściany komórkowej oraz na wolniejsze uwalnianie hydrolizowanych łańcuchów mureiny [33]. Sieraadzi i Tomasz dowodzą, że efekt ten jest związany raczej ze zmodyfikowaną strukturą peptydoglikanu niż z budową lub funkcją samych autolizyn [84]. Zaobserwowano, że jeżeli szczepy *S. aureus* rosną na podłożach zawierających subinhibicyjne stężenia wankomycyny, to komórki bakterii rosną w postaci bezpostaciowych skupisk (gron) i zawierają nierozdzieloną, amorficzną ścianę komórkową [84]. Świadczy to o tym, że w obecności antybiotyku dochodzi do zaburzeń procesów litycznych, przez co, w trakcie podziałów nie mogą powstać prawidłowe komórki potomne. Jednocześnie stwierdzono, że w podłożu, w pobliżu miejsca wzrostu drobnoustrojów, zmniejsza się stężenie wankomycyny, co potwierdza wyniki wcześniejszych badań, iż antybiotyk jest wbudowywany w strukturę peptydoglikanu [21, 23, 84]. A ponieważ cząsteczki wankomycyny są dość duże i posiadają miejsce przyłączania w pobliżu wiązań hydrolizowanych przez amidazy N-MurAc-L-Ala oraz endopeptydazy glicyl-glicynowe, uniemożliwiają dotarcie enzymów hydrolizujących do docelowego miejsca działania, najprawdopodobniej na drodze mechanizmu polegającego na tworzeniu fizycznej bariery.

Mechanizm zmniejszonej wrażliwości na wankomycynę izolatów *S. aureus*, częściowo wyjaśnia również fakt obniżenia aktywności białka wiążącego penicylinę PBP4 [30, 82, 83]. Jest to jeden z enzymów, należących do niskocząsteczkowych białek PBP (LMW), w obrębie rodziny transferaz acylo-serynowych, uczestniczących w procesach polimeryzacji oraz sieciowania mureiny [79]. Niedobór tego enzymu może powodować obniżenie ilości wytwarzanych wiązań poprzecznych (aktywność transpeptydazy) oraz zwiększenie ilości dimerów D-Ala-D-Ala, które stanowią docelowe miejsce

działania wankomycyny [30]. Dlatego szczepy, które posiadają obniżoną produkcję PBP4 lub syntetyzują nieaktywny enzym, wykazują obniżoną wrażliwość w stosunku do tego antybiotyku [30, 82, 83].

Istnieje korelacja również pomiędzy spadkiem liczby wiązań poprzecznych w peptydoglikanie a wzrastającą długością łańcuchów heteropolimeru [47]. Jednak dotychczas nie został wyjaśniony mechanizm tej zależności. Wydaje się również, że na obniżenie poziomu usieciowania mureiny może mieć wpływ inaktywacja operonu *femA/B* [41]. Jednak określenie takiej zależności na podstawie spadku aktywności białek Fem wymaga przeprowadzenia dalszych analiz.

Globalna analiza poziomu ekspresji mRNA u szczepów VSSA i VISA (JH1 – JH15), izolowanych od tego samego pacjenta na różnych etapach długotrwałej terapii wankomycyną [81, 83] pokazuje, że powstawanie szczepów o fenotypie VISA jest procesem bardzo złożonym i determinowanym wielogenowo [57]. Pomiedzy wariantem wrażliwym na wankomycynę JH1, a średniowrażliwym JH9 wykryto przynajmniej dwukrotną różnicę ekspresji 224 genów. Obniżenie syntezy mRNA i cDNA dotyczyło 169 genów, związanych przede wszystkim z metabolizmem podstawowym, syntezą białek powierzchniowych oraz licznych toksyn i enzymów; natomiast podwyższoną ekspresję odnotowano dla 55 genów, kodujących przede wszystkim czynniki uczestniczące w transporcie komórkowym, metabolizmie węglowodanów, biosyntezie ściany komórkowej oraz globalnych procesach regulacyjnych. Zidentyfikowano również dwa geny SA2343 i SAS016 (numery ORF szczepu N315), których ekspresja była 84- i 23-krotnie wyższa u wariantu VISA w porównaniu z izolatem wrażliwym, jednak funkcja tych genów nie została dotychczas poznana [57].

Uzyskane wyniki zmian w ekspresji genów mogą sugerować, że powstawanie szczepów o obniżonej wrażliwości na wankomycynę wiąże się z zaburzeniami w komórkowych systemach regulacyjnych [88]. Hipotezę tą potwierdzają wyniki analiz z 2009 roku, które wskazują na udział globalnego czynnika regulacyjnego SarA w wyrażaniu fenotypu VISA [50]. Z kolei wyniki najnowszych badań, z października 2012, sugerują znaczący udział w ekspresji fenotypu VISA białek z rodziny fosfatyz C2 (PPC2, protein phosphatase C2) [73].

#### 4. Szczepy *Staphylococcus aureus* wykazujące fenotyp hetero-VISA

Pierwszy szczep hetero-VISA, oznaczony jako wrażliwy na wankomycynę, ale zawierający subpopulację komórek dla których MIC tego antybiotyku było na zróżnicowanym poziomie (od 3 do 9 mg/L), został wyizolowany w styczniu 1996 (wcześniej niż Mu50),

w Japonii, w tym samym ośrodku klinicznym, co pierwszy izolat VISA [36]. Pochodził od 64-letniego pacjenta, który po operacji płuc, wykonywanej z powodu nowotworu, doznał infekcji dolnych dróg oddechowych. Ponieważ badanie diagnostyczne wykazało, że czynnikiem etiologicznym był szczep MRSA, jako lek pierwszego rzutu zastosowano wankomycynę (42 mg/kg/dobę). Dwunasto-dniowe leczenie nie przyniosło poprawy, a wręcz, w ciągu czterech ostatnich dni podawania leku, objawy zapalenia płuc nasiliły się. Z tego powodu zmieniono zestaw antybiotyków i przez kolejnych 10 dni pacjentowi podawano terapię skojarzoną: arbekacynę plus ampicylinę/sulbaktam. Szczep o fenotypie hetero-VISA, nazwany Mu3 (ATCC 700698), został wyizolowany z płwociny chorego zanim do leczenia został wprowadzony aminoglikozyd z antybiotykiem beta-laktamowym i inhibitorem beta-laktamaz [36]. Izolat wykazywał  $MIC_{VA} = 3$  mg/L, przez co pierwotnie został zaklasyfikowany jako wariant wrażliwy na wankomycynę (VSSA). Jednak niepowodzenie terapii przy użyciu tego antybiotyku, skłoniło naukowców do ponownych badań Mu3. Analiza populacyjna szczepu, polegająca na wysiewaniu różnych rozcieńczeń hodowli bakteryjnej na podłoża ze wzrastającymi stężeniami wankomycyny wykazała, że stężenie 4 mg/L hamuje wzrost 99,99% komórek. Natomiast niewielka subpopulacja (jedna na  $10^6$  komórek) wykazuje wzrost na pożywkach zawierających glikopeptyd w stężeniach 5, 6, 7, 8, a nawet 9 mg/L. Dla porównania, szczep Mu50 w 100% był niewrażliwy na stężenie wankomycyny 4 mg/L, natomiast wyższa koncentracja antybiotyku w podłożu hamowała wzrost części komórek mikroorganizmu tak, że przy stężeniu 10 mg/L, uzyskiwano wzrost 0,001% hodowli. Z kolei szczep VSSA (FDA209P) był w 100% wrażliwy na stężenie wankomycyny 4 mg/L [36]. Dlatego też izolat Mu50 został określony jako wykazujący fenotyp o obniżonej wrażliwości na wankomycynę (VISA), natomiast Mu3, który w rutynowym oznaczeniu był wrażliwy na ten antybiotyk, ale posiadał heterogenną populację komórek, został nazwany hetero-VISA (h-VISA). Na podstawie kolejnych analiz stwierdzono, że oba szczepy wykazują fenotyp heterogeny również w stosunku do innego antybiotyku glikopeptydowego, teikoplaniny ( $MIC_{Mu3} = 8$  mg/L,  $MIC_{Mu50} = 16$  mg/L), czyli są to warianty nie tylko hetero-VISA i VISA, lecz również hetero-GISA oraz GISA. Dalsza charakterystyka ujawniła pewne podobieństwa pomiędzy japońskimi izolatami. Posiadały ten sam wzór restrykcyjny w typowaniu PFGE, co oznaczało, że stanowiły ten sam typ epidemiczny (klon IIA); należały do tego samego typu MLST (ST5), były wrażliwe na takie samo minimalne stężenie bakteriobójcze wankomycyny,  $MBC = 8$  mg/L, ponadto obydwa zostały wyizolowane od pacjentów z tego samego japońskiego ośrodka klinicznego, co pozwala przypuszczać, że są to szczepy bli-

sko spokrewnione ze sobą [36]. Badania, które miały na celu poznanie mechanizmu prowadzącego do ekspresji fenotypu hetero-VISA, były również równolegle przeprowadzane dla Mu50. Mu3, podobnie jak wzorcowy izolat VISA, wykazywał podwyższony poziom syntezy wewnątrzkomórkowych prekursorów mureiny oraz zwiększone trzykrotnie uwalnianie heterodimerów na zewnątrz błony komórkowej, wzrost syntezy hydrolaz peptydoglikanu oraz zwiększenie dwukrotne aktywności autolitycznej ściany komórkowej, jak również podwyższenie trzykrotne produkcji białek PBP2 i PBP2<sup>2</sup> związanych z ostatnimi etapami syntezy heteropolimeru. Jednak zmiany te były na poziomie 1,67–6,67 razy niższym, niż u szczepu wzorcowego VISA, Mu50 [33]. Pierwsze analizy porównawcze ujawniły, że jedyna różnica związana była z grubością ściany komórkowej, która u hetero-VISA pozostawała niezmienną, dzięki czemu także struktura peptydoglikanu pozostawała jak u izolatów wrażliwych (brak heteromerów z glicyną pozbawioną grupy aminowej, usieciowanie mureiny na naturalnym poziomie) [34]. Także analiza molekularna sekwencji 213 genów wykazała, że zmiany mutacyjne (substytucje nukleotydów) dotyczą tych samych grup genów (tylko 9 różnic) u obu wariantów, tj.: związanych z metabolizmem węglowodanów, transportem wewnątrzkomórkowym oraz z mechanizmami regulacyjnymi [71]. Wydaje się zatem, że za ekspresję fenotypu hetero-VISA oraz hetero-GISA odpowiadają te same mechanizmy, co u szczepów VISA i GISA, a te pierwsze są najprawdopodobniej formami prekursorowymi, co by tłumaczyło słabsze wyrażenie oraz utrwalenie pewnych modyfikacji i właściwości fenotypu oraz genotypu. Najnowsze publikacje wydają się potwierdzać udział globalnych, komórkowych systemów regulacyjnych (*sarA*, *agr*, *sigB*, *mgrA*) w ekspresji obniżonej wrażliwości na wankomycynę/glikopeptydy u szczepów VISA i GISA oraz u heterogennych h-VISA i h-GISA [15, 50, 88]. Zgodnie z obecnie obowiązującymi rekomendacjami, szczep Mu3, który jest uznawany za wzorcowy szczep h-VISA, jest szczepem VRSA wg EUCAST (kryterium oporności dla wankomycyny MIC  $\geq$  4 mg/L,) oraz VISA wg CLSI, a więc podobieństwo mechanizmów oporności wydaje się zrozumiałe.

### 5. Opcje terapeutyczne leczenia ciężkich zakażeń o etiologii *S. aureus*, wobec których terapia wankomycyną pozostaje nieskuteczna

Pojawienie się pod koniec lat '80-tych XX wieku wankomycyno-opornych szczepów *Enterococcus* spp., w roku 1987 pierwszych klinicznych izolatów gronkoców koagulazo-ujemnych (głównie *S. haemolyticus* oraz *S. epidermidis*), wykazujących fenotyp obniżonej wrażliwości na glikopeptydy, jak również pod koniec

lat '90 XX w. wariantów *S. aureus* niewrażliwych na leczenie dostępnymi wówczas antybiotykami glikopeptydowymi, skłoniło klinicystów oraz mikrobiologów do poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych, stanowiących alternatywę dla wankomycyny. W roku 2000 wprowadzono do leczenia linezolid, syntetyczny chemioterapeutyk z grupy oksazolidynonów, skuteczny i bezpieczny w terapiach szpitalnego i ambulatoryjnego zapalenia płuc oraz zakażeń w obrębie skóry i tkanek podskórnych, wywoływanych przez szczepy MRSA, VISA, hetero-VISA oraz VRE. Jednak już począwszy od roku 2001 na całym świecie odnotowuje się przypadki izolacji szczepów *S. aureus*, *E. faecium* oraz *E. faecalis* wykazujące oporność typu mutacyjnego na ten lek przeciwbakteryjny. W ostatnich latach zostały zarejestrowane na rynku, również w Polsce, jeszcze inne terapeutyki, takie jak: daptomycyna (cykliczny lipopeptyd), chinupristina-dalfopristina (preparat złożony ze streptogramin A i B) oraz tigecyklina (glicylocyklina, tetracyklina nowej generacji). I choć każdy z nich wykazuje wysoką aktywność *in vitro* oraz skuteczność w leczeniu zakażeń wywoływanych przez wieloleko-oporne ziarenkowce Gram-dodatnie, to jednocześnie żaden z nich nie jest lekiem ani uniwersalnym, ani pozbawionym wad [40, 62, 64, 86]. W ostatnich latach duże nadzieje leczenia zakażeń MRSA wiąże się z cefalosporynami piątej generacji, jednak jedyny z dotychczas zarejestrowanych z tej grupy antybiotyków – fosamil ceftaroliny, nie jest jeszcze dostępny w Polsce.

### 6. Podsumowanie

Już od początku lat '90 XX w. coraz częściej mają miejsce przypadki niepowodzeń terapeutycznych przy zastosowaniu antybiotyków glikopeptydowych, które jeszcze do niedawna były uznawane za skuteczne terapeutyki, stosowane z wyboru w leczeniu ciężkich infekcji o etiologii MRSA. Przyczyną tych niepowodzeń są szczepy *Staphylococcus aureus*, które na różne sposoby mogą manifestować obniżoną wrażliwość lub oporność na wankomycynę i/lub teikoplaninę (VRSA, VISA, hetero-VISA). Efekty te są warunkowane odmiennymi mechanizmami molekularnymi, podlegającymi różnym systemom regulacyjnym oraz objawiające się różnicowanymi cechami fenotypowymi, ale w konsekwencji zawsze prowadzącymi do braku skuteczności zastosowanego leczenia. Mimo, że wankomycyna nadal stanowi lek z wyboru w terapiach zakażeń MRSA i pomimo możliwości zastosowania kilku alternatywnych terapeutyków, skutecznych wobec wieloleko-opornych *S. aureus*, konieczne jest stosowanie zasad racjonalnej antybiotykoterapii oraz, ze względu na wciąż zmniejszającą się liczbę obecnie dostępnych, poszukiwanie nowych opcji terapeutycznych.

## Piśmiennictwo

- Aligholi M., Emameini M., Jabalameli F., Shahsavani S., Dabiri H., Sedaght H.: Emergence of high-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Imam Khomeini Hospital in Tehran. *Med. Princ. Pract.* **17**, 432–434 (2008)
- Arthur M., Depardieu F., Gerbaud G., Galimand M., Leclercq R., Courvalin P.: The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *J. Bacteriol.* **179**, 97–106 (1997)
- Arthur M., Depardieu F., Molinas C., Reynolds P., Courvalin P.: The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene*, **154**, 87–92 (1995)
- Arthur M., Depardieu F., Snaith H.A., Reynolds P.E., Courvalin P.: Contribution of VanY D,D-carboxypeptidase to glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* by hydrolysis of peptidoglycan precursors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1899–1903 (1994)
- Arthur M., Molinas C., Depardieu F., Courvalin P.: Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* **175**, 117–127 (1993)
- Arthur M., Molinas C., Dutka-Malen S., Courvalin P.: Structural relationship between the vancomycin resistance protein VanH and 2-hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. *Gene*, **103**, 133–134 (1991)
- Barna J.C.J., Williams D.H.: The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**, 339–357 (1984)
- Biavasco F., Giovanetti E., Miele A., Vignaroli C., Facinelli B., Varaldo P.E.: *In vitro* conjugative transfer of VanA vancomycin resistance between enterococci and *Listeriae* of different species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 50–59 (1996)
- Boger D.L.: Vancomycin, teicoplanin, and ramoplanin: synthetic and mechanistic studies. *Med. Res. Rev.* **21**, 356–381 (2001)
- Bugg T.D.H., Wright G.D., Dutka-Malen S., Arthur M., Courvalin P., Walsh C.T.: Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry*, **30**, 10408–10415 (1991)
- CDC.: *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin – United States, 2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**, 565–567 (2002)
- CDC.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – New York, 2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **53**, 322–323 (2004)
- CDC.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – Pennsylvania, 2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**, 902 (2002)
- Chang S., Fridkin S.K. i wsp.: Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team.: Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1342–1347 (2003)
- Chong Y.P., Kim Y.S. i wsp.: Accessory Gene Regulator (*agr*) Dysfunction in *Staphylococcus aureus* Bloodstream Isolates from South Korean Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1509–1512 (2013)
- Clark N.C., Weigel L.M., Patel J.B., Tenover F.C.: Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 470–472 (2005)
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2005.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard. *M100-S15*, **25**, 1–181 (2005)
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2006.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M2-A9 and M7-A7. *M100-S16*, **26**, 1–181 (2006)
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2008.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M2-A9 and M7-A7. *M100-S18*, **28**, 1–181 (2008)
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2009.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *M100-S19*, **29**, 1–149 (2009)
- Cui L., Iwamoto A., Lian J.Q., Neoh H.M., Maruyama T., Horikawa Y., Hiramatsu K.: Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 428–438 (2006)
- Cui L., Ma X., Sato K., Okuma K., Tenover F.C., Mamizuka E.M., Gemmell C.G., Kim M.N., Ploy M.C., El-Solh N., Ferraz V., Hiramatsu K.: Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 5–14 (2003)
- Cui L., Murakami H., Kuwahara-Arai K., Hanaki H., Hiramatsu K.: Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2276–2285 (2000)
- de Niederhäusern S., Bondi M., Messi P., Iseppi R., Sabia C., Manicardi G., Anacarso I.: Vancomycin-resistance transferability from VanA enterococci to *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* **62**, 1363–1367 (2011)
- Dezfulian A., Aslani M.M., Oskoui M., Farrokh P., Azimirad M., Dabiri H., Salehian M.T., Zali M.R.: Identification and Characterization of a High Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring VanA Gene Cluster Isolated from Diabetic Foot Ulcer. *Iran J. Basic Med. Sci.* **15**, 803–806 (2012)
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical Breakpoint Table v. 3.1, 2013.02.11. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf), 2013.03.29.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2006.06.20. <http://www.srga.org/eucastwt/mictab/MICglycopeptides.html>, 2013.03.29.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST\_breakpoints\_v1.0\_20091221,2009.12.21. [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/previous\\_versions\\_of\\_tables](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/previous_versions_of_tables), 2013.03.29.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Kopia EUCAST\_breakpoints\_v1.2\_101220,2010.12.20. [http://www.eucast.org/antimicrobial\\_susceptibility\\_testing/previous\\_versions\\_of\\_tables](http://www.eucast.org/antimicrobial_susceptibility_testing/previous_versions_of_tables), 2013.03.29.
- Finan J.E., Archer G.L., Pucci M.J., Climo M.W.: Role of penicillin-binding protein 4 in expression of vancomycin resistance among clinical isolates of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3070–3075 (2001)
- Finks J., Miller C. i wsp.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, Michigan, USA, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 943–945 (2009)
- Gu L., Cao B., Liu Y., Guo P., Song S., Li R., Dai H., Wang C.: A new Tn1546 type of VanB phenotype-*vanA* genotype vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in mainland China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **63**, 70–75 (2009)
- Hanaki H., Kuwahara-Arai K., Boyle-Vavra S., Daum R.S., Labischinski H., Hiramatsu K.: Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 199–209 (1998)
- Hanaki H., Labischinski H., Inaba Y., Kondo N., Murakami H., Hiramatsu K.: Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**, 315–320 (1998)

35. Handwerger S., Skoble J.: Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2446–2453 (1995)
36. Hiramatsu K., Aritaka N., Hanaki H., Kawasaki S., Hosoda Y., Hori S., Fukuchi Y., Kobayashi I.: Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, **350**, 1670–1673 (1997)
37. Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T., Tenover F.C.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 135–136 (1997)
38. Hiramatsu K.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet. Infect. Dis.* **1**, 147–155 (2001)
39. Hong H.J., Hutchings M.I., Buttner M.J.: Vancomycin resistance VanS/VanR two-component systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* **631**, 200–223 (2008)
40. Howden B.P., Davies J.K., Johnson P.D., Stinear T.P., Grayson M.L.: Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 99–139 (2010)
41. Hübscher J., Jansen A., Kotte O., Schäfer J., Majcherczyk P.A., Harris L.G., Bierbaum G., Heinemann M., Berger-Bächi B.: Living with an imperfect cell wall: compensation of *femAB* inactivation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics*, **8**, 307 (2007)
42. Jeljaszewicz J., Młynarczyk G., Młynarczyk A.: Antibiotic resistance in Gram-positive cocci. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **16**, 473–478 (2000)
43. Jevons M.P.: “Celbenin” – resistant staphylococci. *BMJ*. **1**, 124–125 (1961)
44. Kato Y., Suzuki T., Ida T., Maebashi K.: Genetic changes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: predominance of amino acid substitutions in YvqF/VraSR. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 37–45 (2010)
45. Khan M.A., van der Wal M., Farrell D.J., Cossins L., van Belkum A., Alaidan A., Hays J.P.: Analysis of VanA vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Saudi Arabian hospitals reveals the presence of clonal cluster 17 and two new Tn1546 lineage types. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 279–283 (2008)
46. Khan S.A., Sung K., Layton S., Nawaz M.S.: Heteroresistance to vancomycin and novel point mutations in Tn1546 of *Enterococcus faecium* ATCC 51559. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **31**, 27–36 (2008)
47. Komatsuzawa H., Ohta K., Yamada S., Ehlert K., Labischinski H., Kajimura J., Fujiwara T., Sugai M.: Increased glycan chain length distribution and decreased susceptibility to moenomycin in a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 75–81 (2002)
48. Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów. [http://www.korl.edu.pl/pdf/eucast/EUCAST\\_breakpoints\\_tlumaczenie\\_v2-2012.pdf](http://www.korl.edu.pl/pdf/eucast/EUCAST_breakpoints_tlumaczenie_v2-2012.pdf)
49. Kuroda M., Hiramatsu K. i wsp.: Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **357**, 1225–1240 (2001)
50. Lamichhane-Khadka R., Cantore S.A., Riordan J.T., Delgado A., Norman A.E., Dueñas S., Zaman S., Horan S., Wilkinson B.J., Gustafson J.E.: *sarA* inactivation reduces vancomycin-intermediate and ciprofloxacin resistance expression by *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **34**, 136–141 (2009)
51. Leavis H., Top J., Shankar N., Borgen K., Bonten M., van Embden J., Willems R.J.: A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J. Bacteriol.* **186**, 672–682 (2004)
52. Lebreton F., Depardieu F., Bourdon N., Fines-Guyon M., Berger P., Camiade S., Leclercq R., Courvalin P., Cattoir V.: d-Ala-d-Ser VanN-Type Transferable Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 4606–4612 (2011)
53. Leclercq R.: Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 224–231 (2009)
54. Levine DP.: Vancomycin: a history. *Clin. Infect. Dis.* **42**, S5–12 (2006)
55. Lindsay J.A.: Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 98–103 (2010)
56. Mainardi J.L., Villet R., Bugg T.D., Mayer C., Arthur M.: Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 386–408 (2008)
57. McAleese F., Wu S.W., Sieradzki K., Dunman P., Murphy E., Projan S., Tomasz A.: Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate *S. aureus*-type resistance to vancomycin. *J. Bacteriol.* **88**, 1120–1133 (2006)
58. Mcguire J.M., Wolfe R.N., Ziegler D.W.: Vancomycin, a new antibiotic. II. *In vitro* antibacterial studies. *Antibiot. Annu.* **3**, 612–618 (1955)
59. Meziane-Cherif D., Saul F.A., Moubareck C., Weber P., Haouz A., Courvalin P., Périchon B.: Molecular Basis of Vancomycin Dependence in VanA-Type *Staphylococcus aureus* VRSA-9. *J. Bacteriol.* **192**, 5465–5471 (2010)
60. Mirani Z.A., Jamil N.: Effect of vancomycin on the cytoplasmic membrane fatty acid profile of vancomycin-resistant and -susceptible isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Chemother.* **19**, 24–33 (2013)
61. Mirani Z.A., Jamil N.: Genomic Organization of a Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Coll. Physicians Surg. Pak.* **23**, 107–111 (2013)
62. Młynarczyk A., Młynarczyk B., Kmera-Muszynska M., Majewski S., Młynarczyk G.: Mechanisms of the resistance and tolerance to beta-lactam and glycopeptide antibiotics in pathogenic Gram-positive cocci. *Mini-Rev. Med. Chem.* **9**, 1527–1537 (2009)
63. Młynarczyk A., Młynarczyk G., Łuczak M.: Conjugative transfer of glycopeptide and macrolide resistant genes among enterococci and from *Enterococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **54**, 21–28 (2002)
64. Młynarczyk B., Młynarczyk A., Kmera-Muszynska M., Majewski S., Młynarczyk G.: Mechanisms of resistance to antimicrobial drugs in pathogenic Gram-positive cocci. *Mini-Rev. Med. Chem.* **10**, 928–937 (2010)
65. Młynarczyk G., Grzybowska W., Młynarczyk A., Tyski S., Kawecki D., Łuczak M., Chmura A., Rowiński W.: Significant increase in the isolation of glycopeptide-resistant enterococci from patients hospitalized in the transplant surgery ward in 2004–2005. *Transplant. Proc.* **39**, 2883–2885 (2007)
66. Młynarczyk G., Młynarczyk A., Zabicka D., Jeljaszewicz J.: Lyso-genic conversion as a factor influencing the vancomycin tolerance phenomenon in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 136–137 (1997)
67. Młynarczyk G., Rosdahl V.T., Skov R., Młynarczyk A.: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Warsaw hospital. *J. Hosp. Infect.* **34**, 151–160 (1996)
68. Moellering R.C. Jr.: Vancomycin: A 50-year reassessment. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 3–4 (2006)

69. Naas T., Fortineau N., Snanoudj R., Spicq C., Durrbach A., Nordmann P.: First nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* expressing a VanD-like phenotype associated with a *vanA* genotype. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3642–3649 (2005)
70. Noble W.C., Virani Z., Cree R.G.: Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**, 195–198 (1992)
71. Ohta T., Hayashi H. i wsp.: Nucleotide substitutions in *Staphylococcus aureus* strains, Mu50, Mu3, and N315. *DNA Res.* **11**, 51–56 (2004)
72. Parenti F., Schito G.C., Courvalin P.: Teicoplanin chemistry and microbiology. *J. Chemother.* **12**, 5–14 (2000)
73. Passalacqua K.D., Satola S.W., Crispell E.K., Read T.D.: A mutation in the PP2C phosphatase gene in a *Staphylococcus aureus* USA300 clinical isolate with reduced susceptibility to vancomycin and daptomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 5212–5223 (2012)
74. Périchon B., Courvalin P.: *Staphylococcus aureus* VRSA-11B is a constitutive vancomycin-resistant mutant of vancomycin-dependent VRSA-11A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 4693–4696 (2012)
75. Périchon B., Courvalin P.: VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4580–4587 (2009)
76. Reynolds P.E., Depardieu F., Dutka-Malen S., Arthur M., Courvalin P.: Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol. Microbiol.* **13**, 1065–1070 (1994)
77. Roper D.I., Huyton T., Vagin A., Dodson G.: The molecular basis of vancomycin resistance in clinically relevant enterococci: crystal structure of D-alanyl-D-lactate ligase (VanA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8921–8925 (2000)
78. Saha B., Singh A.K., Ghosh A., Bal M.: Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *J. Med. Microbiol.* **57**, 72–79 (2008)
79. Scheffers D.J., Pinho M.G.: Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 585–607 (2005)
80. Severin A., Tabei K., Tenover F., Chung M., Clarke N., Tomasz A.: High level oxacillin and vancomycin resistance and altered cell wall composition in *Staphylococcus aureus* carrying the staphylococcal *mecA* and the enterococcal *vanA* gene complex. *J. Biol. Chem.* **279**, 3398–3407 (2004)
81. Sieradzki K., Leski T., Dick J., Borio L., Tomasz A.: Evolution of a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain *in vivo*: multiple changes in the antibiotic resistance phenotypes of a single lineage of methicillin-resistant *S. aureus* under the impact of antibiotics administered for chemotherapy. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1687–1693 (2003)
82. Sieradzki K., Pinho M.G., Tomasz A.: Inactivated *pbp4* in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **274**, 18942–18946 (1999)
83. Sieradzki K., Tomasz A.: Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **185**, 7103–7110 (2003)
84. Sieradzki K., Tomasz A.: Inhibition of the autolytic system by vancomycin causes mimicry of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*-type resistance, cell concentration dependence of the MIC, and antibiotic tolerance in vancomycin-susceptible *S. aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 527–533 (2006)
85. Sievert D.M., Rudrik J.T., Patel J.B., McDonald L.C., Wilkins M.J., Hageman J.C.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 668–674 (2008)
86. Sujatha S., Prahara J.: Glycopeptide Resistance in Gram-Positive Cocci: A Review. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2012**, 781679 (2012)
87. Sung K., Khan S.A., Nawaz M.S.: Genetic diversity of Tn1546-like elements in clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **31**, 549–554 (2008)
88. Szymanek K., Młynarczyk A., Młynarczyk G.: Systemy regulacyjne ekspresji genów u *Staphylococcus aureus*. *Post. Mikrobiol.* **48**, 7–22 (2009)
89. Tenover F.C., Bozdogan B. i wsp.: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**, 275–280 (2004)
90. Teo J.W.P., Krishnan P., Jureen R., Lin R.T.P.: Detection of an Unusual *van* Genotype in a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Hospital Isolate. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 4297–4298 (2011)
91. Tiwari H.K., Sen M.R.: Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect. Dis.* **26**, 156 (2006)
92. Uttley A.H.C., Collins C.H., Naidoo J., George R.C.: Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*, **1**, 57–58 (1988)
93. Veiga H., Pinho M.G.: Inactivation of the *SauI* type I restriction-modification system is not sufficient to generate *Staphylococcus aureus* strains capable of efficiently accepting foreign DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3034–3038 (2009)
94. Vollmer W., Joris B., Charlier P., Foster S.: Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 259–286 (2008)
95. Waldron D.E., Lindsay J.A.: *SauI*: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. *J. Bacteriol.* **188**, 5578–5585 (2006)
96. Weigel L.M., Clewell D.B., Gill S.R., Clark N.C., McDougal L.K., Flannagan S.E., Kolonay J.F., Shetty J., Killgore G.E., Tenover F.C.: Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*, **302**, 1569–1571 (2003)
97. Weigel L.M., Patel J.B. i wsp.: High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 231–238 (2007)
98. Wright G.D., Molinas C., Arthur M., Courvalin P., Walsh C.T.: Characterization of *vanY*, a DD-carboxypeptidase from vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* BM4147. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1514–1518 (1992)
99. Xu X., Wang M. i wsp.: *vanM*, a New Glycopeptide Resistance Gene Cluster Found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4643–4647 (2010)
100. Zhu W., Clark N., Patel J.B.: pSK41-like plasmid is necessary for Inc18-like *vanA* plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus* *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 212–219 (2013)

Jacek Kozdrój<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja, al. Mickiewicza 24/28, 30-052 Kraków

Wpłynęło w lutym 2013 r.

1. Wstęp. 2. Problemy z poznaniem mikrobiomu oraz próby ich przewycięzania. 3. Metagenomika a specyficzny charakter gleby. 4. Analiza genetyczna mikrobiomu. 5. Analiza funkcjonalna metagenomu. 6. Strukturalna różnorodność mikroorganizmów w różnych środowiskach glebowych. 7. Podsumowanie

#### Metagenome – a new source of information about soil microorganisms

**Abstract:** Soil environment, due to its high heterogeneity, is considered as a major reservoir of microbial genetic and metabolic diversity in the biosphere. The knowledge on this diversity is limited, because most of the soil microorganisms cannot be cultured under the usual laboratory conditions. During the last two decades, development of methods to isolate nucleic acids from soil has opened a window to a previously unknown microbial world. In consequence, a new metagenomic approach based on the analyses of total microbial DNA has appeared in soil studies. Total microbial DNA extracted from soil by direct or indirect methods is mostly used for amplification of marker genes (e.g. SSU rRNA) which is further differentiated by fingerprinting (e.g. DGGE, T-RFLP) or sequenced directly. Until recently, sequencing was mainly performed after first cloning PCR products to produce a clone library of amplicons. Lately, another approach has been introduced to reduce costs and labour; it is commonly known as 454-pyrosequencing, the method that does not require cloning. These methods as well as DNA microarrays have demonstrated an unanticipated level of microbial diversity, especially in the newly discovered world of the biosphere. Thousands or even several hundred thousands of different bacterial phylotypes can be present in a gram of soil. They belong to dozens of phyla. The molecular approach changed the picture of structural diversity of soil microbiome, also indicating that bacteria, archaea, fungi and even viruses are diverse both globally and locally. Moreover, soil metagenomics, allows for a comprehensive search for gene expression and metabolic activity within microbiome.

1. Introduction. 2. Difficulties with microbiome analysis and attempts to overcome them. 3. Metagenomics vs. distinct features of soil. 4. Genetic analysis of microbiome. 5. Functional analysis of microbiome. 6. Microbial structural diversity in different soil environments. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** bioróżnorodność, metagenomika, mikrobiom glebowy  
**Key words:** biodiversity, metagenomics, soil microbiome

## 1. Wstęp

Mikroorganizmy stanowią najbardziej istotną a jednocześnie zróżnicowaną grupę organizmów wchodzących w skład biosfery ziemskiej [93]. Większość bioróżnorodności, spotykana w obrębie trzech domen: bakterii, archeonów oraz eukariotów, jest reprezentowana przez mikroorganizmy [97], które szeroko rozprzestrzeniły się we wszystkich typach środowisk, nawet tych ekstremalnych, w ciągu blisko czterech miliardów lat swojej ewolucji. Tak długi czas umożliwił wykształcenie się najróżnorodniejszych mechanizmów metabolicznych, które pozwoliły im zaadaptować się do prawie każdej możliwej niszy ekologicznej i wykorzystać do swego rozwoju różnorodne warunki środowiskowe [59].

Środowisko glebowe jest uważane za najbogatszy rezerwuar różnorodnych mikroorganizmów [90], co nie jest trudne do zaakceptowania, zważywszy na wysoce heterogeniczny charakter warunków fizykochemicznych panujących w tym środowisku, a także uwzględniając zróżnicowanie typów gleb powstałych na Ziemi. Jedno-

ześnie, specyficzny charakter gleby powoduje, że jest ona traktowana jak swego rodzaju „czarna skrzynka”: pod względem składu mikrobiomu, aktywności i procesów przeprowadzanych przez występujące w niej mikroorganizmy. Nie jest pozbawiona racji myśl sformułowana przez Leonarda da Vinci już w 1510 roku, że być może więcej wiemy o ruchach ciał astralnych, aniżeli o tym, co dzieje się w ziemi pod naszymi stopami. Kilka wieków później również sceptyczny był Selman Waksman, który w 1925 roku stwierdził, że: „brak jest stosownych metod w badaniach mikrobiologicznych gleby, a te z metod stosowanych obecnie są dalekie od tego, aby w adekwatny sposób dać nam wiedzę o tym, co rzeczywiście dzieje się w glebie” [46]. Co ciekawe, ten sam mikrobiolog w 1931 roku sformułował przeciwną opinię, że: „zgromadzona już olbrzymia baza informacji pozwala przedstawić jasny obraz mikroskopowej populacji mikroorganizmów glebowych” [32]. Tak diametralnie odmienne opinie mogą budzić zdziwienie i pytanie o stabilność naukowych kryteriów badań mikrobiologicznych. Zgodnie z ustaleniem przyjętym

\* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja, al. Mickiewicza 24/28, 30-052 Kraków; tel.: 12 662 40 96; e-mail: j.kozdroj@ur.krakow.pl

w 1923 roku przez *Bergey's Manual*, podstawą identyfikacji nowego gatunku mikroorganizmu jest konieczność sklasyfikowania jego szeregu cech morfologicznych, biochemicznych, fizjologicznych i genetycznych po wcześniejszym jego wyhodowaniu na odpowiednim podłożu [32]. Jak wielkie stanowi to wyzwanie, niech świadczy fakt znajomości tylko ponad 9000 gatunków bakterii, wobec potencjalnych  $10^3$ – $10^7$  różnych drobnoustrojów występujących w gramie gleby [27]. Ta rozbieżność między liczbą mikroorganizmów dających się wyhodować, a tymi, o istnieniu których świadczą wyniki analiz mikroskopowych i molekularnych, jest powodem ustawicznej frustracji mikrobiologów.

## 2. Problemy z poznaniem mikrobiomu oraz próby ich przezwyciężenia

Przez blisko sto lat rozwoju mikrobiologii zdobywana wiedza o świecie mikroorganizmów dotyczyła tych, które hodowano na różnych podłożach. Podstawowe właściwości poszczególnych gatunków (szczepów) tych organizmów określano w oparciu o wyselekcjonowane monokultury wyrosłe na podłożu hodowlanym. To podejście, będące konsekwencją postulatów K o c h a w badaniach nad drobnoustrojami chorobotwórczymi, zaważyło na bagatelizowaniu faktu obecności w środowisku form żywych, których nie można było wyhodować. Dominujący model badawczy w mikrobiologii kazał traktować je jako artefakty, a nie jako istotną grupę poszerzającą spektrum różnorodności mikroorganizmów, jak postulowali będący w mniejszości zwolennicy istnienia tych organizmów. Swoiste przesilenie, zmieniające utarte poglądy w mikrobiologii, nastąpiło w połowie lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku, kiedy oficjalnie potwierdzono istnienie wyraźnej rozbieżności między liczebnością mikroorganizmów określoną na podłożu hodowlanym oraz w preparacie mikroskopowym, zwaną wielką anomalią liczenia metodą płytkową [78]. Jak się okazało, jedynie 0,1 do 1% bakterii glebowych może wyrosnąć na tradycyjnych podłożach hodowlanych w standardowych warunkach laboratoryjnych [44, 84]. Innymi słowy, ponad 99% różnorodnych bakterii w gramie gleby jest poza zasięgiem poznawczym i kryje w sobie rzeszę organizmów o być może istotnym znaczeniu dla funkcjonowania ekosystemu.

Wśród tego typu mikroorganizmów można wyróżnić grupę, którą da się wyhodować na specyficznych podłożach, spełniających wymogi żywieniowe organizmów, i umożliwiającą im wzrost w odpowiednich warunkach fizycznych i chemicznych. Drugą grupę natomiast stanowią mikroorganizmy, których stan fizjologiczny stanowi przeszkodę dla wzrostu na jakimkolwiek podłożu hodowlanym i dlatego są znane tylko w postaci sekwencji nukleotydowych rRNA (ryboty-

pów), jak np. WS3, OP11, OD1 lub BRC-1. Tutaj należą też powszechne w glebie mikroorganizmy, występujące w stadium spoczynkowym o ograniczonej aktywności komponentów komórkowych warunkujących wzrost – w przypadku bakterii są to formy drobne (ultra mikrobakterie). Te drzemiące formy drobnoustrojów w sprzyjających warunkach podlegają wybudzeniu, a więc teoretycznie mogą być też wyhodowane na odpowiednim podłożu. Jednakże są też takie mikroorganizmy glebowe widoczne pod mikroskopem, które można określić jako trwale niezdolne do wzrostu (nonviable) o nieodwracalnych zmianach komórkowych, lub będące w fazie zamierania [52].

Manipulacje składem podłoża hodowlanego w kierunku obniżenia jego troficzności, dobór odpowiedniego pH i temperatury, wydłużanie czasu inkubacji, stosowanie polimerowego substratu wzrostowego (np. ksylanu) oraz żelowych mikrogranul do immobilizacji komórek izolowanych ze środowiska przed umieszczeniem ich w podłożu hodowlanym, pozwalają znacząco poszerzyć spektrum możliwych do wyhodowania mikroorganizmów glebowych [10, 40, 41, 101]. Wolno rosnące bakterie glebowe z typów: *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria* (podklasa *Rubrobacteridae*), *Planctomycetes*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* oraz *Proteobacteria*, niewykrywalne według tradycyjnej procedury, mogą być dostrzeżone w postaci mini kolonii (25–200  $\mu\text{m}$ ) po 12 tygodniowej hodowli na podłożu zawierającym ksylan jako substrat pokarmowy oraz gellan (polisacharyd produkowany przez *Pseudomonas elodea*) jako środek zestalający zamiast agaru [16]. Ten postęp w metodach hodowania pospolitych w glebie bakterii, wykrywanych jedynie na podstawie sekwencji nukleotydowej genu 16S rRNA, daje nadzieje na uzyskiwanie monokultur tych organizmów, które wymykały się spod tradycyjnej praktyki laboratoryjnej mikrobiologów. Dzięki temu możliwe jest ich pełne identyfikowanie do gatunku i bliższe poznanie ich właściwości fizjologicznych i potencjalnie zajmowanej niszy ekologicznej w glebie.

Przytłaczająca jest jednakże dysproporcja między liczbą mikroorganizmów możliwych do wyhodowania, a tymi reprezentowanymi tylko przez fragmenty genów kwasów rybonukleinowych małej podjednostki rybosomów (SSU rRNA), które *W o e s e i F o x* [96] zaproponowali jako chronometry ewolucyjne organizmów. To odkrycie dało podstawę do sformułowania paradygmatu biologicznego o podziale świata żywego na trzy domeny: *Bacteria*, *Archaea* oraz *Eucarya* [97]. *Norman P a c e* wraz ze współpracownikami, jako pierwszy wykorzystał markery komórkowe, geny 5S oraz 16S rRNA, do charakteryzowania różnorodności mikroorganizmów prokariotycznych w środowisku bez potrzeby ich hodowania [60, 77]. Początkowo taka procedura wymagała bezpośredniego sekwencjonowania RNA lub jego odwrotnych transkryptów w postaci



kopii DNA (cDNA), co było technicznie kłopotliwe. Znaczący postęp dokonał się wraz z rozwojem technologii PCR i skonstruowaniem starterów, umożliwiających amplifikację prawie kompletnego genu rRNA [29]. To zintensyfikowało wykrywanie coraz to nowych taksonów wraz z badaniem różnych biotopów ziemskich przy użyciu tej nowej techniki [3, 32, 72]. Gromadzone sekwencje nukleotydowe SSU rRNA w bazie Ribosomal Database Project (RDP) początkowo w liczbie kilkuset pozycji, szybko uległy zwielokrotnieniu do 10 tysięcy w roku 1998, 72 626 w 2003, czy 2 639 157 w grudniu 2012 (RDP-10.31). W tej ostatniej wersji bazy RDP bakterie są reprezentowane przez 1 186 838 sekwencji nukleotydowych, natomiast archeony obejmują jedynie 22 615 pozycji. Wśród sklasyfikowanych sekwencji dominują *Firmicutes* (407 377), *Proteobacteria* (322 871), *Actinobacteria* (176 308) oraz *Bacteroidetes* (135 261).

Rozmiar dysproporcji, między światem mikroorganizmów potencjalnie istniejących, a tymi, które da się wyhodować, został uwidoczniiony po zastosowaniu metody pomiaru tempa reasocjacji jednoniciowego DNA, powstałego po denaturacji całkowitego DNA w wysokiej temperaturze, wyekstrahowanego z mikroorganizmów glebowych [83]. Okazało się, że w gramie różnych gleb może występować od 1000 do 40 000 genomów mikroorganizmów, co przekracza przeszło 200-krotnie liczbę organizmów otrzymanych w hodowli [46]. Dalsze postępy w analizie reasocjowanego DNA pozwoliły oszacować różnorodność mikroorganizmów prokariotycznych w gramie gleby na poziomie od 500 tysięcy do 10 milionów genomów [27]. W tym oceanie różnych genomów identyfikacja do konkretnych taksonów jest wysoce utrudniona. Jediną pomocą są bazy sekwencji nukleotydowych genów SSU rRNA i opracowywane na ich podstawie znakowane sondy filogenetyczne, które umożliwiają także ilościowe oznaczenia występowania różnych taksonów (gatunków), analizując bezpośrednio próbkę pobraną ze środowiska za pomocą metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* [28].

Pomimo znaczącego postępu w badaniach mikroorganizmów, oraz aby uniknąć konsekwencji jedynie katalogowania różnorodnych sekwencji nukleotydowych genów SSU rRNA znajdujących w środowisku, mikrobiolodzy podjęli się opracowania metod, umożliwiających poznanie genetyki, fizjologii i ekologii drobnoustrojów nie poddających się hodowli.

### 3. Metagenomika a specyficzny charakter gleby

Pełna charakterystyka organizmów wymaga poznania sekwencji nukleotydowych ich genomów. Obecnie w pełni znanych jest 2809 genomów wirusów, 2096 genomów bakterii, 153 genomów archeonów oraz 37 genomów eukariotów (wg IMG/M, Integrated Microbial

Genomes with Microbiome Samples). Liczba ta jest znikoma, aby wykorzystać ją, jako podstawę do analizy różnorodności mikroorganizmów w próbce środowiskowej, w oparciu o poszukiwanie sekwencji DNA odpowiadających znanym genomom. W dodatku taka procedura byłaby bardzo żmudna, kosztowna, i co najważniejsze, w niewielkim stopniu uzupełniałaby tradycyjną analizę mikrobiologiczną. Sytuacja zmienia się, jeśli zamiast sekwencjonowania poszczególnych genomów, analizie podda się zbiorczo cały DNA izolowany z próbki środowiskowej, reprezentujący wszystkie mikroorganizmy.

Ideę analizy zbioru podobnych, ale nie identycznych jednostek (genomów), stanowiących razem metagenom, wprowadziła, pod postacią metagenomiki, H a n d e l s - m a n i wsp. [33], jako sposób na poznanie nieznanymi mikroorganizmów glebowych i ich zdolności syntezy nowych produktów (np. antybiotyków). Klasyczna analiza metagenomiczna jest oparta na: izolacji DNA z próbki środowiskowej, klonowaniu fragmentów DNA w odpowiednim wektorze, transformowaniu otrzymanych rekombinantów do stosownego gospodarza bakteryjnego, a następnie analizy przesiewowej uzyskanych transformantów bakterii. Skonstruowana w ten sposób biblioteka klonów DNA jest dalej analizowana pod kątem zawartości sekwencji nukleotydowych różnych genomów, wykorzystując filogenetyczne markery (najczęściej gen 16S rRNA), lub ekspresji funkcjonalnych genów kodujących różne enzymy (np. lipazy, amylazy czy proteazy), genów odpowiedzialnych za biosyntezę nowych antybiotyków (np. turbomycyny A i B), albo też DNA klonów poddawane jest losowemu sekwencjonowaniu [32, 14]. Pionierskie prace, oparte na idei klonowania środowiskowego DNA sformułowanej przez P a c e i wsp. [60], dotyczyły: (a) analizy społeczności pikoplanktonu morskiego przy użyciu wektora fagowego [72]; (b) konstrukcji pierwszej biblioteki metagenomowej konsorcjum mikroorganizmów, w tym o aktywności celulolitycznej, namnożonych na wysuszonej trawie w laboratorium [35]; (c) konstrukcji pierwszej biblioteki otrzymanej bezpośrednio ze społeczności prokariotów morskich, i stwierdzenia w genomach przedstawicieli *Gamma-proteobacteria* obecności genu kodującego bakteriorodopsynę, wcześniej znanego tylko u archeonów [79].

Gleba stanowi szczególne wyzwanie dla analizy metagenomicznej. Jest to związane z jej budową strukturalną, składem chemicznym i niejednorodnym rozmieszczeniem mikroorganizmów, zależnym z kolei od tych pierwszych czynników. Różnie rozwinięta, w zależności od typu gleby, struktura agregatowa oparta na składnikach mineralno-organicznych stanowi skomplikowaną mozaikę mikrobiotopów o zmiennych czasowo i przestrzennie warunkach fizykochemicznych. W tych mikrobiotopach, o rozmiarach od 2 do 20  $\mu\text{m}$  lub mniejszych niż 2  $\mu\text{m}$ , drobnoustroje występują na powierzchni cząstek piasku lub kompleksów iłowo-organicznych, silnie do

nich przylegając w postaci mikrokolonii lub zasiedlają mieszczące się w nich mikropory, preferując te o średnicy 2  $\mu\text{m}$ . Łączna powierzchnia, jaką zajmują mikroorganizmy, jest znikoma i stanowi jedynie od tysięcznych do milionowych części procenta ogółu dostępnej powierzchni, biorąc pod uwagę fakt, że powierzchnia frakcji ilastej może zajmować do  $10^3 \text{ m}^2$  w gramie gleby [52]. Mikroagregaty, połączone egzopolisacharydami produkowanymi przez drobnoustroje, a także strzępkami grzybów, tworzą makroagregaty, wewnątrz i między którymi występują makropory o średnicy powyżej 6  $\mu\text{m}$ . Środowiskiem wyraźnie stabilniejszym dla mikroorganizmów pod względem: zasobności w wodę, zawartości pokarmu, zaadsorbowanych makrocząstek (białka, DNA) i toksycznych gazów ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ), a także zagrożeń ze strony drapieżnych pierwotniaków, wazonkowców, skoczogonków lub roztoczy, są mikroagregaty. Dlatego też strukturalna różnorodność drobnoustrojów, czyli mozaika różnych populacji składających się na daną społeczność, jest znacząco odmienna w mikro i makroagregatach glebowych [51].

Przy badaniu tak złożonego środowiska pojawia się problem, jaką strategię poboru próbek, jeżeli chodzi o analizowany obszar, ich liczbę oraz wielkość, zastosować, aby uzyskać reprezentatywny dostęp do jak największej liczby mikroorganizmów występujących w danej glebie. Niedocenianie tego problemu, zwłaszcza w przypadku stosowania metod molekularnych w odniesieniu do bezpośrednich ekstraktów DNA/RNA, może skutkować zafałszowanym obrazem strukturalnej różnorodności i aktywności metabolicznej mikrobiomu. Analizy mikrobiologiczne gleby muszą uwzględniać zmienność bioróżnorodności w czasie [95] mierzony w skali wieloletniej, rocznej (efekt pór roku), dziennej czy nawet godzinowej (pora dnia). Drugim faktem, który należy uwzględnić, jest zmienność bioróżnorodności w przestrzeni w skali jednego pola lub większej (regionu, kontynentu), gdzie duże znaczenie mają zmieniające się warunki edaficzne, głównie pH [5, 51, 70]. Ta zmienność implikuje dokonywanie losowego poboru wielu próbek (5–10), na obszarze kilkudziesięciu metrów kwadratowych danego pola (terenu), które mogą być analizowane osobno lub razem po zmieszaniu. W tym ostatnim przypadku obserwuje się mniejszą zmienność warunków fizycznych gleby oraz strukturalnej różnorodności mikrobiomu [2]. Przy porównywaniu różnorodności mikroorganizmów, występujących w różnych miejscach, musi być uwzględniony stopień zmienności tej różnorodności w obrębie pojedynczego miejsca, a więc bardzo ważna jest liczba wykonanych powtórzeń [64]. Pojedyncze próbki, dające reprezentatywny obraz mikrobiomu glebowego, mają minimalną wielkość między 0,125 a 0,250 g [43, 65], jakkolwiek niekiedy lepiej jest zastosować większe 10-g próbki zamiast 1-g lub 0,1-g, aby zmniejszyć stopień zmienności struk-

tury społeczności mikroorganizmów obserwowany między próbkami [57]. Znalezienie złotego środka w tym przypadku opiera się na: rodzaju badanych populacji mikroorganizmów – dominujące lub rzadkie (tu lepiej zastosować większe próbki), a także samej glebie – efektywność ekstrakcji DNA zmienia się w zależności od typu gleby [51]. W mikroskali glebowej drobnoustroje charakteryzują się wybitnie nierównomiernym rozmieszczeniem między makro i mikroagregatami [54]. Wiele rzadkich populacji może być przeoczonych, jeśli badania nie będą prowadzone na poziomie tych agregatów, z uwagi na maskujący efekt dominujących populacji widoczny podczas analizy w makroskali tradycyjnych próbek glebowych [43].

Wysoce heterogeniczny charakter gleby, pod względem struktury oraz rozmieszczenia mikroorganizmów, stanowi olbrzymie utrudnienie dla efektywnej ekstrakcji DNA lub RNA metagenomu glebowego. Zagadnienie to zostało szerzej opisane we wcześniejszej pracy przeglądowej [45]. Najogólniej, kwasy nukleinowe ekstrahuje się z gleby, stosując podejście bezpośrednie lub pośrednie, kiedy DNA lub RNA izoluje się z wcześniej wyodrębnionej frakcji komórkowej drobnoustrojów glebowych. Otrzymany metagenomowy DNA oczywiście nie jest jednakowy pod względem ilościowym, i co ważniejsze, jakościowym (czystość preparatu, stopień pofragmentowania cząsteczki – a więc liczba i wielkość fragmentów DNA). Bezpośrednia ekstrakcja daje od 10 do 100 razy więcej DNA, który może być bardziej zanieczyszczony związkami humusowymi, zewnątrzkomórkowym DNA oraz silniej pofragmentowany na krótsze odcinki (0,5–20 kbp), niż w przypadku izolacji DNA z frakcji komórkowej (10–50 kbp, a nawet 150–1000 kbp). Ta procedura jest jednakże najczęściej stosowana w analizie metagenomu glebowego, chociaż rzadko można uzyskać więcej niż 60% ogólnej puli DNA mikroorganizmów obecnych w danej glebie, który jeszcze nawet w 30% może być tracony podczas etapów oczyszczania [51]. Niekiedy korzystniejsze bywa stosowanie procedury pośredniej ekstrakcji DNA, ale i w tym przypadku należy liczyć się z tym, że trudno jest uzyskać więcej niż 20–50% bakteryjnego DNA, z uwagi na silną adsorpcję komórek do cząstek glebowych [67]. Szereg specyficznych przeszkód charakterystycznych dla każdej ze strategii izolacji metagenomowego DNA powoduje, że uzyskiwany obraz różnorodności mikrobiomu glebowego jest mimo wszystko fragmentaryczny i zależy w dużej mierze od rodzaju mikroorganizmów i ich podatności na lizę, rozmieszczenia oraz stopnia dostępności komórek i uwolnionego DNA w strukturze gleby. W takiej sytuacji, pewnym rozwiązaniem, umożliwiającym uzyskanie w miarę wiarygodnego obrazu bioróżnorodności, może być przeprowadzenie sukcesywnego kilkakrotnego ekstrahowania DNA lub izolowania komórek z tej samej próbki glebowej [23].

#### 4. Analiza genetyczna mikrobiomu

Różnorodność mikroorganizmów w glebie może być rozpatrywana pod kątem ogólnej oceny struktury mikrobiomu i porównania między różnymi próbkami, lub też może dotyczyć dogłębnej identyfikacji składu społeczności drobnoustrojów zasiedlającej daną glebę. W związku z tym należy zastosować różne strategie do sporządzania próbek oraz ekstrakcji DNA, jak wyżej opisano. Co więcej, odmienny charakter będzie też mieć analiza metagenomiczna w obu przypadkach. Jeśli celem jest poznanie ogólnej struktury społeczności mikroorganizmów i ewentualnych zachodzących w niej zmian, wystarczające jest wykorzystanie znanych metod „fingerprintowych”, jak np. DGGE/TGGE czy T-RFLP [46]. Ponieważ większość z tych metod opiera się na wcześniejszej amplifikacji filogenetycznych markerów przez PCR, należy być świadomym pewnych problemów specyficznych dla reakcji PCR. Przykładem istotnego problemu jest preferencyjne amplifikowanie fragmentów genowych, pochodzących od populacji będących w mniejszości, jeśli takie fragmenty charakteryzują się ponad przeciętną efektywnością przyłączania starterów i polimerazy DNA [91]. W konsekwencji otrzymane profile DNA nie będą rzetelnie odzwierciedlać składu analizowanego mikrobiomu. Charakterystyczną cechą metod „fingerprintowych” jest także to, że przedstawiony przez nie obraz mikrobiomu obejmuje ograniczoną liczbę dominujących populacji. Te populacje mogą być identyfikowane poprzez klonowanie, a następnie sekwencjonowanie poszczególnych fragmentów DNA pochodzących od różnych mikroorganizmów. Nowa generacja metod „fingerprintowych” umożliwiła identyfikację bakterii i archeonów glebowych w oparciu o mikromacierze genowe, które zawierają od 500 000 do 110 000 025-merowych sond oligonukleotydowych hybrydujących z metagenomowymi fragmentami genów SSU rRNA po ich amplifikacji PCR, lub bezpośrednio z rRNA, albo dwuniciowym komplementarnym DNA (dscDNA). Daje to możliwość wykrycia od około 9 000 (PhyloChip G2) do ponad 50 000 (PhyloChip G3) OTU (operational taxonomic unit) drobnoustrojów potencjalnie obecnych w metagenomie glebowym [1, 11, 17, 74].

Szczegółowe poznanie składu mikrobiomu glebowego wymaga zastosowania innego podejścia analitycznego w stosunku do wyekstrahowanego z gleby metagenomowego DNA. Jednym ze sposobów, jednocześnie najczęściej stosowanym, jest wykorzystanie filogenetycznego markera w postaci genu SSU rRNA (16S u prokariotów lub 18S u eukariotów), który po amplifikacji PCR podlega klonowaniu celem otrzymania biblioteki reprezentującej wszystkie mikroorganizmy obecne w badanej glebie. Następnie poszczególne sklonowane fragmenty DNA są sekwencjonowane i poddawane bioinformatycznej analizie. Drugim sposobem, dzięki postępowi technologicznemu, jest analizowanie,

na podobnej zasadzie, losowych fragmentów DNA lub całych metagenomów. W tym przypadku pofragmentowany materiał genetyczny jest swoistą mieszaniną fragmentów DNA, w której szereg sekwencji nukleotydowych częściowo się pokrywa. W związku z tym, po sekwencjonowaniu wystarczającej liczby małych odcinków DNA istnieje możliwość odtworzenia dużych fragmentów DNA, wystarczających do identyfikacji taksonów, lub będących wręcz rekonstrukcją kompletnego genomu [99]. Oczywiście jest, że w tej procedurze będą wykrywane, w przeważającej mierze, najliczniej reprezentowane organizmy, dlatego tak ważne jest posługiwanie się większymi próbkami gleby w powtórzeniach, co jest często trudne do spełnienia, aby wychwycić także sekwencje DNA pochodzące od rzadkich taksonów. Pewną pomocą jest przypadkowa natura sekwencjonowania typu „shotgun”, która zapewnia, że wiele tych organizmów jest reprezentowanych przynajmniej przez jakieś małe fragmenty sekwencji nukleotydowych.

Niezależnie od strategii zastosowanej do analizy metagenomu, w klasycznej postaci niezbędny etap klonowania może dotyczyć małych lub dużych fragmentów DNA, które też są wstawiane w różne wektory. Biblioteka małych wstawek dotyczy fragmentów DNA o wielkości do 20 kbp wprowadzonych do plazmidów, natomiast duże fragmenty o wielkości do 40 kbp wstawiane są do fosmidów lub kosmidów, a te o wielkości jeszcze większej, przekraczającej nawet 100 kbp, znajdują się w sztucznym chromosomie bakteryjnym BAC. Wspomniane wektory posiadają zalety i wady oraz różnią się przeznaczeniem (Tab. I), a ich użycie zależy od: jakości izolowanego glebowego DNA, wymagań odnośnie przeciętnej wielkości wstawek w bibliotece, wymagań w stosunku do liczby kopii wektora w komórce gospodarza, rodzaju samego gospodarza, oraz strategii użytej do przeszukiwania klonów [14]. Niemal wszystkie biblioteki klonów w początkowym etapie tworzenia, a także w celu przechowywania sekwencji DNA metagenomu, wykorzystują jako gospodarza bakterię *Escherichia coli*. W przypadku klonowania fragmentów DNA mikroorganizmów glebowych, zwłaszcza w celu późniejszej analizy funkcjonalnej genów, jako gospodarzy wybiera się występujące w glebie bakterie z rodzaju *Pseudomonas* lub *Streptomyces* [12, 92]. Komórki *E. coli* często nie mają odpowiedniej maszyny transkrypcyjno-translacyjnej (np. efektywne promotory, czynniki sigma czy białka regulatorowe), która umożliwiłaby ekspresję genów lub operonów pochodzących od członków mikrobiomu glebowego często różniących się znacznie zawartością zasad G + C w genomie oraz systemem wydzielniczym białek, co skutkuje niską ilością (niekiedy mniej niż 0,01%) uzyskanych pozytywnych klonów podczas jednej rundy przeszukiwania biblioteki [13, 30]. Konstruowane biblioteki metagenomu glebowego są z reguły bardzo obszernymi kolekcjami fragmentów

Tabela I  
Porównanie użyteczności wektorów niosących różne wstawki DNA w konstrukcji bibliotek metagenomowych

Małe wstawki DNA (plazmidy)	Duże wstawki DNA (fosmidy, kosmidy, BAC)
<p>Zalety</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Duża liczba kopii umożliwiająca wykrywanie genów o słabej ekspresji</li> <li>• Klonowanie pojedynczych genów lub małych operonów (np. geny enzymów lub antybiotykooporności)</li> <li>• Możliwa jest ekspresja genów spod promotora wektora</li> <li>• Możliwe jest klonowanie pofragmentowanego lub zanieczyszczonego DNA</li> <li>• Technicznie proste</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duże fragmenty DNA (nawet &gt; 100 kz) mogą zawierać całe operony dla funkcji metabolicznych (np. różnych biosyntezy, enzymów katabolicznych)</li> <li>• Mniejsza liczba klonów konieczna do przeszukiwania w celu wykrycia nosicieli genu(ów)</li> <li>• Modyfikowane BAC dają możliwość przełączania między zachowaniem w pojedynczej i wielu kopiach co przynosi korzyści dla ilości otrzymywanego DNA i poziomu ekspresji genów</li> <li>• Odpowiednie dla częściowej charakterystyki genomowej niehodowanych mikroorganizmów glebowych</li> </ul>
<p>Wady</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Małe fragmenty DNA (&lt; 20 kz) niosą ograniczoną informację genetyczną</li> <li>• Możliwa eliminacja części informacji filogenetycznej z uwagi na ekspresję toksycznych dla gospodarza genów</li> <li>• Konieczność selekcji właściwej procedury ekstrakcji DNA oraz klonowania dla uzyskania dużego udziału DNA pożądanym mikroorganizmów</li> <li>• Konieczność regulacji poziomu ekspresji klonowanych genów przez dobór wektorów z indukowalną kontrolą ekspresji genu wstawki lub liczby kopii plazmidu</li> <li>• Olbrzymia liczba klonów konieczna do przeszukiwania w celu znalezienia nosicieli genu</li> <li>• Niewłaściwe do badania aktywności oraz szlaków biochemicznych kodowanych przez większe ugrupowania genowe</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Małe fragmenty DNA metagenomu są tracone, a więc pewne taksony mogą być zbyt rzadko reprezentowane</li> <li>• Mała liczba kopii uniemożliwia wykrywanie genów o słabej ekspresji</li> <li>• Ograniczona ekspresja genów spod promotora wektora</li> <li>• Możliwa eliminacja części informacji filogenetycznej z uwagi na ekspresję toksycznych dla gospodarza genów, stąd konieczność zachowania pojedynczych kopii w bibliotece do momentu skryningu funkcji</li> <li>• Niezbędny wysoko-molekularny DNA o znacznej czystości do konstrukcji biblioteki</li> <li>• Technicznie trudne</li> </ul>

DNA. Oznaczając liczbę różnych genomów prokariotycznych obecnych w gramie gleby obliczono, że niezbędne jest w tym celu posłużenie się ponad  $10^7$  plazmidowych klonów, zawierających 15 kpz wstawki DNA, albo  $10^6$  klonów BAC, niosących wstawki o wielkości 100 kpz [33]. Te obliczenia są oparte na założeniu, że wszystkie gatunki są równocześnie reprezentowane, co w warunkach naturalnej gleby jest niespotykane. Co więcej, ażeby uzyskać rzeczywistą reprezentację genomów, uwzględniając także rzadko występujące (poniżej 1%), należałoby skonstruować biblioteki zawierające ponad 10 000 Gpz glebowego DNA, co odpowiadałoby  $10^{11}$  klonów BAC [66]. Zakładając poprawność tych obliczeń, genetyczna zawartość opublikowanych do tej pory bibliotek glebowych (często 100–200 Mpz, maksymalnie kilka Gpz, dla danej gleby) jest nikła, jeśli chodzi o pokrycie całego metagenomu glebowego [32, 76]. Ponadto, biblioteka BAC genów 16S rRNA, zawartych we fragmentach otrzymanych po trawieniu enzymem restrykcyjnym (np. *HindIII*) wysokomolekularnego DNA glebowego, może reprezentować odmienny skład populacji bakterii (mniejszy udział *Bacillus*, *Alphaproteobacteria*, grupy *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, *Gemmimonas*; brak *Chloroflexi* oraz Grupy Termitowej), aniżeli biblioteka klonów genów 16S rRNA otrzymanych z wyekstrahowanego DNA i poddanego bezpośrednio amplifikacji PCR (mniejszy udział *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Acidobacterium*, WS3; brak

OP10, *Planctomycetes* oraz *Actinomycetes*). Ten przykład z badań L i l e s i wsp. [50] jest wymownym świadectwem wpływu sposobu konstruowania biblioteki metagenomu na końcowy obraz strukturalnej różnorodności mikrobiomu w analizowanej glebie. W sumie, wiedza jaką dysponujemy obecnie obejmuje populacje dominujących mikroorganizmów. Fakt ten nie powinien dziwić, jeśli uświadomimy sobie ograniczenia metodyczne związane z ekstrakcją DNA z gleby, jego klonowaniem, a także minimalnym pokryciem metagenomu glebowego (przy wymaganym ponad 100, a nawet 1000 krotnie większym, aby uwzględnić rzadkie mikroorganizmy) zapewnionym przez konstruowane biblioteki. Dodatkowo należy pamiętać, że rzadkie mikroorganizmy nie będą reprezentowane w bibliotece bez zastosowania wcześniejszej procedury ich wzbogacania w glebie [42].

Zarówno małe, jak i duże wstawki DNA metagenomowego, zgromadzone w odpowiednich bibliotekach, od początku były sekwencjonowane, podobnie jak w przypadku analizy pojedynczych genomów, w oparciu o metodę Sangera opierającą się na włączaniu dideoksynukleotydów i syntezie komplementarnej nici DNA do jednoniciowej matrycy. W analizie sekwencyjnej genomów niezbędne było zastosowanie znaczników fluorescencyjnych dla nukleotydów i zautomatyzowanie procesu z wykorzystaniem 96 kanałowych kapilarnych sekwenatorów [4]. Dla przykładu, oparty na metodzie Sangera system 3730 xl firmy Applied Biosystems

umożliwia sekwencjonowanie w ciągu dnia od ponad 1000 do ponad 3800 próbek DNA o wielkości od 500 do ponad 800 pz, dając łączny odczyt sekwencji DNA od 1 do 2 Mz. Dalszy postęp przyniosło wprowadzenie do badań w 1996 roku sekwencjonowania nowej generacji, które jest ponad 50-krotnie wydajniejsze i zamiast metody dideoksy wykorzystuje technikę niezależną od elektroforezy, ani innego sposobu rozdzielania fragmentów DNA, a opartą na pirosekwencjonowaniu. W tej nowej metodzie komplementarna do matrycy nic DNA jest syntetyzowana bez udziału dideoksynukleotydów, a wstawianym przez polimerazę DNA nukleotydowi towarzyszy uwolnienie cząsteczki pirofosforanu i, w obecności sulfurylasy ATP oraz lucyferazy, dochodzi do emisji światła. Niewłączone nukleotydy i nadmiarowe ATP są usuwane przez apirazę, a sekwencja nukleotydów jest rejestrowana w postaci pirogramu, w którym poszczególne piki o różnej wielkości odpowiadają odpowiedniej ilości rejestrowanych sygnałów światła proporcjonalnych do liczby wstawianych w danym momencie nukleotydów. Ogromna ilość uzyskanej informacji, w postaci ponad 2 500 000 sekwencji DNA (powyżej 350 pz), przekracza łącznie miliard zasad na dzień, przy zdecydowanie mniejszych kosztach w porównaniu z sekwencjonowaniem kapilarnym [56].

Sekwencjonowanie nowej generacji opiera się obecnie na trzech konkurencyjnych systemach: 454 Life Sciences, Solexa/Illumina oraz SOLiD [56], które różnią się wielkością i ilością fragmentów DNA uzyskanych po sekwencjonowaniu, wydajnością syntezy na cykl oraz dzień (Tab. II). Ta odmiana sekwencjonowania nie wymaga wcześniejszego klonowania fragmentów DNA w wektorach, które też nie dla każdego z nich musi być skuteczne. Najnowsza wersja platformy Solexa/Illumina, oparta na sekwenatorze krótkich sekwencji SOLiD4, generuje DNA składający się z 50-z fragmentów o łącznej długości przeszło 100 Gpz, w ciągu jednego cyklu. Niemniej do analizy metagenomicznej najwygodniejsze jest stosowanie 454-pirosekwencjonowania, zwłaszcza nowszej platformy GS Titanium, która zapewnia syn-

tezę większych fragmentów DNA (400–700 pz) i ponad pięciokrotnie większą wydajność (400–600 Mpz), w stosunku do pierwszej wersji GS20. Dłuższe sekwencje ułatwiają dalszą analizę bioinformatyczną, ponieważ zapewniają poprawne poszukiwanie homologii za pomocą BLAST w bankach sekwencji DNA i składanie długich kontigów. W konsekwencji ułatwia to filogenetyczne powiązanie genów z ich macierzystymi organizmami oraz poprawia identyfikowanie gatunków z dostępnych fragmentów pochodzących z genu 16S rRNA [98].

Sekwencjonowanie metagenomu może dotyczyć całkowitego DNA wyizolowanego z gleby, i jest przeprowadzane według strategii typu „shotgun”, albo też jest przeprowadzane na frakcji tego DNA wzbogaconej przez PCR [7]. Pierwsza strategia prowadzi do uzyskania maksymalnej informacji o sekwencjach nukleotydowych członków społeczności mikroorganizmów i wszystkich funkcjonalnych genach obecnych w mikrobiomie. Ponieważ mikrobom niesie olbrzymią ilość informacji genetycznej, dostęp do niej wiąże się z koniecznością przeprowadzenia bardzo wielu sekwencjonowań, co jest kosztowne i wymaga znacznego zaangażowania mocy obliczeniowych oraz zaawansowanych metod bioinformatycznych. Jednakże nawet wtedy należy liczyć się z możliwością przeoczenia populacji rzadko reprezentowanych w społeczności mikroorganizmów. Wzbogacanie tylko części DNA przez PCR, najczęściej w postaci genów SSU rRNA, ale także innych konserwowanych ewolucyjnie (np. *recA*), wymaga: użycia mniejszych próbek źródłowych (wystarczy nawet ng DNA), mniejszej liczby sekwencjonowań w celu wykrycia również gatunków rzadkich oraz zastosowania prostszej analizy bioinformatycznej. Chociaż 454-pirosekwencjonowanie generuje długie sekwencje DNA, to jednak są one wyraźnie krótsze, niż np. gen 16S rRNA (1542 pz), co mogłoby budzić zastrzeżenia w kwestii przydatności tej metody do analizy filogenetycznej. Jednakże okazało się, że amplifikacja fragmentów obejmujących region V6 oraz V7 (V6 + V7) genu 16S rRNA przy użyciu uniwersalnych starterów pozwala na oszacowanie porównywalnego

Tabela II  
Porównanie wydajności sekwencjonowania techniką elektroforezy kapilarnej oraz trzech odmian sekwencjonowania nowej generacji

System	Wydajność (milion pz/dzień)	Wydajność (milion pz/cykl)	Wydajność (sekwencje/dzień)	Sekwencje (długość, pz)
Dideoksy 3730xl	1 – 2	0,8	8000	> 800
454 Titanium <sup>1</sup>	1000	450 – 700	1–2,5 × 10 <sup>6</sup>	600 – 1000
SOLiD <sup>2</sup>	7000 – 20000	90000 – 300000	> 1,3 × 10 <sup>8</sup>	50 – 75
Solexa/Illumina <sup>3</sup>	55000 – 106000	120000 – 600000	5,5 – 10 × 10 <sup>8</sup>	2 × 100 – 2 × 150

<sup>1</sup> Podane wartości dotyczą systemu GS FLX XL+ oraz GS FLX XLR70, których cykl pracy wynosi odpowiednio 23 lub 10 godz.;

<sup>2</sup> podane wartości dotyczą systemu 5500 oraz 5500xl;

<sup>3</sup> dostępne są cztery główne odmiany sekwenatorów. Podane wartości dotyczą typu HiSeq2500 pracującego w wariantach szybkim (cykl ok. 27 godz.) lub wysokiej wydajności (cykl ok. 11 dni)

bogactwa gatunków drobnoustrojów, jak w przypadku stosowania kompletnej sekwencji genu [100]. Również inne regiony zmienne genu 16S rRNA mogą być pomyślnie wykorzystywane do analizy metagenomicznej, a generowane podczas pirosekwencjonowania fragmenty genu określa się mianem pirotagów [18, 75]. Ponadto, pirotagi pochodzące z różnych próbek (np. gleb) mogą być równocześnie syntetyzowane i następnie rozpoznawane dzięki specyficznej konstrukcji starterów, które między odcinkami adaptorów A i B, niezbędnych dla procesu pirosekwencjonowania, a właściwymi regionami starterów, zawierają unikalne 5-z lub dłuższe odcinki kodowe charakterystyczne dla każdej próbki [7]. W ten sposób, nawet ponad 100 różnych próbek DNA amplifikowanych przez PCR może być sekwencjonowane podczas jednego cyklu w sekwenatorze 454 Titanium [31]. W większości badań kolekcja około 25 000–50 000 pirotagów jest wystarczająca dla adekwatnego zobrazowania strukturalnej różnorodności mikrobiomu [76].

Pirosekwencjonowanie metagenomu glebowego może generować setki tysięcy krótkich (300–800 z), jeśli porównać z metodą dideoksy, sekwencji DNA lub pirotagów podczas jednego cyklu, a ich końcowa liczba zależy od stopnia złożoności metagenomu. Taka olbrzymia ilość sekwencji nukleotydowych daje możliwość wychwycić także rzadkie populacje mikroorganizmów, przy założeniu, że każdy fragment DNA (pirotag) identyfikuje odpowiedniego członka mikrobiomu. Analiza złożonego metagenomu glebowego, w oparciu o tradycyjne sekwencjonowanie (kapilarna elektroforeza, CAE) ograniczonej liczby klonów, nie daje tej możliwości i skutkuje rozpoznaniem jedynie dominujących populacji, reprezentowanych przez odpowiednie filotypy wyróżnione na bazie ponad 1000 pełnych sekwencji genu 16S rRNA [20, 76]. Jednakże ta przewaga pirosekwencjonowania może być okupiona niebezpieczeństwem przeszacowania liczby OTU w postaci stwierdzenia ich nadmiernej lub zbyt małej liczby. Jak się okazało, pewne regiony zmienne (V1 + V2, V6) genu 16S rRNA dają podczas analizy przesadnie dużo OTU, inne wysoce zmienne regiony (V3, V7, V7 + V8) generują zbyt małą liczbę OTU, natomiast regiony V4, V5 + V6 oraz V6 + V7 są źródłem pirotagów pozwalających oszacować podobną liczbę OTU, jak w przypadku sekwencjonowania prawie kompletnego genu [100]. Aby uniknąć nadmiaru OTU, zwłaszcza wśród rzadkich populacji, przyjmuje się też 0,2% dla błędu pirosekwencjonowania oraz 97% podobieństwo sekwencji DNA, jako progowe wartości dla definiowania wiarygodnych OTU (filotypów) do gatunków i wyznaczania ich bogactwa w danym mikrobiomie [47]. Liczba stwierdzanych OTU rośnie wraz ze wzrostem złożoności metagenomu i ilością sekwencjonowanych fragmentów DNA, a zależność ta jest obrazowana w postaci krzywej rozgęszczenia filotypów, którą można wyznaczać przy poziomach

dystansu genetycznego 3%, 5% lub 20%, charakterystycznych odpowiednio dla gatunku, rodzaju lub typu mikroorganizmu. W bogatej w bakterie glebie stan nasycenia krzywej daje się zaobserwować tylko na poziomie typu, natomiast w przypadku niższych taksonów, nawet znaczna liczba sekwencji DNA otrzymanych przez pirosekwencjonowanie nie zapewnia pokrycia wszystkich organizmów zasiedlających glebę [55].

Oznaczenie liczby filotypów, wchodzących w skład mikrobiomu, i ich identyfikowanie na podstawie analizy sekwencji nukleotydowych sklonowanych w wektorach, wymaga stosunkowo prostej procedury bioinformatycznej. Bogate bazy sekwencji nukleotydowych genu 16S rRNA mogą być przeszukiwane za pomocą programu BLAST pod kątem największego podobieństwa w stosunku do badanych próbek. Olbrzymia ilość sekwencji DNA generowanych podczas pirosekwencjonowania wymaga o wiele większej obróbki surowych danych, wśród których sekwencje (pirotagi) o właściwej długości, stosownej do analizy filogenetycznej, muszą być wyselekcjonowane i pogrupowane przez tworzenie kontigów lub klastrów podobnych fragmentów DNA, celem redukcji liczby danych. Z reguły im dłuższe są sekwencje DNA, tym niosą bardziej przydatną informację do filogenetycznego lub taksonomicznego dopasowania przez porównanie ze znanymi sekwencjami DNA, choć platforma MG-RAST zadawała się nawet 75-z fragmentami [81]. Należy pamiętać, że liczba pirotagów powstających podczas jednego cyklu pracy sekwenatora stanowi poważne wyzwanie dla mocy obliczeniowych związanych z dopasowaniem sekwencji DNA i działaniem algorytmów konstrukcji drzew pokrewieństw. Znaczący procent sekwencji DNA z metagenomu glebowego nie znajduje istotnych homologów BLAST w dostępnych bibliotekach [62]. O możliwych rozmiarach tego procenta niech świadczy fakt, że nawet w przypadku kompletnie poznanych genomów czystych kultur bakteryjnych od 35 do 45% przewidzianych otwartych ramek odczytu (ORF) nie ma istotnych homologów w bazie sekwencji nukleotydowych GenBank [73]. Nie ma programu, który byłby w stanie obliczyć dopasowanie dla setek tysięcy pirotagów, co wymagałoby stworzenia matrycy odległości o pojemności przekraczającej terabajt. Stosując narzędzia relacyjnej bazy danych, można próbować sobie poradzić z tym problemem, ale i wtedy można dla przykładu dopasować maksymalnie 37 000 unikalnych sekwencji DNA spośród całości wynoszącej 725 000 pirotagów [76].

## 5. Analiza funkcjonalna metagenomu

Podczas analizy metagenomicznej, nie tylko chodzi o poznanie różnorodności mikroorganizmów tworzących mikrobiom glebowy, ale równie ważne jest poszu-

kiwanie funkcjonalnych genów, a więc dowodów na występowanie określonych aktywności metabolicznych wśród członków mikrobiomu. Biblioteki klonów, zawierające na wektorach małe bądź duże wstawki metagenomowego DNA, są przeszukiwane pod kątem ekspresji genu określonej nowej cechy fenotypowej w bakteryjnym gospodarzu (np. *E. coli*), który nie ma tej cechy zakodowanej w swoim genomie. Wymaga to zastosowania dokładnego przeszukiwania wszystkich klonów wyrosłych na podłożu różnicującym, i często można wykryć obecność badanej cechy u zaledwie kilku klonów na setki tysięcy czy kilka milionów analizowanych [42]. Sprawa jest łatwiejsza, jeśli poszukiwana cecha może być jednocześnie markerem selekcyjnym (np. oporność na antybiotyki czy metal ciężki), co pozwala otrzymać na podłożu selekcyjnym wzrost klonów niosących stosowne geny warunkujące metalooporność [53, 61]. Inny sposób polega na wykorzystaniu, jako gospodarzy, szczepów lub ich mutantów, które wymagają heterologicznej komplementacji ze strony genu pochodzącego z metagenomu, aby rosnąć na podłożu selekcyjnym. W tym przypadku obserwuje się jedynie wzrost zrekombinowanych klonów, które posiadają stosowny gen i wytwarzają aktywny produkt tego genu, np. dioksygenazę naftalenową czy racemazę lizyny [9, 58]. Interesującą metodą przeszukiwania

biblioteki klonów jest wzbudzanie ekspresji genu z metagenomu w klonach, które wyrastają na podłożu wzbogaconym w stosowny substrat dla enzymu kodowanego przez badany gen (operon). W ten sposób są wykrywane przykładowo geny: esterazy lub lipazy przez powstawanie przezroczystego halo wokół kolonii na podłożu wskaźnikowym, dioksygenazy ekstradiolowej przez wytwarzanie żółtego produktu oraz geny związane z rozkładem 4-hydroksymaślanu na podłożu z dodatkiem chlorku tetrazolowego [21, 32, 36, 37, 80].

Wspomniane metody przeszukiwania biblioteki klonalnej metagenomu są potężnym narzędziem służącym identyfikowaniu genów kodujących naturalne produkty lub odpowiedzialnych za określoną aktywność metaboliczną wśród wszystkich członków mikrobiomu, a nie tylko tych, którzy poddają się hodowli (Tab. III). Jednakże również tutaj pojawia się szereg ograniczeń, które są trudne do pokonania. Wykrywanie rekombinowanych klonów, w których wprowadzony gen (operon) ulega ekspresji, wybitnie zależy od jego skutecznej transkrypcji, translacji, składania białka oraz efektywnego wydzielania produktu przez komórkę bakteryjnego gospodarza. Dlatego coraz częściej *E. coli* jest zastępowana przez bakterie, które występują w glebie (np. *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium*,

Tabela III

Przykłady analizy funkcjonalnej bibliotek klonalnych metagenomów różnych gleb [14, 82, 89]

Gleba	Wektor	Klony	Wstawka (kz)	Metagenom (Gz)	Geny
Nieuprawna	BAC	12000	37	0,42	substancji antybakteryjnych (indyrubina i pokrewne)
Alkaliczna lessowa	plazmid	100000	8–12	1,0	proteaz
Gлина piaszczysto-ilasta	fosmid	100000	30–40	3,5	syntazy poliketydowej
Leśna	fosmid	33700	35	1,18	lipaz
Gлина pylasta	plazmid	200000 58000 250000 650000	4,1 2,7 3,5 3,5	4,2	antybiotykooporności <sup>1</sup> (Km <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , Am <sup>r</sup> , Bs <sup>r</sup> , Tm <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> )
Łąkowa Pole buraków cukrowych	plazmid	1500000	5–8	7,8	rozkładu 4-hydroksymaślanu lipaz antyporterowe Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
Pole uprawne	plazmid	80000	5,2	0,42	amidaz
Łąka Pole buraków cukrowych Pole zbóż	plazmid	583000 360000 324000	4,4 3,8 3,5	4,05	produkcji karbonylu
Przy strumieniu pokryta mchem	plazmid	30000	3,5	0,11	amylaz
Leśna	fosmid	113700	> 30	3,4	syntaz poliketydowych
Trawiasta	fosmid	15000	35–45	1,0	biosyntezy leinamycyny, mupirocyny i pimarcyny syntazy poliketydowej
Ilasta Żwirowo-ilasta sucha	fagemid <sup>2</sup>	55000 495000	6,5–7	3,5	antybiotykooporności <sup>3</sup> (Ap <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , Tmp <sup>r</sup> )

<sup>1</sup> Nowe geny oporności na kanamycynę, tetracyklinę, apramycynę, butyrozynę, tobramycynę oraz sisomycynę;

<sup>2</sup> Konstrukt oparty na fagu lambda;

<sup>3</sup> Nowe geny oporności na ampicylinę, gentamycynę, chloramfenikol oraz trimetoprim

*Burkholderia*, *Bacillus*, *Sphingomonas*), a więc dysponują stosowną maszyną regulacyjną dla ekspresji genów wniesionych na wektorze [21]. Równocześnie dobierane są odpowiednie wektory o szerokim spektrum gospodarzy lub wektory wahadłowe (np. BAC), które zawierają więcej niż jedno miejsce startu replikacji lub mogą integrować się do chromosomu. Wektory wahadłowe umożliwiają na przykład przejęcie wstawki DNA metagenomowego z biblioteki wyjściowej skonstruowanej na *E. coli* przy użyciu stabilnego wektora fosmidowego i wprowadzenie jej, w celu ekspresji, do nowego gospodarza, np. *Pseudomonas* [8].

Wykrywanie funkcjonalnych genów, w tym także nowych, w metagenomie glebowym odbywa się również poprzez sekwencjonowanie zawartości biblioteki klonów lub bezpośrednio przez pirosekwencjonowanie fragmentów wyekstrahowanego DNA mikrobiomu. Podczas sekwencjonowania typu „shotgun” interesujących genów, występujące w regionach flankujących markery filogenetyczne (np. gen 16S rRNA) pozwalają na identyfikację taksonomiczną aktywnych metabolicznie mikroorganizmów [32]. Funkcjonalną analizę można także przeprowadzić, wykorzystując mikromacierze zawierające geny zaangażowane w kluczowe procesy biogeochemiczne. Przykładem jest obszerna mikromacierz GeoChip oparta na 28 000 50-merowych oligonukleotydach obejmujących 57 000 sekwencji DNA z 292 kategorii genów, które odpowiadają za przemiany C, N, S, P, metalooporność, redukcję metali lub degradację ksenobiotyków [34]. W ten sposób można monitorować obecność lub ekspresję tysięcy genów, uwzględniając zarówno aspekty jakościowe, jak i ilościowe, w jednym eksperymencie. W dodatku ta technika pozwala dokonywać analizy porównawczej wielu różnych próbek równocześnie. Jednakże efektywność tej techniki w dużej mierze zależy od doboru i konstrukcji stosownych sond genowych, jakości i ilości izolowanego metagenomowego DNA oraz właściwego przeprowadzenia procesu PCR. Ponadto, należy pamiętać, że metoda mikromacierzy DNA bazuje na sondach opracowanych w oparciu o znane sekwencje nukleotydowe genów i dlatego może przeoczyć nowe geny obecne w metagenomie, a których brak w mikromacierzy. Stanowi to poważny problem, ponieważ metoda ta nie wykrywa wielu funkcji obecnych wśród populacji bakterii glebowych, które nie zostały opisane, a mogą prawdopodobnie reprezentować znaczącą frakcję mikrobiomu glebowego [13, 19].

## 6. Strukturalna różnorodność mikroorganizmów w różnych środowiskach glebowych

Podejście metagenomowe znacząco zmieniło nasze wyobrażenie o strukturalnej różnorodności mikrobiomu glebowego oraz aktywności metabolicznej, i w kon-

sekwencji roli ekologicznej poszczególnych członków tej społeczności. Nasze możliwości poznawcze uległy poszerzeniu o świat mikroorganizmów stanowiących do niedawna milczącą większość. Pierwszą publikacją, przedstawiającą klonalną bibliotekę genu 16S rRNA drobnoustrojów glebowych, była praca Liesack i Stackebrandt z 1992 roku [49]. Wkrótce potem takie biblioteki zaczęto otrzymywać w odniesieniu do szerokiego zakresu różnych gleb, a taki sposób identyfikacji mikroorganizmów, zwłaszcza wraz z rozwojem metod „fingerprintowych”, na trwale zadomowił się w mikrobiologii środowiskowej. Pierwszy metagenom glebowy o wielkości przekraczającej 1 Gpz, w postaci biblioteki klonalnej konstruowanej na bazie BAC, wykazał obecność w glebie bakterii z taksonów *Acidobacterium*, *Cytophagales* oraz *Proteobacteria* [69]. Na podstawie meta-analizy dostępnych informacji z klonalnych bibliotek wynika, że w glebie może występować 32 typy bakterii, spośród których 9 dominuje [39]. Do tych ostatnich należą: *Proteobacteria* (39%, zakres 10–77%), *Acidobacteria* (20%, zakres 5–46%), *Actinobacteria* (13%, zakres 0–34%), *Verrucomicrobia* (7%, zakres 0–21%), *Bacteroidetes* (5%, zakres 0–18%), *Chloroflexi* (3%, zakres 0–16%), *Planctomycetes* (2,5%, zakres 0–8%) oraz *Gemmatimonadetes* (2%, zakres 0–4%). Zwracająca uwagę jest mała reprezentacja bakterii z typu *Firmicutes* (2%, zakres 0–8%) zawierających takie typowe bakterie glebowe, jak *Bacillus* oraz *Clostridium*, co może mieć jednak związek z trudnością ekstrakcji DNA z tych Gram-dodatnich i przetrwalnikujących bakterii.

Przeciętne biblioteki metagenomu glebowego są małe i obejmują między 300 a 500 klonów, wyjątkiem są biblioteki sporządzone w odniesieniu do gleb z Minnesoty oraz Alaski, które zawierają odpowiednio 1700 oraz 1033 klonów [71, 86]. Efektem tego jest niepełne pokrycie mikrobiomu glebowego i ograniczenie strukturalnej różnorodności do dominujących populacji. Pozostała reszta mikroorganizmów, występująca w małych liczebnie populacjach, skupia jednakże w sobie większość genetycznej różnorodności mikrobiomu i stanowi „rozrzedzoną biosferę” [75]. By móc dotrzeć do tych drobnoustrojów, Elshahed i wsp. [22] opracowali bibliotekę zawierającą 13 001 klonów prawie kompletnej sekwencji genu 16S rRNA bakterii występujących w glebie preriowej. Analiza filogenetyczna umożliwiła im wyróżnienie 34 typów bakterii, wśród których 15 ma znanych przedstawicieli hodowlanych, 14 jest określanych jako typy o statusie kandydatów, natomiast 5 (KFS1-KFS5) stanowi całkiem nowe typy. Wśród najliczniej reprezentowanych w bibliotece są typy: *Actinobacteria* (24%), *Acidobacteria* (20%), *Alphaproteobacteria* (10%), *Deltaproteobacteria* (8%), *Chloroflexi* (7%), *Verrucomicrobia* (6%), *Bacteroidetes* (5%), *Planctomycetes* (4%), *Gemmatimonadetes* (3%). Mały udział, poniżej 1%, ma aż 24 typów bakterii (np. TM7, OP11,



WS3, OD2, *Cyanobacteria*, *Chlorobi*), a 14 z nich jest reprezentowanych tylko przez kilka klonów (np. *Fibrobacter*, *Chlamydia*).

Gleba jest przykładem środowiska, w którym występuje znacząca liczba rzadkich gatunków bakterii, które mogą stanowić od 18 do 37% wszystkich OTU<sub>0,03</sub> reprezentowanych w bibliotece klonów [22]. Najwięcej rzadkich gatunków należy do typu *Planctomycetes* (34–78%), a najmniej do *Acidobacteria* (12–25%). Ponadto, wśród tych rzadkich gatunków można wyróżnić dwie grupy, z których pierwsza, reprezentowana przez 84–92% członków, wykazuje bliskie pokrewieństwo z przedstawicielami licznie zasiedlających glebę typów bakterii, natomiast druga grupa, w ilości 8–16%, obejmuje gatunki wybitnie unikalne filogenetycznie, lub należące do typów znanych z innych środowisk (np. *Chlorobi*, *Caldithrix*, BRC-1). O roli ekologicznej tych rzadkich mikroorganizmów, zwłaszcza należących do drugiej grupy, prawie nic nie wiadomo. Można przypuszczać, że przejmują one określone funkcje biogeochemiczne w sytuacji drastycznych zakłóceń fizykochemicznych zachodzących w glebie (np. podczas suszy, zanieczyszczenia ksenobiotykami), kiedy ich populacje mogą stanowić istotny składnik zmienionej struktury mikrobiomu [22]. Można też sądzić, że szereg unikalnych gatunków wśród tej „rozrzedzonej biosfery” spełnia specyficzne, nieznanne jeszcze funkcje w ekosystemie glebowym, lub też jest pozostałością ewolucji mikroorganizmów – niemniej stanowiącą istotny bank informacji genetycznej. Te swego rodzaju relikty ewolucji, jakkolwiek współcześnie przytłoczone konkurencją taksonów dominujących, mogą charakteryzować się wyjątkową zdolnością przeżycia oraz unikania procesu wymierania, stanowiąc jakby pamięć genetyczną ekosystemu wykorzystywaną do odtworzenia jego typowej struktury i funkcji po katastrofie ekologicznej.

Zaletą analizy metagenomicznej jest możliwość dokonania porównania różnorodności bakterii, archeonów, grzybów oraz wirusów występujących w skrajnie różnych środowiskach glebowych [25]. Okazuje się, że niezależnie od typu gleby liczba unikalnych OTU<sub>0,03</sub> (gatunków) archeonów i grzybów może być równa, a nawet przewyższać liczbę unikalnych OTU<sub>0,03</sub> bakterii, co jest nowym spostrzeżeniem, gdyż przyjęło się uważać bakterie za najbardziej zróżnicowaną grupę mikroorganizmów glebowych [6]. Bakterie jednakże mogą charakteryzować się podobnym bogactwem gatunków (ok.  $10^4$  OTU<sub>0,03</sub>) w różnych glebach, podczas gdy archeony licznie są reprezentowane w glebie pustynnej ( $10^7$  OTU<sub>0,03</sub>), grzyby w glebie preriowej ( $10^9$  OTU<sub>0,03</sub>), a wirusy w glebie lasu deszczowego ( $10^8$  OTU<sub>0,02</sub>). Badania F i e r e r i i wsp. [25] dobitnie wykazały, że w przypadku każdej z grup mikroorganizmów występuje minimalne taksonomiczne podobieństwo między glebami z różnych typów ekosystemów, co wyraźnie sugeruje, że

bakterie, archeony, grzyby oraz wirusy są zróżnicowane zarówno w skali globalnej, jak i lokalnej.

Na podstawie szacunków, że w glebie można się spodziewać od 2000 do 8,3 mln gatunków drobnoustrojów, G a n s i i wsp. [27] wskazali na niepraktyczność stosowania amplifikacji i sekwencjonowania genu 16S rRNA w celu weryfikacji i identyfikacji liczby gatunków bakterii w glebie. W przypadku tej procedury, liczba gatunków jest ograniczona tylko do kilku tysięcy w gramie gleby. Pirosekwencjonowanie daje rzetelnniejsze wyniki. R o e s c h i i wsp. [68], wykorzystując tę metodę w odniesieniu do metagenomów czterech różnych gleb, otrzymali ponad 25 000 pirotagów dla każdej z gleb, co pozwoliło oszacować maksymalną liczbę OTU w glebie, przy najwyższym poziomie rozdzielczości filogenetycznej (0% różnic), na około 52 000. Przy tym poziomie rozdzielczości, bezpośrednio obserwowana liczba OTU wynosi od 3000 do 7000, a po ekstrapolacji do postaci krzywej rozgęszczenia, odczytana liczba OTU osiąga wartości między 11 000 a 21 000 w gramie gleby. Niezależnie więc od sposobu określania liczby gatunków w glebie, pirosekwencjonowanie pokazuje, że jest ich ponad 100 razy mniej niż sugeruje G a n s i i wsp. [27]. Analiza porównawcza pozwala stwierdzić, że gleby uprawne mogą charakteryzować się bogactwem różnych gatunków bakterii oraz archeonów z typu *Crenarchaeota* (4–12%), ale są ubogie na poziomie typów. Natomiast gleba leśna może obfitować w różne typy bakterii przy znikomym udziale (0,009%) archeonów [68]. Najczęściej reprezentowanymi spośród ogółu 30 typów występujących w tego typu glebach są *Proteobacteria* (40%), następnie *Bacteroidetes* (15–25%), *Acidobacteria* (3–12%), *Actinobacteria* (2–9%), *Firmicutes* (2–4%) oraz bakterie niesklasyfikowane (6–12%). Wśród pozostałych typów zwraca uwagę większa obecność *Gemmatimonadetes* (ok. 4%) i *Thermotogae* (ok. 2,5%) w glebie borealnej, a *Nitrospira* (2–3%) oraz TM 7 (ok. 4%) w glebach uprawnych.

F u l t h o r p e i i wsp. [26] stwierdzili, że na poziomie rozdzielczości filogenetycznej przyjętym dla gatunku (0 oraz 3% różnic) różne gleby mogą wykazywać nieznaczne podobieństwo (odpowiednio 1,5 oraz 4,1%), czyli w drastycznie wysokim stopniu charakteryzują się unikalnym składem gatunkowym mikrobiomów. Wśród 10 najliczniej reprezentowanych rodzajów, które obejmują od 31 do 37% wszystkich sekwencji pirotagów, tylko dwa, *Chitinophaga* (*Bacteroidetes*) oraz *Acidobacterium* (*Acidobacteria*), występują w glebach uprawnych oraz borealnej w znacznie większych ilościach (odpowiednio 7,5–13,8% oraz 2,4–9,3%). Inny często obecny rodzaj, *Acidovorax* (1,8–7,5%), występuje tylko w glebach uprawnych. Zwracający uwagę jest fakt, że spośród 10 uznanych za najistotniejsze w glebie rodzaje bakterii (*Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Pseudomonas* oraz *Streptomyces*) tylko trzy są potwierdzone

przez wyniki pirosekwencjonowania metagenomowego DNA, a mianowicie *Bacillus*, *Flavobacterium* oraz *Pseudomonas*. Natomiast pojawiają się w różnych glebach nieoczekiwane takie rodzaje, jak *Chitinophaga*, *Thiobacter*, *Gemmatimonas*, *Chondromyces*, *Nevskia*, *Aquabacterium* czy *Dyadobacter* [26].

Jeszcze bardziej holistyczny obraz mikrobiomu glebowego można uzyskać dzięki bezpośrednio izolowanemu metagenomowemu RNA z dużych (LSU) i małych podjednostek (SSU) rybosomów, który poddany odwrotnej transkrypcji generuje produkty cDNA do procesu 454-pirosekwencjonowania [87]. Taka procedura pozwala uzyskać ponad 250 000 wysokiej jakości sekwencji RNA-tagów o wielkości około 98 pz, spośród których 74,8% jest rybotagami (rozpoznawalne taksonomicznie), w równej proporcji SSU oraz LSU. Prowadzi to do równoczesnego identyfikowania taksonów należące do bakterii, archeonów oraz eukariotów, a także tych mikroorganizmów, dla których brak jest zestawów starterów do amplifikacji PCR. W glebie piaszczystej najliczniej reprezentowane oraz najbardziej zróżnicowane okazują się bakterie w liczbie 19 spośród 24 znanych typów, oraz 20 o statusie kandydatów stanowiących jedynie 2% wszystkich rybotagów. Najliczniej spotykane są *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes* oraz *Acidobacteria*. Grzyby reprezentowane są głównie przez *Ascomycota* obejmujące dwie trzecie rybotagów, zaś najmniej liczną grupę zarówno wśród SSU (1,5%), jak i LSU (1,4%) rybotagów stanowią archeony (Grupa I.1b należąca do typu *Crenarchaeota*) zaangażowane w proces utleniania amoniaku w glebie [48]. Takie podejście metatranskryptomomiczne, zaprezentowane przez Ulrich i wsp. [87], daje także możliwość równoczesnego określenia aktywności fizjologicznej mikrobiomu. Wśród otrzymanych RNA-tagów ponad 21 000 zostało określone jako sekwencje mRNA odpowiadające transkryptomu całej społeczności mikroorganizmów glebowych.

Analiza metagenomiczna pozwala w nowym świetle spojrzeć na: (a) efekty nawożenia mineralnego lub organicznego na strukturalną różnorodność i aktywność fizjologiczną mikrobiomu glebowego [63], (b) wpływ rodzaju gospodarowania rolniczego lub leśnego na skład społeczności mikroorganizmów w glebie [55], (c) rozmieszczenie populacji mikroorganizmów w profilu gleby [94] oraz różnych jej frakcjach [15], (d) strukturę mikrobiomu ryzosferowego [38, 88].

Nawożenie gleby prowadzi jedynie do nieznacznej zmiany w strukturze mikrobiomu, reprezentowanego w 90–94% przez pirotagi pochodzące z bakterii, wynikającej głównie z większej obecności *Firmicutes* oraz archeonów (głównie *Crenarchaeota*) w glebie nawożonej oraz *Cyanobacteria* w glebie nienawożonej. Natomiast zmniejszenie liczebności *Rhizobiales* daje się zauważyć w glebie nawożonej [63].

Wśród ponad 590 000 pirotagów (255 pz) bakterii, pochodzących z gleb terenów podlegających różnemu rodzajowi gospodarowania rolniczego lub leśnego, sklasyfikowano 79,3% do 17 typów, które w większej ilości występują w glebach trawiastych niż leśnych. Jako dominujące grupy bakterii da się wyróżnić *Acidobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* oraz *Firmicutes*. Więcej pirotagów należących do *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* oraz *Gemmatimonadetes* występuje w glebach pastwiskowych, natomiast *Alphaproteobacteria* przeważają w glebach leśnych [55]. Pirosekwencjonowanie pozwala także dostrzec znaczące różnice w strukturze mikrobiomów na poziomie rodzajów. Jakkolwiek *Mycobacterium* dominuje w obu typach gospodarowania glebami, to w przypadku *Phenylobacter*, *Polyangium*, *Azospirillum* i *Dyella* można stwierdzić większą reprezentację w glebach leśnych, natomiast *Bacillus*, *Kribbella*, *Agromyces*, *Defluviococcus*, *Rubrobacter*, *Streptomyces* i *Bradyrhizobium* przeważają w glebach trawiastych. Na poziomie przypuszczalnych gatunków (OTU<sub>0,03</sub>) średnio 3219 OTU może występować w glebach leśnych, natomiast 2611 OTU w glebach trawiastych [55].

Mikroorganizmy występują nie tylko w powierzchniowej warstwie gleby, gdzie są najczęściej badane, ale także głębiej, gdzie są mniej poznane. Jak się okazuje, większa różnorodność bakterii jest w warstwie próchnicznej (A), gdzie znacząca liczba spośród wykrytych 750 000 pirotagów reprezentuje *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia* oraz *Proteobacteria*. Dla odmiany większość sekwencji DNA należących do *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, TM7 oraz WS3 można wyizolować z metagenomu poziomu wzbogacania [94].

Gleba ma swoistą budowę strukturalną, co umożliwia wyróżnienie trzech głównych mikrośrodków: makroagregatowe (powyżej 250 μm), mikroagregatowe (53–250 μm) oraz ilasto-pylaste (poniżej 53 μm). W tych mikrośrodkach społeczności mikroorganizmów różnią się składem oraz liczebnością w odpowiedzi na odmienne warunki chemiczne i fizyczne. Porównując mikrośrodkowiska, okazuje się że, makroagregaty zawierają więcej przedstawicieli *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* oraz *Bacteroidetes*, natomiast we frakcji mikroagregatowej gleby występuje więcej *Rubrobacteriales* z typu *Actinobacteria*, oraz *Chloroflexi*. W trzecim mikrośrodkowisku, ilasto-pylastym, liczniej reprezentowane są *Deltaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gemmatimonadetes*, WS3, *Acidobacteria*, OP10 oraz *Nitrospirae*. Analiza pirotagów wykazuje, że środowisko mikroagregatów charakteryzuje się mniejszą różnorodnością gatunkową (ok. 2500 OTU<sub>0,03</sub>), aniżeli frakcje makroagregatowa oraz ilasto-pylasta, gdzie stwierdza się ponad 3000 OTU<sub>0,03</sub> [15].

Istnienie efektu ryzosferowego pod postacią selektywnego wpływu rośliny na skład mikrobiomu w ryzosferze wyraźnie pokazują wyniki pirosekwencjonowania fragmentów metagenomowego DNA. Na przykład, w ryzosferze dębu przeważającą liczbę otrzymywanych pirotagów stanowią przedstawiciele *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* oraz niesklasyfikowanych proteobakterii. Bardziej dogłębna analiza pozwoli zaobserwować, większą reprezentację rodziny *Burkholderiaceae* z rodzajami *Burkholderia* i *Collimonas* w ryzosferze, zaś w glebie przeważanie przedstawicieli rodziny *Hyphomicrobiaceae* z rodzajem *Rhodoplanes* oraz bakterie z rzędu *Acidimicrobiales* [88]. W ryzosferze roślin zielnych, np. ziemniaka, także wyraźnie daje się dostrzec silny wpływ rośliny na występujące w niej mikroorganizmy. Wyróżnić tu można 25 typów bakterii znacząco (8–50%) reprezentowanych przez *Actinobacteria* oraz *Alphaproteobacteria* oraz w mniejszym stopniu (1–5%) przez *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* oraz TM7. Nowością jest odkrycie, że najliczniej reprezentowanym rodzajem w ryzosferze ziemniaka jest *Rhodanobacter* stanowiący od 8 do 26% wszystkich sklasyfikowanych sekwencji DNA. Na poziomie gatunku (OTU<sub>0,03</sub>) można wykryć ponad 7300 różnych OTU w gramie gleby ryzosferowej, co jest jednakże liczbą wyraźnie mniejszą niż w przypadku gleby poza ryzosferowej (ponad 9000 OTU) [38]. Analiza metagenomiczna uwidacznia wyraźnie selekcjonujący wpływ rośliny na różnorodność i strukturę mikrobiomu ryzosferowego, która zależna jest od gatunku rośliny i jej stadium rozwojowego.

## 7. Podsumowanie

Analiza metagenomiczna jawi się jako poszukiwany od dziesięcioleci Graal mikrobiologii środowisk, który umożliwi dokonania holistycznego spojrzenia na strukturalną różnorodność mikrobiomu oraz jego funkcjonowanie w czasie i przestrzeni. Złożoność problemu, jeśli chodzi o oddziaływania między środowiskiem a mikrobiomem, jest tak wielka, zwłaszcza w przypadku gleby, że nawet przy zastosowaniu najnowszej generacji dogłębnych technologii analizy metagenomu możemy dostrzec zaledwie część (przeciętnie od 30 do 60%) świata mikroorganizmów, a o aktywności fizjologicznej i roli ekologicznej poszczególnych taksonów (gatunków) wiemy jeszcze mniej. Metagenomika rozbudziła olbrzymie nadzieje na dotarcie do mikroorganizmów niehodowanych, a wśród nich także do tych, które wchodzi w skład „rozrzedzonej biosfery”. Jakie jest wśród nich bogactwo poszczególnych taksonów idąc od typów, przez klasy, rzędy, rodziny czy wreszcie rodzaje i gatunki? Które z nich i w jakich warunkach są liczniej

reprezentowane, które zawsze stanowią tło, a które i pod wpływem jakich czynników abiotycznych i biotycznych środowiska podlegają ograniczeniu lub eliminacji? Jak rozmieszczone są poszczególne populacje i jakim podlegają zmianom w skali mikroagregatów glebowych, jak przekłada się to na strukturę mozaiki mikrobiotopów w glebie? Które z tych mikroorganizmów są kosmopolityczne, a które wykazują charakter endemiczny, a więc czy jest możliwe rzetelne poznawanie biogeografii drobnoustrojów i porównywanie mikrobiomów glebowych, nie tylko w skali ekosystemu czy regionu, ale także kontynentu czy globalnie? Wielkie nadzieje wzbudza metagenomika w obszarze poszukiwania genów nowych substancji (metabolitów) o znanych funkcjach i przeznaczeniu, jak i metabolitów całkiem nowych. Które mikroorganizmy i w jakich warunkach są producentami tych substancji? Kiedy i pod wpływem jakich czynników dochodzi do ekspresji poszukiwanych genów w metagenomie glebowym? Czy ekspresja, np. genów katabolicznych, zachodzi w sposób skoordynowany u wszystkich właścicieli a oni współpracują w rozkładaniu substratów, czy też występuje konkurencja i formowanie się swoistej hierarchii pod względem możliwości ich wykorzystania?

W kontekście tych nadziei możliwości metagenomiki nie są pozbawione ograniczeń. Do badań przede wszystkim wymagany jest DNA/RNA o odpowiednim stopniu czystości, możliwie jak najwyższym, o wielkości efektywnej dla poprawnej analizy filogenetycznej i funkcjonalnej. Spełnienie tych warunków jest olbrzymim wyzwaniem podczas badania metagenomu glebowego. Każdy z następujących etapów jest źródłem kolejnych możliwych błędów, jak np. brak adekwatnych dla różnych mikroorganizmów starterów dla PCR czy oligonukleotydów dla konstruowania sond hybrydacyjnych, preferencyjne amplifikowanie pewnych fragmentów DNA (często rzadko reprezentowanych w ogólnej puli), problem z doбором wektora i gospodarza w procesie klonowania, zbyt mało liczne biblioteki klonów w sekwencjonowaniu dideoksy, czy występowanie olbrzymiej ilości krótkich fragmentów DNA podczas pirosekwencjonowania wymagającej rozbudowanej analizy bioinformatycznej dla uzyskania efektywnej informacji filogenetycznej. W konsekwencji otrzymywane wyniki, jakkolwiek obejmują mikroorganizmy niezależnie od ich podatności na wyhodowanie, dotyczą tych członków mikrobiomu glebowego, z których uzyskano DNA lub RNA, zachowujące swoją reprezentatywność od ekstrakcji przez kolejne etapy przetwarzania. W związku z tym można przyjąć, że swój wyraz najczęściej znajdują mikroorganizmy dominujące i najłatwiej dostępne w glebie. Różnica między metodami polega na tym, jak daleko są w stanie poszerzyć tę grupę o kolejne populacje ze zakresu „rozrzedzonej biosfery”.

Postęp technologiczny i malejące koszty sekwencjonowania oraz rozbudowywane bazy mikromacierzy DNA

dają asumpt do coraz powszechniejszego stosowania analizy metagenomicznej. Budowane bazy metagenomów gromadzą dane dostarczane przez zespoły badawcze, które służą też dla analiz porównawczych dla nowych projektów. Baza IMG/M (Integrated Microbial Genomes with Microbiome Samples – <http://www.img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi>) zgromadziła 385 metagenomów ze środowiska, z czego 64 to metagenomy glebowe. Inna baza, GOLD 4.0 (DOE Joint Genome Institute), zawiera 370 metagenomy, a wśród nich 45 to metagenomy glebowe, 11 pochodzi z ryzoplenu, a 1 z fylosfery.

Analiza metagenomiczna znacząco poszerza obraz mikrobiomu glebowego, ale w dalszym ciągu jest on nieostry i wygląda tak, jakbyśmy chcieli dostrzec detale przy niewielkim powiększeniu. Miliardy drobnoustrojów, zawierające 2,142 km DNA niosący  $4 \times 10^{12}$  genów, zamieszkuje każdy gram gleby, aktywnie wpływając na jej właściwości [85]. Wiele z nich przeżywa, wiele wymiera, niezliczone ilości podlegały szybkiemu procesowi specjacji. Mikrobiom glebowy jest zatem dynamiczną jednostką podlegającą ustawicznej ewolucji i należy mieć nadzieję, że choć trochę bardziej będziemy go rozumieć dzięki badaniom na poziomie metagenomu.

## Piśmiennictwo

- Andersen G.L., He Z., DeSantis T.Z., Brodie E.L., Zhou J.: The use of microarrays in microbial ecology (w) *Environmental Molecular Microbiology*, red. Liu W.-T., Jansson J.K., Caister Academic Press, Norfolk, 2010, s. 87–110
- Baker K.L., Langenheder S., Nicol G.W., Ricketts D., Killham K., Campbell C.D., Prosser J.I.: Environmental and spatial characterisation of bacterial community composition in soil to inform sampling strategies. *Soil Biol. Biochem.* **41**, 2292–2298 (2009)
- Barns S.M., Fundyga R.E., Jeffries M.W., Pace N.R.: Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 1609–1613 (1994)
- Brown T.A.: *Genomy*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 2009
- Bru D., Ramette A., Saby N.P., Dequiedt S., Ranjard L., Jolivet C., Arrouays D., Philippot L.: Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at the landscape scale. *ISME J.* **5**, 532–542 (2011)
- Buckley, D., Schmidt T.: Exploring the biodiversity of soil – a microbial rain forest (w) *Biodiversity of Microbial Life*, red. Staley J., Reysenbach A., John Wiley & Sons, New York, 2002, s. 183–208
- Caffrey S.M.: Which microbial communities are present? Sequence-based metagenomics (w) *Applied Microbiology and Molecular Biology in Oilfield Systems*, red. Whitby C., Skovhus T.L., Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, 2011, s. 63–76
- Charles T.C.: The potential for investigation of plant-microbe interactions using metagenomics methods (w) *Metagenomics. Theory, Methods and Applications*, red. Marco D., Caister Academic Press, Norfolk, 2010, s. 107–118
- Chen I.C., Lin W.D., Hsu S.K., Thiruvengadam V., Hsu W.H.: Isolation and characterization of a novel lysine racemase from a soil metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5161–5166 (2009)
- Connon S.A., Giovannoni S.J.: High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3878–3885 (2002)
- Cooper M., La Duc M.T., Probst A., Vaishampayan P., Stam Ch., Bernardini J.N., Piceno Y.M., Andersen G.L., Venkateswaran K.: Comparison of innovative molecular approaches and standard spore assays for assessment of surface cleanliness. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5438–5444 (2011)
- Courtois, S., Pernodet J.L. i wsp.: Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 49–55 (2003)
- Cubillos-Ruiz A., Junca H., Baena S., Venegas I., Zambrano M.M.: Beyond metagenomics: integration of complementary approaches for the study of microbial communities (w) *Metagenomics. Theory, Methods and Applications*, red. Marco D., Caister Academic Press, Norfolk, 2010, s. 15–38
- Daniel R.: The metagenomics of soil. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 470–478 (2005)
- Davinic M., Fultz L.M., Acosta-Martinez V., Calderón F.J., Cox S.B., Dowd S.E., Allen V.G., Zak J.C., Moore-Kucera J.: Pyrosequencing and mid-infrared spectroscopy reveal distinct aggregate stratification of soil bacterial communities and organic matter composition. *Soil Biol. Biochem.* **46**, 63–72 (2012)
- Davis K.E.R., Sangwan P., Janssen P.H.: *Acidobacteria, Rubrobacteridae and Chloroflexi* are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. *Environ. Microbiol.* **13**, 798–805 (2011)
- DeAngelis K.M., Pace N.R. i wsp. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, **243**, 1360–1363 (1989)
- Dowd S.E., Callaway T.R., Wolcott R.D., Sun Y., McKeenhan T., Hagevoort R.G., Edrington T.S.: Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.* **8**, 125 (2008)
- Dugat-Bony E., Peyretilade E., Parisot N., Biderre-Petit C., Jaziri F., Hill D., Rimour S., Peyret P.: Detecting unknown sequences with DNA microarrays: explorative probe design strategies. *Environ. Microbiol.* **14**, 356–371 (2012)
- Dunbar J., Barns S.M., Ticknor L.O., Kuske C.R.: Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3035–3045 (2002)
- Ekkers D.M., Cretoiu M.S., Kielak A.M., van Elsland J.D.: The great screen anomaly – a new frontier in product discovery through functional metagenomics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 1005–1020 (2012)
- Elend C., Schmeisser C., Leggewie C., Babiak P., Carballeira J.D., Steele H.L., Reymond J.L., Jaeger K.E., Streit W.R.: Isolation and biochemical characterization of two novel metagenome-derived esterases. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3637–3645 (2006)
- Elshahed M.S., Krumholz L.R. i wsp.: Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5422–5428 (2008)
- Feinstein L.M., Sul W.J., Blackwood C.B.: Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Appl. Environ. Microb.* **75**, 5428–5433 (2009)
- Fierer N., Jackson R.B. i wsp.: Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of *Bacteria*, *Archaea*, *Fungi*, and viruses in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7059–7066 (2007)
- Fulthorpe R.R., Roesch L.F.W., Riva A., Triplett E.W.: Distantly sampled soils carry few species in common. *ISME J.* **2**, 901–910 (2008)

27. Gans J., Wolinsky M., Dunbar J.: Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, **309**, 1387–1390 (2005)
28. Giovannoni S.J., DeLong E.F., Olsen G.J., Pace N.R.: Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* **170**, 720–726 (1988)
29. Giovannoni S.J., Britschgi T.B., Moyer C.L., Field K.G.: Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, **345**, 60–63 (1990)
30. Guazzaroni M.E., Golyshin P.N., Ferrer M.: Analysis of complex microbial communities through metagenomic survey (w) Metagenomics. Theory, Methods and Applications, red. Marco D., Caister Academic Press, Norfolk, 2010, s. 55–78
31. Hamady M., Walker J.J., Harris J.K., Gold N.J., Knight R.: Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nat. Methods*, **5**, 235–237 (2008)
32. Handelsman J.: Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 669–685 (2004)
33. 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**, R245–R249 (1998)
34. He Z., Zhou J. i wsp.: GeoChip 3.0 as a high-throughput tool for analyzing microbial community composition, structure and functional activity. *ISME J.* **4**, 1167–1179 (2010)
35. Healy F.G., Ray R.M., Aldrich H.C., Wilkie A.C., Ingram L.O., Shanmugam K.T.: Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 667–674 (1995)
36. Henne, A., Daniel, R., Schmitz, R.A., Gottschalk, G.: Construction of environmental DNA libraries in *Escherichia coli* and screening for the presence of genes conferring utilization of 4-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3901–3907 (1999)
37. Henne, A., Schmitz R.A., Bomeke M., Gottschalk G., Daniel R.: Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3113–3116 (2000)
38. Inceoğlu Ö., Al-Soud W.A., Falcão Salles J., Semenov A.V., van Elsas J.D.: Comparative analysis of bacterial communities in a potato field as determined by pyrosequencing. *PLoS ONE* **6**(8): e23321. doi:10.1371/journal.pone.0023321
39. Janssen P.H.: Identifying the dominant soil bacteria taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1719–1728 (2006)
40. Janssen P.H., Yates P.S., Grinton B.E., Taylor P.M., Sait M.: Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2391–2396 (2002)
41. Joseph S.J., Hugenholtz P., Sangwan P., Osborne C.A., Janssen P.H.: Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7210–7215 (2003)
42. Kakirde K.S., Parsley L.C., Liles M.R.: Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 1911–1923 (2010)
43. Kang S., Mills A.L.: The effect of sample size in studies of soil microbial community structure. *J. Microbiol. Methods*, **66**, 242–250 (2006)
44. Kellenberger E.: Exploring the unknown: the silent revolution of microbiology. *EMBO Rep.* **2**, 5–7 (2001)
45. Kozdrój J.: Izolacja kwasów nukleinowych ze środowiska – pierwszy krok w analizie metagenomu. *Kosmos*, **59**, 141–150 (2010)
46. Kozdrój J.: Różnorodność mikroorganizmów glebowych w świetle badań molekularnych. *Post. Mikrobiol.* **43**, 375–398 (2004)
47. Kunin V., Engelbrekton A., Ochman H., Hugenholtz Ph.: Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environ. Microbiol.* **12**, 118–123 (2010)
48. Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C., Schleper C.: *Archaea* predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**, 806–809 (2006)
49. Liesack W., Stackebrandt E.: Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* **174**, 5072–5078 (1992)
50. Liles M.R., Manske B.F., Bintrim S.B., Handelsman J., Goodman R.M.: A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2684–2691 (2003)
51. Lombard N., Prestat E., Van Elsas J.D., Simonet P.: Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics. *FEMS Microbiol. Ecol.* **78**, 31–49 (2011)
52. Madsen E.L.: Environmental Microbiology. From genomes to biogeochemistry. Blackwell Publishing, Oxford, 2008
53. Mirete, S., de Figueras, C.G., Gonzalez-Pastor, J.E.: Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 6001–6011 (2007)
54. Mummey D., Holben W., Six J., Stahl P.: Spatial stratification of soil bacterial populations in aggregates of diverse soils. *Microb. Ecol.* **51**, 404–411 (2006)
55. Nacke H., Thürmer A., Wollherr A., Will Ch., Hodac L., Herold N., Schöning I., Schrupf M., Daniel R.: Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS ONE* **6**(2): e17000. doi:10.1371/journal.pone.0017000 (2011)
56. Nelson K.E., Bryan P.A., White B.A.: Genomics and metagenomics: history and progress. (w) Metagenomics. Theory, Methods and Applications red. Marco D., Caister Academic Press, Norfolk, 2010, s. 21–36
57. Nicol G.W., Glover L.A., Prosser J.I.: Spatial analysis of archaeal community structure in grassland soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7420–7429 (2003)
58. Ono A., Miyazaki R., Sota M., Ohtsubo Y., Nagata Y., Tsuda M.: Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 501–510 (2007)
59. Øvreås L.: Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecol. Lett.* **3**, 236–251 (2000)
60. Pace N.R., Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J.: The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* **9**, 1–55 (1986)
61. Parsley L.C., Consuegra E.J., Kakirde K.S., Land A.M., Harper Jr. W.F., Liles M.R.: Identification of diverse antimicrobial resistance determinants carried on bacterial, plasmid, or viral metagenomes from an activated sludge microbial assemblage. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3753–3757 (2010)
62. Pignatelli M., Aparicio G., Blanquer I., Hernandez V., Moya A., Tamames J.: Metagenomics reveals our incomplete knowledge of global diversity. *Bioinformatics* **24**, 2124–2125 (2008)
63. Poulsen P.H.B., Abu Al-Soud W., Bergmark L., Magid J., Hansen L.H., Sørensen S.J.: Effects of fertilization with urban and agricultural organic wastes in a field trial – Prokaryotic

- diversity investigated by pyrosequencing. *Soil Biol. Biochem.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.12.023> (2012)
64. Prosser J.I.: Replicate or lie. *Environ. Microbiol.* **12**, 1806–1810 (2010)
  65. Ranjard L., Lejon D.P., Mougel C., Schehrer L., Merdinoglu D., Chaussod R.: Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ. Microbiol.* **5**, 1111–1120 (2003)
  66. Riesenfeld C.S., Goodman R.M., Handelsman J.: Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ. Microbiol.* **6**, 981–989 (2004)
  67. Robe P., Nalin R., Capellano C., Vogel T.M., Simonet P.: Extraction of DNA from soil. *Eur. J. Soil Biol.* **39**, 183–190 (2003)
  68. Roesch L.F.W., Fulthorps R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K.M., Kent A.D., Daroub S.M., Camargo F.A.O., Farmerie W.G., Triplett E.W.: Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* **1**, 283–290 (2007)
  69. Rondon M.R., Goodman R.M. i wsp.: Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2541–2547 (2000)
  70. Rousk J., Brookes P.C., Bååth E.: Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. *Soil Biol. Biochem.* **42**, 926–934 (2010)
  71. Schloss P.D., Handelsman J.: Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput. Biol.* **2**, 786–793 (2006)
  72. Schmidt T.M., DeLong E.F., Pace N.R.: Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* **173**, 4371–4378 (1991)
  73. Schwartz I.: Microbial genomics, from sequence to function. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 493–495 (2000)
  74. Singer M.E., Tom L.M., Andersen G.L.: PCR amplification-independent methods for detection of microbial communities by the high-density microarray PhyloChip. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6313–6322 (2011)
  75. Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., Welch M.D., Huse S.M., Neal P.R., Arrieta J.M., Herndl G.J.: Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12115–12120 (2006)
  76. Sogin M.L.: Characterizing microbial population structures through massively parallel sequencing (w) *Microbiology Monographs* Vol. 10, red. Epstein S.S., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2009, s. 19–33
  77. Stahl D.A., Lane D.J., Olsen G.J., Pace N.R.: Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1379–1384 (1985)
  78. Staley J.T., Konopka A.: Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 321–346 (1985)
  79. Stein J.L., T.L. Marsh K.Y., Shizuya W.H., DeLong E.F.: Characterization of uncultivated prokaryotes: isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *J. Bacteriol.* **178**, 591–599 (1996)
  80. Suenaga H., Ohnuki T., Miyazaki K.: Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Environ. Microbiol.* **9**, 2289–2297 (2007)
  81. Thomas T., Gilbert J., Meyer F.: Metagenomics – a guide from sampling to data analysis. *BMC Microb. Inf. Exp.* **2**, 3 (2012)
  82. Torres-Cortés G., Millán V., Ramírez-Saad H.C., Nisa-Martínez R., Toro N., Martínez-Abarca F.: Characterization of novel antibiotic resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples. *Environ. Microbiol.* **13**, 1101–1114 (2011)
  83. Torsvik V., Goksoyr J., Daae F.L.: High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 782–787 (1990)
  84. Torsvik V., Øvreås L.: Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 240–245 (2002)
  85. Trevors J.T.: One gram of soil: a microbial biochemical gene library. *Antonie van Leeuwenhoek*, **97**, 99–106 (2010)
  86. Tringe S.G., Rubin E.M. i wsp.: Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, **308**, 554–557, 2005.
  87. Urich T., Lanzén A., Qi J., Huson D.H., Schleper Ch., Schuster S.C.: Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the metatranscriptome. *PLoS ONE*, **3**(6), e2527, doi:10.1371/journal.pone.0002527 (2008)
  88. Uroz S., Buée M., Murat C., Frey-Klett P., Martin F.: Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environ. Microbiol. Rep.* **2**, 281–288 (2010)
  89. Van Elsas J.D., Costa R., Jansson J., Sjöling S., Bailey M., Nalin R., Vogel T.M., Van Overbeek L.: The metagenomics of disease-suppressive soils – experiences form the METACONTROL project. *Trends Biotechnol.* **26**, 591–601 (2008)
  90. Van Elsas J.D., Jansson J.K., Trevors J.T.: *Modern Soil Microbiology II*. CRC Press-Taylor and Francis, Boca Raton, 2007
  91. Von Wintzingerode F., Gobel U.B., Stackebrandt E.: Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**, 213–229 (1997)
  92. Wang G.Y., Davies J. i wsp.: Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Org. Lett.* **2**, 2401–2404 (2000)
  93. Whitman W.B., Coleman D.C., Wiebe W.J.: Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6578–6583 (1998)
  94. Will Ch., Daniel R. i wsp.: Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 6751–6759 (2010)
  95. Williams M.A., Rice C.W.: Seven years of enhanced water availability influences the physiological, structural, and functional attributes of a soil microbial community. *Appl. Soil Ecol.* **35**, 535–545 (2007)
  96. Woese C.R., Fox G.E.: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5088–5090 (1977)
  97. Woese C.R., Kandler O., Whellis M.L.: Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576–4579 (1990)
  98. Wommack K.E., Bhavsar J., Ravel J.: Metagenomics: read length matters. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1453–1463 (2008)
  99. Xu J.: *Metagenomics and ecosystems biology: conceptual frameworks, tools and methods (w) Metagenomics. Theory, Methods and Applications*, red. Marco D., Caister Academic Press, Norfolk, 2010, s. 1–14
  100. Youssef N., Sheik C., Krumholz L., Najar F., Roe B., Elshahed M.: A Comparative study of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5227–5236 (2009)
  101. Zengler K., Toledo G., Rappe M., Elkins J., Mathur E.J., Short J.M., Keller M.: Cultivating the uncultured. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15681–15686 (2002)

# WYSTĘPOWANIE I CHOROBTWÓRCZOŚĆ DLA CZŁOWIEKA POTENCJALNIE TOKSYNOTWÓRCZYCH MACZUGOWCÓW – *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*, *CORYNEBACTERIUM ULCERANS* I *CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS*

Aleksandra Anna Zasada<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Zakład Bakteriologii,  
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w styczniu 2013 r.

1. Charakterystyka rodzaju. 2. Występowanie w środowisku. 3. Zakażenia człowieka. 4. Czynniki zjadliwości. 4.1. Toksyna błonicza. 4.2. Inne czynniki zjadliwości. 4.2.1. Czynniki adhezji. 4.2.2. Pobieranie żelaza. 4.2.3. Fosfolipaza D (PlD). 4.2.4. Proteazy serynowe. 4.2.5. Neuraminidaza H (NanH). 5. Podsumowanie

## The occurrence and pathogenicity of potentially toxinogenic corynebacteria – *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*

**Abstract:** *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis* are closely related species possessing the ability to produce the lethal diphtheria toxin. The toxin is considered as the main virulence factor, but these species express also other virulence factors so nontoxicogenic strains of the species are also able to cause serious infections. The interest in the virulence factors other than diphtheria toxin has been increasing and new factors and virulence mechanisms have been investigated. This paper is an overview of *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* and *C. pseudotuberculosis* infections in humans, presenting the mechanism of action of diphtheria toxin adhesive factors, iron uptake systems and other putative virulence factors.

1. Description of the genus. 2. Occurrence in the environment. 3. Human infections. 4. Virulence factors. 4.1. Diphtheria toxin. 4.2. Other virulence factors. 4.2.1. Adhesive factors. 4.2.2. Iron utilization. 4.2.3. Phospholipase D (PlD). 4.2.4. Serine proteases. 4.2.5. Neuraminidase H (NanH). 5. Summary

**Słowa kluczowe:** *C. diphtheriae*, chorobotwórczość, *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, czynniki zjadliwości

**Key words:** *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans*, pathogenicity, virulence factors

## 1. Charakterystyka rodzaju

Do rodzaju *Corynebacterium* należą Gram-dodatnie bakterie, których komórki są pleiomorficzne, zwykle o kształcie prostych lub lekko zakrzywionych pałeczek o zwężonych końcach. W komórce obecne są ziarna metachromatyczne. Bakterie należące do tego rodzaju są fakultatywnymi anaerobami lub aerobami. Należą do chemoorganotrofów. Są katalazododatnie, nie wytwarzają przetrwalników i nie wykazują zdolności ruchu [38].

Obecnie rodzaj *Corynebacterium* obejmuje ponad 80 gatunków. Jak dotychczas tylko trzy z nich posiadają zdolność wytwarzania toksyny letalnej, zwanej toksyną błoniczą. Są to *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis*. Gatunki te są ze sobą blisko spokrewnione. Mają podobną morfologię, skład ściany komórkowej, jak również podobną sekwencję nukleotydową genu 16S rRNA. Wszystkie te trzy gatunki różnią się od pozostałych przedstawicieli rodzaju *Corynebacterium* obecnością w komórce dużej ilości kwasów tłuszcz-

czowych, wytwarzaniem cystynazy i nie wytwarzaniem pyrazynamidazy [43].

*C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis* mogą być odróżnione od *C. diphtheriae* na podstawie takich cech biochemicznych jak wytwarzanie ureazy czy dodatni wynik odwrotnego testu CAMP. *C. ulcerans* od *C. pseudotuberculosis* odróżnia zdolność fermentacji glikogenu, skrobii i trehalozy (Tabela I) [24].

Na podstawie morfologii kolonii oraz właściwości biochemicznych *C. diphtheriae* można podzielić na cztery biotypy: *gravis*, *mitis*, *intermedius* i *belfanti*. Na podłożu tellurynowym Hoyle'a biotypy *mitis* i *belfanti* tworzą szare lub czarne, nieprzezroczyste kolonie wielkości 1,5–2 mm, gładkich brzegach i gładkiej, błyszczącej powierzchni. Często obserwowana jest zmienność w wielkości kolonii. Biotyp *gravis* tworzy matowe, nieprzezroczyste szare lub czarne kolonie o wielkości 1,5–2 mm, kruche, mające tendencje do rozpadania się na mniejsze fragmenty po dotknięciu eż. Kolonie biotypu *intermedius* są małe, o wielkości 0,5–1 mm, szare lub czarne, półprzezroczyste, o błyszczącej powierzchni.

<sup>1</sup> Publikacja sfinansowana z darowizny BNP Paribas

\* Autor korespondencyjny: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Zakład Bakteriologii, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; e-mail: azasada@pzh.gov.pl

Cechy różnicujące potencjalnie toksynotwórcze gatunki *Corynebacterium* [10, 24, 38]

Gatunek	Odwrotny CAMP	Wytwarzanie					Rozkład				
		Alkalicznej fisyfatazy	Ureazy	Ram-nozy	Sacha-rozy	Trecha-lozy	Sali-cyny	Skrobiy	Dex-tranu	Gliko-genu	Azo-tanów
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>gravis</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>mitis</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>intermedius</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
<i>C. diphtheriae</i> var. <i>belfanti</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>C. ulcerans</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-

Na podłożu agarowym z krwią kolonie biotypów *mitis*, *intermedius* i *belfanti* wytwarzają małą strefę  $\beta$ -hemolizy, natomiast biotyp *gravis* jest zazwyczaj niehemolizujący. Swoiste cechy biochemiczne wszystkich czterech biotypów przedstawiono w tabeli I.

## 2. Występowanie w środowisku

Drobnoustroje należące do rodzaju *Corynebacterium* występują powszechnie w środowisku – w glebie, na roślinach, na skórze i błonach śluzowych ludzi i zwierząt. Mogą również przetrwać przez długi czas na różnego rodzaju przedmiotach.

*C. ulcerans* jest mikroorganizmem komensalnym zwierząt. Był izolowany z dzikich i domowych zwierząt, takich jak psy, koty, konie, kozy, krowy, świnię, wielbłądy, małpy, wiewiórki i wydry [63, 67]. Zwierzęta mogą stanowić rezerwar dla zakażeń człowieka. Co więcej, drobnoustrój ten może wywoływać zapalenie wymienia u bydła i kóz. Znacząca liczba zakażeń człowieka *C. ulcerans* jest związana ze spożyciem niepasteryzowanych produktów mlecznych. Jest to związane z faktem, że w przypadkach zapalenia wymienia u bydła bakterie są obecne w mleku. Do zakażenia może dojść także podczas pracy przy zakażonych zwierzętach i obróbce ich produktów. Ostatnio również kontakt ze zwierzętami domowymi, takimi jak psy czy koty, został uznany za źródło zakażenia tym drobnoustrojem [14, 17, 25, 30, 40, 46, 67].

*C. pseudotuberculosis* rzadko powoduje zoonozy. Najczęściej tym drobnoustrojem zakażone są owce i kozy, rzadziej konie, bydło czy jelenie. Podobnie jak w przypadku *C. ulcerans*, źródłem infekcji dla ludzi mogą być niepasteryzowane produkty mleczne. Ryzyko zakażenia związane jest również z pracami przy zakażonych zwierzętach oraz obróbce ich produktów np. w rzeźnictwie [6].

Dotychczas uważano, że *C. diphtheriae* nie jest patogenem odzwierzęcym. Jednakże ostatnie doniesienia o koniach jako nosicielach *C. diphtheriae* wskazują na możliwe pojawienie się nowego źródła zakażeń człowieka

[31, 47]. *C. diphtheriae* izolowano również od kotów i psów [29]. Także w starszych publikacjach pojawiały się doniesienia o izolacji tego drobnoustroju od zwierząt [42, 56]. Bakterie tego gatunku sporadycznie wywołują zapalenie wymienia u bydła oraz są związane z zapaleniem skóry i gorączką u tych zwierząt. Przypuszcza się, że do zakażenia zwierząt dochodzi w wyniku kontaktu z zakażonymi pracownikami gospodarstwa [31].

## 3. Zakażenia człowieka

*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis* wytwarzające toksynę błoniczą powodują chorobę zwaną błonicą, w przebiegu której bakterie kolonizują ograniczony obszar – najczęściej błony śluzowe gardła i nosa, rzadziej spojówki, błony śluzowe narządów płciowych czy uszkodzoną skórę – natomiast wytwarzana przez nie toksyna dostaje się do krwiobiegu i rozprzestrzenia się po całym organizmie powodując uszkodzenia głównie w mięśni sercowym i układzie nerwowym [45].

Najczęściej błonica powodowana jest przez *C. diphtheriae*. Największa w ostatnim czasie w Europie epidemia miała miejsce w krajach byłego ZSRR w latach 90. ubiegłego wieku. W szczycie epidemii w 1995 roku odnotowano tam 50425 przypadków [13]. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), w 2007 roku na całym świecie odnotowano 4190 przypadków błonicy wywołanej przez *C. diphtheriae*. Natomiast na terenie Unii Europejskiej w 2008 roku zgłoszonych zostało 47 przypadków błonicy wywołanej przez *C. diphtheriae* i *C. ulcerans*, które odnotowano na Łotwie – 29 przypadków, w Wielkiej Brytanii – 6, we Francji – 5, na Litwie – 2 oraz w Szwecji – 1 przypadek [20]. W roku 2009 w krajach UE zgłoszono 16 przypadków błonicy: 4 w Niemczech, 1 we Francji, 6 na Łotwie, 1 w Szwecji oraz 4 przypadki w Wielkiej Brytanii [21].

Zwraca uwagę obserwowany w ostatnim czasie w wielu krajach znaczący wzrost liczby zakażeń inwazyjnych powodowanych przez *C. diphtheriae*, przy czym najczęściej przez szczepy nietoksynotwórcze. Pomiędzy



rokiem 1893 a 1995, a więc w okresie ponad 100 lat, odnotowano tylko 58 przypadków bakteriemii spowodowanych przez ten drobnoustrój [57]. W latach 90. sytuacja ta zaczęła się zmieniać. W okresie 1999–2003 w Kanadzie odnotowano 13 przypadków zakażeń inwazyjnych *C. diphtheriae* [15]. Czternaście szczepów *C. diphtheriae* wyizolowano z zakażeń inwazyjnych w Szwajcarii w latach 1990–1996 [28]. W Polsce pierwszy przypadek zakażenia inwazyjnego *C. diphtheriae* odnotowano w 2004 roku, a w okresie 2005–2011 piętnaście kolejnych przypadków [23, 73]. Również w Brazylii zaobserwowano w ostatnim czasie wzrost liczby izolatów *C. diphtheriae* pochodzących z zakażeń inwazyjnych [33, 51]. Zakażenia inwazyjne powodowane są zarówno przez szczepy wytwarzające toksynę błoniczą, jak też nietoksynotwórcze. Czynniki predysponujące takiego zakażenia są: bezdomność, przyjmowanie narkotyków drogą dożylną, alkoholizm, cukrzyca, homoseksualizm. Zakażeniom tym częściej ulegają mężczyźni niż kobiety [73].

Dane epidemiologiczne pokazują, że w wielu krajach rozwiniętych nastąpił również wzrost liczby zakażeń powodowanych przez toksynotwórcze szczepy *C. ulcerans*. Wydaje się, że zakażenia toksynotwórczymi *C. ulcerans* zastępują zakażenia toksynotwórczymi *C. diphtheriae*. W Wielkiej Brytanii w latach 2000–2009 wyizolowano 43 szczepy toksynotwórczych maczugowców, z których 27 (63%) stanowiły *C. ulcerans* [66]. We Francji w latach 2002–2008 wyizolowano 12 (63%) szczepów *C. ulcerans* z 19 przypadków zakażeń ludzi toksynotwórczymi maczugowcami [5]. Z kolei w Stanach Zjednoczonych w latach 1999–2005 w dwóch (29%) z 7 zakażeń wywołanych przez toksynotwórcze gatunki *Corynebacterium* wyizolowano *C. ulcerans*, natomiast przed 1999 rokiem ostatni odnotowany przypadek zakażenia toksynotwórczym *C. ulcerans* miał tam miejsce w 1996 roku. Również w Japonii odnotowano dwa przypadki zakażeń toksynotwórczymi *C. ulcerans* u ludzi w roku 2001 i 2002 [41].

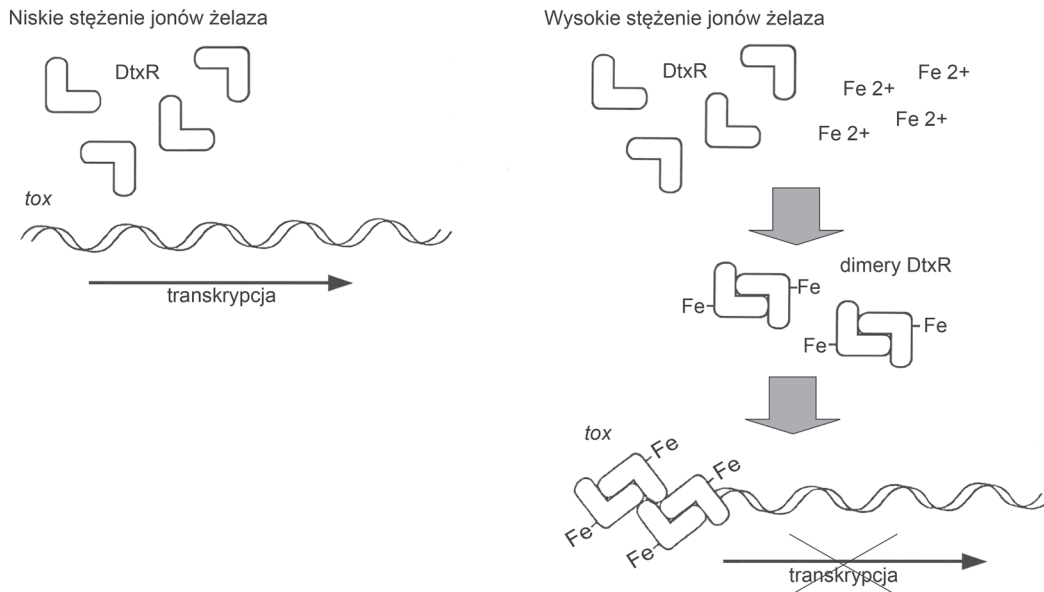
Epidemiologia zakażeń człowieka powodowanych przez *C. ulcerans* nie jest dobrze poznana. Jak wcześniej wspomniano, do zakażenia dochodzi zwykle przez kontakt ze zwierzętami lub poprzez spożycie niepasteryzowanych produktów mlecznych. Jednakże tego typu czynniki ryzyka nie zostały zidentyfikowane w niektórych przypadkach klasycznej błonicy powodowanej przez *C. ulcerans*, co sugeruje inne drogi zakażenia. Uważa się, że zakażenie człowiek-człowiek występuje rzadko [35]. Wydaje się, że grupę ryzyka zakażenia *C. ulcerans* stanowią kobiety, szczególnie powyżej 50 roku życia. Prawdopodobnie jest to związane z ich częstszym kontaktem ze zwierzętami domowymi (np. koty), a także z faktem, że – jak wykazały przeprowadzone w Europie badania – kobiety powyżej 40 roku życia mają niższy poziom przeciwciał przeciwbłoniczych niż mężczyźni [19, 42].

Natomiast niewiele informacji dotyczących *C. pseudotuberculosis* jest dostępnych w piśmiennictwie. Jak dotychczas zostało opisanych mniej niż 30 przypadków zakażeń ludzi tym drobnoustrojem. W opisanych przypadkach do zakażenia doszło przez kontakt z kozami i owcami [42, 58]. Szczepy toksynotwórcze *C. pseudotuberculosis* zwykle wywołują zakażenia podobne do błonicy. Wśród 25 krajów europejskich biorących udział w sieci monitorowania błonicy (Diphtheria Surveillance Network) tylko trzy przypadki zakażeń toksynotwórczymi *C. pseudotuberculosis* zostały odnotowane w latach 2000–2010 – dwa we Francji w 2004 i 2005 roku i jeden w Wielkiej Brytanii w 2008 roku [18]. Większość opisanych zakażeń ludzi nietoksynotwórczymi *C. pseudotuberculosis* miała postać zapalenia węzłów chłonnych [37, 58], z wyjątkiem jednego przypadku eozynochłonnego zapalenia płuc [39] i jednego przypadku zakażenia oka [48].

## 4. Czynniki zjadliwości

### 4.1. Toksyna błonicza

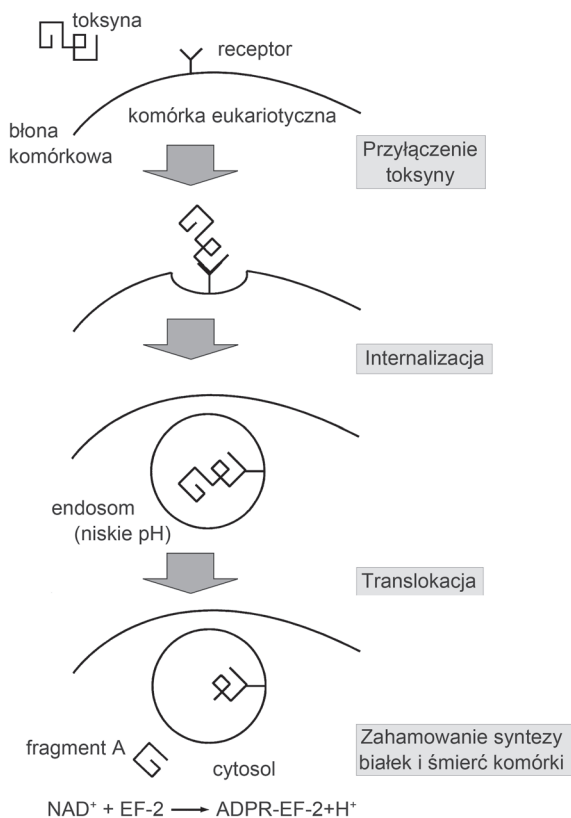
Toksyna błonicza jest uznawana za główny czynnik wirulencji *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis*. Jest kodowana przez gen *tox*, obecny w materiale genetycznym blisko ze sobą spokrewnionych corynebakteriofagów. Jak dotychczas najlepiej poznanym ich przedstawicielem jest fag  $\beta$ . Fagi należące do tej grupy mają zdolność wbudowywania swojego DNA w chromosom *Corynebacterium* podczas fazy lizogenicznej cyklu infekcyjnego. Integracja może nastąpić w dwóch specyficznych miejscach: *attB1* i *attB2*. Ekspresja genu *tox* w szczepach lizogennych jest regulowana przez białko DtxR w odpowiedzi na zmianę poziomu  $Fe^{2+}$ . DtxR jest globalnym regulatorem kodowanym przez chromosomalny gen *dtxR*. Białko to reguluje ekspresję wielu genów związanych z metabolizmem żelaza, ochroną przed stresem oksydacyjnym, a także patogenezą [27, 55]. Przy braku  $Fe^{2+}$  apo-DtxR występuje w postaci nieaktywnego monomeru, który w niewielkiej części tworzy niestabilne formy dimeryczne. Natomiast po aktywacji przez  $Fe^{2+}$  DtxR tworzy stabilne dimery, których dwie pary przyłączają się po przeciwnych stronach do sekwencji operatora genu *tox*. Białko DtxR składa się z dwóch głównych domen strukturalnych połączonych elastycznym regionem bogatym w prolinę. Domena N-terminalna zawiera podstawowe i dodatkowe miejsca wiązania jonów metali, fragment rozpoznający strukturę helix-turn-helix DNA oraz znaczną powierzchnię hydrofobową niezbędną do utworzenia stabilnego dimeru [49]. Po przyłączeniu się dimerów DtxR do promotora *tox* transkrypcja genu *tox* jest hamowana. Kiedy dostępność wolnych jonów żelaza jest ograniczona – jak



Rys. 1. Regulacja ekspresji toksyny błoniczej. Opis w tekście

to ma miejsce w organizmie człowieka i zwierząt gdzie żelazo występuje głównie w postaci związanej z białkami – nie tworzące stabilnych kompleksów DtxR nie jest w stanie przyłączyć się do DNA, co prowadzi do indukcji wytwarzania toksyny błoniczej (Rys. 1).

Toksyna błonicza składa się z trzech domen: domeny katalitycznej, domeny transbłonowej i domeny wiążącej receptor. N-terminalna domena katalityczna o aktywności ADP-rybozylotransferazy określana jest jako



Rys. 2. Model działania toksyny błoniczej. Opis w tekście

fragment A, natomiast domeny transbłonowa i wiążąca receptor są razem określane jako fragment B. Fragment A z fragmentem B jest połączony mostkiem dwusiarczkowym. Domena transmembranowa umożliwia przetransportowanie domeny katalitycznej przez błonę komórki eukariotycznej. Domena wiążąca receptor przyłącza się do receptora na powierzchni komórki eukariotycznej [9]. Intoksykacja pojedynczej komórki eukariotycznej została schematycznie przedstawiona na Rys. 2. W pierwszym etapie toksyna wiąże się do receptora na powierzchni komórki poprzez domenę wiążącą receptor (fragment B). Następnie utworzony kompleks ulega internalizacji na drodze endocytozy za pośrednictwem receptora. W odpowiedzi na niskie pH w powstałym endosomie następuje zmiana konformacji fragmentów A i B toksyny, co prowadzi do ekspozycji domeny hydrofobowej i zwiększenia powinowactwa do cząsteczek lipidów błonowych. W następnym etapie domena transmembranowa jest wbudowywana w błonę i fragment A toksyny ulega translokacji przez błonę do cytosolu. Mostek dwusiarczkowy łączący fragment A i B ulega redukcji. Końcowym etapem translokacji jest uwolnienie fragmentu A do cytosolu, gdzie ulega on ponownemu zwinieniu. Katalityczna domena toksyny (fragment A) hamuje syntezę białek poprzez inaktywację czynnika elongacyjnego 2 (EF-2) przez jego ADP-rybozylację. Wynikiem jest śmierć komórki [2, 22].

#### 4.2. Inne czynniki zjadliwości

Mechanizm wytwarzania toksyny błoniczej przez toksynotwórcze maczugowce został dobrze poznany, ale niewiele wiadomo o innych czynnikach wirulencji kluczowych dla kolonizacji gospodarza, wnikania i uni-

kania działania systemu immunologicznego. Bakteryjne czynniki, które umożliwiają odróżnienie szczepów epidemicznych od endemicznych nie zostały dotychczas zidentyfikowane. Fakt, że pewne epidemiczne klony są odpowiedzialne za epidemie błonicy z tysiącami zgonów w krajach rozwiniętych wskazuje, że bakteryjne czynniki wirulencji, inne niż toksyna błonicza, są ważne dla wywołania choroby u ludzi. Co więcej, wzrastająca liczba przypadków chorób inwazyjnych, takich jak zapalenie wsierdza, bakteremia, zapalenie płuc, zapalenie szpiku, ropień śledziony, septyczne zapalenie stawów, spowodowanych przez nietoksynotwórcze klony *C. diphtheriae* również wskazuje na ważną rolę innych czynników wirulencji w przebiegu zakażenia [15, 28, 33, 74]. Publikowane w ostatnich dwóch latach wyniki analiz całych genomów *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis* pokazują obecność wielu genów kodujących przypuszczalne czynniki zjadliwości [52, 60, 69, 70]. Jednak ich funkcja nie została jeszcze udowodniona. Poniżej przedstawiono wybrane czynniki zjadliwości, których funkcja została zbadana u tych trzech gatunków drobnoustrojów.

#### 4.2.1. Czynniki adhezji

Przeprowadzone na liniach komórkowych badania mechanizmów przylegania, wnikania i wewnątrzkomórkowego przeżywania przeprowadzone na szczepach *C. diphtheriae* wykazały, że drobnoustroje te mają zdolność przylegania nie tylko do komórek nabłonkowych krtani (Hep-2) czy gardła (Detroit 562), ale także wnikania do tych komórek i przeżywania w nich [3, 32]. Podczas gdy receptory komórkowe gospodarza i białka związane z wnikaniem patogenu wciąż nie są znane, bakteryjne czynniki adhezji zostały ostatnio przynajmniej częściowo scharakteryzowane na poziomie molekularnym. Dotychczas opisano trzy różne typy pili u *C. diphtheriae* określone jako pili typu SpaA, SpaD i SpaH [26, 64, 68]. Geny związane z wytwarzaniem pili kodują dziewięć białek pili, oznaczonych kolejnymi literami alfabetu od SpaA do SpaI (Spa – sortase-mediated pilus assembly), oraz sześć sortaz oznaczonych od SrtA do SrtF. Pili każdego typu zbudowane są z trzech białek: głównej podjednostki piliny tworzącej trzon pili oraz dwóch pomniejszych podjednostek umiejscowionych u podstawy i na końcu pili [59]. Trzon pili typu SpaA zbudowany jest z polimerów białka SpaA, u podstawy pili oraz na całej jej długości znajduje się białko SpaB, a na końcu pili zlokalizowane jest białko SpaC. Podobnie, pili typu SpaD zbudowane są z białek SpaD, SpaE i SpaF, a pili typu SpaH budują białka SpaH, SpaI i SpaG. Za polimeryzację odpowiednich białek w strukturę pilusa odpowiadają sortazy. Geny pięciu z sześciu opisanych u *C. diphtheriae* sortaz są zgrupowane razem z genami białek pili, w których składaniu uczestniczą

– StrA z genami pili typu SpaA, SrtB/SrtC z genami pili typu SpaD i SrtD/SrtE z genami pili typu SpaH. Natomiast sortaza SrtF zlokalizowana jest oddzielnie w genomie [26, 64, 68].

Geny kodujące pili typu SpaA i SpaD zidentyfikowano również u *C. pseudotuberculosis* [70]. Natomiast w genomie *C. ulcerans* wykryto obecność dwóch grup genów odpowiedzialnych za wytwarzanie pili. Pierwsza z nich jest podobna do grupy genów kodujących pili typu SpaD u *C. diphtheriae*. Druga natomiast zawiera geny *spaB* i *spaC* oraz gen sortazy *strA*. W odróżnieniu od grupy genów kodujących pili typu SpaA u *C. diphtheriae*, brak jest tu genu kodującego białko SpaA stanowiące u *C. diphtheriae* trzon pili. Przypuszcza się, że główna podjednostka budująca te pili może być zastępowana przez białko SpaD [69]. Z drugiej jednak strony badania przeprowadzone dla szczepu NCTC 13129 *C. diphtheriae* pokazały, że pili są składane niezależnie i morfologicznie różnią się od siebie [26, 64, 68], co sugeruje że zamiana głównej podjednostki pili u *C. ulcerans* jest mało prawdopodobna. Bardziej prawdopodobne wydaje się, że białka SpaB i SpaC tworzą dimery SpaB-SpaB i SpaC-SpaC związane kowalencyjnie z powierzchnią komórki *C. ulcerans* i, z powodu braku trzonu pili, umożliwiają bliższy kontakt z tkankami gospodarza [8, 69].

Kontynuując badania właściwości pili Mandlik i wsp. [50] wykorzystali mutanty *C. diphtheriae* defektywne w wytwarzaniu poszczególnych typów pili w celu porównania ich zdolności przylegania do komórek nabłonkowych gardła, płuc i krtani. Wykazali oni, że specyficzne pili biorą udział w adhezji do wszystkich badanych typów komórek gospodarza, jednak z różną wydajnością przylegania do poszczególnych typów komórek. Co więcej, oprócz podjednostek pili również obecność innych białek ma udział w adhezji do nabłonkowych komórek krtani, gardła i płuc, ponieważ całkowita utrata zdolności do przylegania na skutek mutagenyzy genów kodujących pili i sortazę nie była obserwowana. Kolombo i wsp. [11] opisali udział w przyleganiu *C. diphtheriae* do erytrocytów białek powierzchniowych 67p i 72p nie tworzących pili. Prawdopodobnie znaczenie w adhezji *C. diphtheriae* do komórek eukariotycznych mają także hemaglutyniny, eksponowane na powierzchni komórki bakteryjnej polisacharydy i reszty cukrowe (mannoza, galaktoza, N-acetylgalaktozamina, N-acetyloglukozamina), hydrofobiny i trans-sjalidazy [52]. Można powiedzieć, że adhezja jest mechanizmem wieloczynnikowym. Istnienie kilku różnych czynników adhezji i różnych receptorów na powierzchni komórek gospodarza potwierdzają dodatkowo zaobserwowane trzy różne formy przylegania *C. diphtheriae* do komórek nabłonkowych krtani Hep-2: agregacyjny, zlokalizowany (miejscowy) i dyfuzyjny [33, 34]. Oprócz obecności adhezyn na przyleganie ma również wpływ dostępność

czynników wzrostowych, na przykład dodanie do podłoża żelaza wpływa na zdolność hemaglutynacji i wiązania pektyny [12]. Zdolność hemaglutynacji jest uznawana za wskaźnik zdolności *C. diphtheriae* do przylegania do błony komórkowej komórek eukariotycznych [52].

#### 4.2.2. Pobieranie żelaza

Żelazo jest jednym z kluczowych składników niezbędnych do wzrostu większości bakterii. W organizmach zwierząt i ludzi żelazo występuje w postaci związanej z białkami, takimi jak transferyna, laktoferyna, ferrytyna lub w postaci kompleksów jak hemina czy hemoglobina. Dlatego też większość bakterii patogennych rozwinęło systemy pozyskiwania żelaza z tkanek gospodarza. Jeden z systemów pozyskiwania żelaza jest związany z wytwarzaniem sideroforów – drobnocząsteczkowych związków chemicznych chelatujących jony żelaza [72]. *C. diphtheriae* wytwarza siderofor określany jako corynebaktyna [61]. Jego działanie związane jest z grupą genów *ciuABCDEFG*, gdzie *ciuA-D* tworzą operon, którego produkt jest podobny do systemu transportu typu ABC, *ciuE* jest wymagany do syntezy sideroforu, produkt *ciuF* wykazuje podobieństwo do białek błonowych efflux bakterii Gram-dodatnich, natomiast produkt genu *ciuG* nie wykazuje podobieństwa do żadnego znanego białka [44]. Operon *ciuABCDE* został również wykryty u *C. pseudotuberculosis* [60, 70]. Ponadto u tego gatunku wykryto drugi zestaw genów systemu transportu typu ABC – geny *fagA*, *fagB*, *fagC* i *fagD* – również związany z pobieraniem żelaza w środowisku o ograniczonym jego dostępie [4, 60].

*C. diphtheriae*, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis* wytworzyły również systemy pozyskiwania żelaza z hemu i heminy, kodowane przez geny *hmuT*, *hmuU*, *hmuV* i *hmuO*, z których pierwsze trzy tworzą operon. Operon *hmuTUV* także koduje system transportu typu ABC, natomiast *hmuO* koduje oksygenazę hemu, która katalizuje degradację wewnątrzkomórkowego hemu i tym samym uwolnienie żelaza [62, 70]. Allen i Schmitt [1] wykazali udział w pozyskiwaniu żelaza z hemu i heminy dodatkowych genów *htaA* i *htaB*. Zaproponowali oni model, zgodnie z którym hemina wiąże się z HtaA, a następnie za pośrednictwem HtaB jest przenoszona na HmuT. HmuT dostarcza heminę do permeazy HmuU, będącej składnikiem systemu transportu typu ABC, co umożliwia pobranie heminy do cytosolu komórki bakteryjnej. W cytosolu na skutek degradacji heminy przez enzym HmuO zostają uwolnione jony żelaza [1].

#### 4.2.3. Fosfolipaza D (Pld)

Fosfolipaza D kodowana przez gen *pld* jest enzymem degradującym sfingomielinę. Uznawana jest za główny czynnik wirulencji *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis*.

Umożliwia przeżywanie i rozprzestrzenianie się bakterii w tkankach gospodarza [53, 69]. Enzym Pld o podobnej sekwencji aminokwasowej wśród bakterii wytwarzają tylko wspomniane wyżej dwa gatunki oraz *Arcanobacterium haemolyticum* [54]. Co ciekawe, podobny enzym jest wytwarzany jako egzotoksyna przez pająki z rodzaju *Loxosceles* [71]. Wykazano, że zarówno enzym bakteryjny, jak też wytwarzany przez pająki, charakteryzuje podobny efekt patofizjologiczny obejmujący agregację płytek krwi, nadprzepuszczalność śródbłonkową, hemolizę zależną od dopełniacza oraz neutrofilozależną martwicę skóry [17].

#### 4.2.4. Proteazy serynowe

Proteazy serynowe są sekrecyjnymi enzymami hydrolizującymi wiązania peptydowe. Uczestniczą w patogenezie zakażeń poprzez modulację swoistych i nieswoistych mechanizmów obronnych gospodarza oraz destrukcję tkanek gospodarza. W genomie *C. ulcerans* stwierdzono obecność dwóch genów – *tspA* i *vsp1* – kodujących te enzymy. Dodatkowo w szczepie wyizolowanym od pacjenta stwierdzono obecność trzeciego genu kodującego protezę serynową oznaczonego jako *vsp2*. Obecność dodatkowego genu kodującego tego typu enzym może sugerować, że szczep wytwarza więcej proteaz serynowych niż szczepy nie posiadające dodatkowego genu, może pomagać w interakcji patogen-gospodarz oraz w przeżywaniu bakterii w niekorzystnym środowisku [69]. Analiza genomu *C. pseudotuberculosis* również wykazała obecność genów kodujących proteazy serynowe [70].

#### 4.2.5. Neuraminidaza H (NanH)

Neuraminidazy stanowią grupę hydrolaz glikozylowych, które katalizują usuwanie końcowych kwasów sjałowych z różnych glikokoniugatów i wykazują duże powinowactwo do reszt kwasu sjałowego związanego z resztami cukrowymi polisacharydów eksponowanych na powierzchni komórki gospodarza. Enzymy te biorą udział w modyfikowaniu zdolności komórek gospodarza do odpowiedzi na zakażenie bakteryjne. Neuraminidazę wytwarzają zarówno *C. ulcerans*, *C. diphtheriae*, jak i *C. pseudotuberculosis* [52, 69, 70].

## 5. Podsumowanie

Wprowadzenie w latach 40. obowiązkowych szczepień przeciwbłoniczych w wielu krajach Europy pozwoliło na znaczące zmniejszenie liczby zachorowań na błonicę. Jednak ostatnie lata pokazują, że *C. ulcerans* i *C. diphtheriae* są powracającymi patogenami człowieka. Obserwowana zmienność genetyczna tych patogenów

prawdopodobnie umożliwia im zasiedlenie nowej niszy ekologicznej. Obecnie izolowane w krajach o wysokim odsetku zaszczepienia przeciw błonicy szczepki *C. diphtheriae* nie wytwarzają toksyny błonicy, ale posiadają zdolność wnikania do tkanek i wywoływania zakażeń systemowych. Niegdyś sporadyczne, obecnie coraz częściej odnotowywane są także zakażenia ludzi *C. ulcerans*. Zmienność cech zjadliwości jest związana z obecnością licznych wysp patogenności w genomach *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* i *C. pseudotuberculosis*. Porównanie genomów dwóch szczepów *C. diphtheriae*: NCTC 13129 i C7(-) pokazało, że 11 z 13 wysp patogenności wykrytych w szczepie NCTC 13129 nie było obecnych w szczepie C7(-) [36]. Różnice w składzie genów stwierdzono również porównując szczep *C. ulcerans* izolowany z zapalenia płuc zakończonego zgonem pacjenta ze szczepem z wymazu z nosa psa nie wykazującego objawów chorobowych [69].

Wzrost zainteresowania badaczy czynnikami zjadliwości innymi niż toksyna błonicy u potencjalnie toksynotwórczych gatunków maczugowców pojawił się dopiero w ostatnich latach, dlatego wciąż jeszcze niewiele na ten temat wiadomo. Prowadzone analizy całych genomów pokazują istnienie wielu potencjalnych czynników zjadliwości, ale także licznych genów kodujących białka o nieznanym celu. Pełne poznanie czynników zjadliwości tych drobnoustrojów pozwoli na zrozumienie patogenności wywoływanych przez nie zakażeń.

## Piśmiennictwo

- Allen C.E., Schmitt M.P.: HtaA is an iron-regulated hemin binding protein involved in the utilization of heme iron in *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **191**, 2638–2648 (2009)
- Bennett M.J., Eisenberg D.: Refined structure of monomeric diphtheria toxin at 2.3 Å resolution. *Protein Sci.* **3**, 1464–1475 (1994)
- Bertuccini L., Baldassarri L., von Hunolstein C.: Internalization of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory epithelial cells. *Microbiol. Path.* **37**, 111–118 (2004)
- Billington S.J., Esmay P.A., Songer J.G., Jost H.: Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**, 41–45 (2002)
- Bonmarin I., Guiso N., Le Fleche-Mateos A., Patey O., Grimont P.A.D., Levy-Bruhl D.: Diphtheria: a zoonotic disease in France? *Vaccine*, **27**, 4196–4200 (2009)
- Bregenzer T., Frei R., Ohnacker H., Zimmerli W.: *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in a butcher. *Clin. Microb. Infect.* **3**, 696–698 (1997)
- Centers for Disease Control and Prevention. Travelers' Health – Yellow Book. <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/diphtheria.aspx> (24 lipca 2012)
- Chang C., Mandlik A., Das A., Ton-That H.: Cell surface display of minor pilin adhesins in the form of a simple heterodimeric assembly in *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol. Microbiol.* **79**, 1236–1247 (2011)
- Choe S., Bennett M.J., Fujii G., Curmi P.M., Kantardjieff K.A., Collier R.J., Eisenberg D.: The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature*, **357**, 216–222 (1992)
- Clarridge J.E., Spiegel C.A.: *Corynebacterium* and miscellaneous irregular Gram-positive rods, *Erysipelothrix*, and *Gardnerella* (w) Manual of Clinical Microbiology, red. Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover R.H., ASM Press, Washington, D.C., 1995, s. 357.
- Colombo A.V., Hirata R.Jr., Rocha de Souza C.M., Monteiro-Leal L.H., Previato J.O., Formiga L.C.D., Andrade A.F.B., Mattos-Guaraldi A.L.: *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**, 235–239 (2001)
- de Oliveira Moreira L., Andrade A.F.B., Vale M.D., Souza S.M.S., Hirata R.Jr., Asad L.O.B., Asad N.R., Monteiro-Leal L.H., Previato J.O., Mattos-Guaraldi A.L.: Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5907–5913 (2003)
- De Zoysa A., Efstratiou A.: Eight International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria and the Diphtheria Surveillance Network – June 2004: Progress is needed to sustain control of diphtheria in European Region. *Eurosurveill.* **9**, 489 (2004)
- De Zoysa A., Hawkey P.M., Engler K., George R., Mann G., Reilly W., Taylor D., Efstratiou A.: Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4377–4381 (2005)
- DeWinter L., Bernard K.A., Romney M.C.: Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3447–9 (2005)
- Dias A.A.S.O., A.L. Mattos-Guaraldi i wsp.: *Corynebacterium ulcerans* isolated from an asymptomatic dog kept in an animal shelter in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **10**, 743–748 (2010)
- Dias A.A.S.O., A.L. Mattos-Guaraldi i wsp.: Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*. *Vet. Microbiol.* **153**, 323–331 (2011)
- DIPNET. Diphtheria Surveillance Network. Realtime Case Summary Information From EU Partners. [http://www.dipnet.org/summary\\_analysis.secure.php](http://www.dipnet.org/summary_analysis.secure.php) (24 lipca 2012)
- Edmunds W.J., E. Miller i wsp.: The sero-epidemiology of diphtheria in Western Europe. *Epidemiol. Infect.* **125**, 113–125 (2000)
- European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. Stockholm: ECDC; 2010.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report. Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2010.
- Falnes P.O., Sandvig K.: Penetration of protein toxins into cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 407–413 (2000)
- Farfour E., Badell E., Zasada A., Hotzel H., Tomaso H., Guillot S., Guiso N.: Characterization and comparison of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolates from France and Poland. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 173–175 (2012)
- Funke G., vonGraevenitz A., Clarridge III J.E., Bernard K.A.: Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 125–159 (1997)
- Galbraith N.S., Forbes P., Clifford C.: Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wales 1951–80. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*, **284**, 1761–1765 (1982)

26. Gaspar A.H., Ton-That H.: Assembly of distinct pilus structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **188**, 1526–1533 (2006)
27. Groman N.B.: Conversion by corynephages and its role in the natural history of diphtheria. *J. Hyg. (Camb.)*, **93**, 405–417 (1984)
28. Gubler J., Huber-Schneider C., Gruner E., Altwegg M.: An outbreak of nontoxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infection: single bacterial clone causing invasive infection among Swiss drug users. *Clin. Infect. Dis.* **27**, 1295–1298 (1998)
29. Hall A.J., M.L. Tondella i wsp.: Novel *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 688–691 (2010)
30. Hart R.J.C.: *Corynebacterium ulcerans* in humans and cattle in North Devon. *J. Hyg. (Camb.)*, **92**, 161–164 (1984)
31. Henricson B., Segarra M., Garvin J., Burns J., Jenkins S., Kim C., Popovic T., Golaz A., Akey B.: Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* associated with an equine wound infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* **12**, 253–257 (2000)
32. Hirata R. Jr., Napoleao F., Monteiro-Leal L.H., Andrade A.F.B., Nagao P.E., Formiga L.C.D., Fonseca L.S., Mattos-Guaraldi A.L.: Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 115–119 (2002)
33. Hirata R.Jr., Pereira G.A., Filardy A.A., Gomes D.L.R., Damasco P.V., Rosa A.C.P., Nagao P.E., Pimenta F.P., Mattos-Guaraldi A.L.: Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **41**, 986–991 (2008)
34. Hirata R.Jr., Souza S.M.S., Rocha de Souza C.M., Andrade A.F.B., Monteiro-Leal L.H., Formiga L.C.D., Mattos-Guaraldi A.L.: Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerization by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microbial. Path.* **36**, 125–130 (2004)
35. Hogg R.A., Wessels J., Hart J., Efstratiou A., De Zoysa A., Mann G., Allen T., Pritchard G.C.: Possible zoonotic transmission of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from companion animals in a human case of fatal diphtheria. *Vet. Rec.* **165**, 691–692 (2009)
36. Iwaki M., Komiya T., Yamamoto A., Ishiwa A., Nagata N., Arakawa Y., Takahashi M.: *Corynebacterium diphtheriae* C7(–) and PW8 strains: Genome organization and pathogenicity. *Infect. Immun.* **78**, 3791–800 (2010)
37. Join-Lambert O.F., Ouache M., Canioni D., Beretti J.L., Blanche S., Berche P., Kayal S.: *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **25**, 848–851 (2006)
38. Jones D., Collins M.D.: Irregular, nonsporing Gram-positive rods (w) Bergey's manual of systemic bacteriology, volume 2, red. Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G., Williams & Wilkins, Baltimore, 1986, s. 1261.
39. Keslin M.H., McCoy E.L., McCusker J.J., Lutch J.S.: *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A new cause of infectious and eosinophilic pneumonia. *Am. J. Med.* **67**, 228–231 (1979)
40. Kisely S.R., Proce S., Ward T.: *Corynebacterium ulcerans*: a potential cause of diphtheria. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* **4**, R63–R64 (1994)
41. Komiya T., Seto Y., De Zoysa A., Iwaki M., Hatanaka A., Tsunoda A., Arakawa Y., Kozaki S., Takahashi M.: Two Japanese *Corynebacterium ulcerans* isolates from the same hospital: ribotype, toxigenicity and serum antitoxin titre. *J. Med. Microbiol.* **59**, 1497–1504 (2010)
42. Kwaszewska A., Anusz Z.: Appearance in domestic animals of *Corynebacterium diphtheriae* and other *Corynebacterium* strains pathogenic for man. *Przegl. Epidemiol.* **33**, 269–276 (1979)
43. Kraszewska A.K., Szewczyk E.M.: Postępy w taksonomii i metodach identyfikacji izolowanych od ludzi bakterii z rodzaju *Corynebacterium*. *Post. Mikrobiol.* **50**, 155–167 (2011)
44. Kunkle C.A., Schmitt M.P.: Analysis of a DtxR-regulated iron transport and siderophore biosynthesis gene cluster in *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **187**, 422–433 (2005)
45. Kuszewski K.: Błonica (w) Choroby zakaźne i pasożytnicze, red. Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A., alfa-medica Press, Bielsko-Biała, 2007, s. 40.
46. Lartigue M.-F., Monnet X., Le Fleche A., Grimont P.A.D., Benet J.-J., Durrbach A., Fabre M., Nordmann P.: *Corynebacterium ulcerans* in an immunocompromised patient with diphtheria and her dog. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 999–1001 (2005)
47. Leggett B.A., De Zoysa A., Abbott Y.E., Leonard N., Markey B., Efstratiou A.: Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* isolated from a wound in a horse. *Vet. Rec.* **166**, 656–658 (2010)
48. Liu D.T., Chan W.M., Fan D.S., Lam D.S.: An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Br. J. Ophthalmol.* **89**, 245–246 (2005)
49. Love J.F., van der Spek J.C., Marin V., Guerrero L., Logan T.M., Murphy J.R.: Genetic and biophysical studies of diphtheria toxin repressor (DtxR) and the hyperactive mutant DtxR(E175K) support a multistep model of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2506–2511 (2004)
50. Mandlik A., Swierczynski A., Das A., Ton-That H.: *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **64**, 111–124 (2007)
51. Mattos-Guaraldi A.L., Formiga L.C.D., Pereira G.A.: Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microb. Infect.* **2**, 1507–1512 (2000)
52. Mattos-Guaraldi A.L., Formiga L.C.D.: Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from case of endocarditis. *Curr. Microbiol.* **37**, 156–158 (1998)
53. McKean S.C., Davies J.K., Moore R.J.: Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. *Microbiology*, **153**, 2203–2211 (2007)
54. McNamara P.J., Cuevas W.A., Songer J.G.: Toxic phospholipases D of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* and *Arcanobacterium haemolyticum*: cloning and sequence homology. *Gene*, **156**, 113–118 (1995)
55. Oram M., Woolston J.E., Jacobson A.D., Holmes R.K., Oram D.M.: Bacteriophage-base vectors for site-specific insertion of DNA in the chromosome of corynebacteria. *Gene*, **391**, 53–62 (2007)
56. Parish H.S., O'Kell C.C.: On the isolation of virulent diphtheria bacilli from wounds of horses. *Br. J. Exp. Pathol.* **7**, 173–174 (1926)
57. Patey O., C. Lafaix i wsp.: Clinical and molecular study of *Corynebacterium diphtheriae* systemic infections in France. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 441–445 (1997)
58. Peel M.M., Palmer G.G., Stacpoole A.M., Kerr T.G.: Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin. Infect. Dis.* **24**, 185–191 (1997)

59. Rogers E.A., Das A., Ton-That H.: Adhesion by pathogenic corynebacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* **715**, 91–103 (2011)
60. Ruiz J.C., V. Azevedo i wsp.: Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PlosONE*, **6**, e18551 (2011)
61. Russell L.M., Holmes R.K.: Highly toxigenic but avirulent Park-Williams 8 strain of *Corynebacterium diphtheriae* does not produce siderophore. *Infect. Immun.* **47**, 575–578 (1985)
62. Schmitt MP.: Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *J. Bacteriol.* **179**, 838–845 (1997)
63. Schuegger R., Schoetner C., Długaiczek J., Lichtenfeld I., Trouillier A., Zeller-Peronnet V., Busch U., Berger A., Kugler R., Hormansdorfer S., Sing A.: Pigs as source for toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1314–1315 (2009)
64. Swierczynski A., Ton-That H.: Type III pilus of corynebacteria: pilus length is determined by the level of its major pilin subunit. *J. Bacteriol.* **188**, 6318–6325 (2006)
65. Taylor D.J., Efstratiou A.: Diphtheria toxin production by *Corynebacterium ulcerans* from cats. *Vet. Rec.* **150**, 355 (2002)
66. Taylor J., Saveeda-Campos M., Harwood D., Pritchard G., Raphaely N., Kapadia S., Efstratiou A., White J., Balasegaram S.: Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* infection in veterinary student in London, United Kingdom, May 2010. *Eurosurveill.* **15**, 19634 (2010)
67. Tiwari T.S.P., Golaz A., Yu D.T., Ehresmann K.R., Jones T.E., Hill H.E., Cassiday P.K., Pawlowski L.C., Moran J.S., Popovic T., Wharton M.: Investigations of 2 cases of diphtheria-like illness due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 395–401 (2008)
68. Ton-That H., Schneewind O.: Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol. Microbiol.* **50**, 1429–1438 (2003)
69. Trost E., A. Tauch i wsp.: Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. *BMC Genomics*, **12**, 383 (2011)
70. Trost E., Tauch A.: The complete genome sequence of *Corynebacterium pseudotuberculosis* FRC41 isolated from a 12-year-old girl with necrotizing lymphadenitis reveals insights into gene regulatory networks contributing to virulence. *BMC Genomics*, **11**, 728 (2010)
71. van Meeteren L.A., Frederiks F., Giepmans B.N., Pedrosa M.F., Billington S.J., Jost B.H., Tambourgi D.V., Moolenaar W.H.: Spider and bacterial sphingomyelinases D target cellular lysophosphatidic acid receptors by hydrolyzing lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* **279**, 10833–10836 (2004)
72. Zajdowicz S., Haller J.C., Krafft A.E., Hunsucker S.W., Mant C.T., Duncan M.W., Hodges R.S., Jones D.N.M., Holmes R.K.: Purification and structural characterization of siderophore (corynebactin) from *Corynebacterium diphtheriae*. *PLoS ONE*, **7**, e34591 (2012)
73. Zasada A.A., Baczevska-Rej M., Wardak S.: An increase in non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections in Poland – molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. *Int. J. Infect. Dis.* **14**, e907–e912 (2010)
74. Zasada A.A., Baczevska-Rej M.: Typy szczepów *Corynebacterium diphtheriae* izolowanych w Polsce w latach 2004–2008. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **60**, 183–190 (2008)





Ewa Szczuka<sup>1\*</sup>, Nicoletta Makowska<sup>1</sup>, Adam Kaznowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii,  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań

Wpłynęło w maju 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2.1. Różnicowanie gatunków na podstawie sekwencji 16S rDNA. 2.2. Wykorzystanie polimorfizmu międzygenowego 16S rRNA i 23S rRNA do identyfikacji gronkowców. 2.3. Identyfikacja gronkowców na podstawie sekwencji oraz analizy restrykcyjnej genu *gap*. 2.4. Sekwencja genu *hsp60* jako marker genetyczny stosowany w klasyfikacji i identyfikacji gronkowców. 2.5. Polimorfizm genu *dnaJ* wykorzystany w identyfikacji *Staphylococcus* spp. 2.6. Różnicowanie gatunków gronkowców na podstawie sekwencji genu *tuf*. 2.7. Diagnostyka gatunków gronkowców w oparciu o polimorfizm genu *sodA*. 2.8. Identyfikacja na podstawie sekwencji genu *ropB*. 3. Zastosowanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym w diagnostyce gronkowców. 4. Wykorzystanie spektrometrii mas w identyfikacji gronkowców. 5. Podsumowanie

### Molecular methods for the identification of bacteria from the genus *Staphylococcus*

**Abstract:** Staphylococci are increasingly recognized as etiological agent of many opportunistic human and animal infections, indicating the need for rapid and accurate identification of these bacteria. In recent years, a significant progress in the identification and phylogenetic studies of *Staphylococcus* species has been made. In this paper we describe several molecular methods used in taxonomy and identification of staphylococci. The analysis of 16S rRNA gene, *gap* gene (coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *hsp60* gene (encoding heat shock protein Hsp60), *dnaJ* gene (encoding heat shock protein Hsp40), *tuf* gene (encoding elongation factor Tu), *sodA* gene (encoding superoxide dismutase), *ropB* gene (encoding the beta subunit of RNA polymerase) has been used as tool for the identification of *Staphylococcus* isolates. Besides the sequence analysis, the PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of core genes (16S rRNA, *gap*, *hsp60*, *dnaJ*, *tuf*) has been described. Attention is also paid to new molecular methods such as real-time PCR and mass spectrometry.

1. Introduction. 2.1. Differentiation of staphylococcal species based on 16S rRNA gene sequence. 2.2. Use of the polymorphism of the 16S-23S rRNA spacer for staphylococci identification. 2.3. Identification of staphylococci using the sequence and restriction fragment length polymorphism analysis of *gap* gene. 2.4. The sequence of the *hsp60* gene as a marker for classification and identification of staphylococci. 2.5. Use of polymorphism of *dnaJ* gene for the identification of *Staphylococcus* spp. 2.6. Differentiation of staphylococcal species based on *tuf* gene sequence. 2.7. Use of the polymorphism of *sodA* gene in diagnostics of staphylococcal species. 2.8. Identification based on *ropB* gene sequence. 3. Application of real-time PCR in diagnostics of staphylococci. 4. Application of mass spectrometry in the identification of staphylococcal isolates. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** *Staphylococcus*, identyfikacja, genetyczne zróżnicowanie  
**Key words:** *Staphylococcus*, identification, genetic diversity

## 1. Wstęp

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* powszechnie występują w środowisku naturalnym. Wiele gatunków gronkowców stanowi naturalny składnik flory bakteryjnej skóry i błon śluzowych człowieka. Szczepy gronkowców są również izolowane z produktów pochodzenia zwierzęcego oraz gleby, wody, kurzu i powietrza [15, 22, 39]. Obecnie do rodzaju *Staphylococcus* zalicza się 47 gatunki, przy czym w obrębie 10 gatunków wyodrębniono podgatunki [1, 7, 15, 17, 30, 32, 36, 45, 47] (Tab. I). Istniejący historyczny podział na gronkowce koagulazo-dodatnie i koagulazo-ujemne oparty jest na zdolności lub braku do wytwarzania zewnątrzkomórkowego białka stymulującego proces krzepnięcia plazmy. Do gronkowców koagulazo-dodatnich należą następu-

jące gatunki: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. delphini* oraz niektóre szczepy zaliczane do gatunku *S. hyicus* [22, 34, 49]. Największe znaczenie kliniczne ma gronkowiec złocisty (*S. aureus*), który odpowiedzialny jest za wiele różnych zakażeń człowieka.

Gronkowce koagulazo-ujemnych wywołują zakażenia głównie u osób z obniżoną odpornością oraz ludzi, u których w leczeniu zastosowano różnego rodzaju cewniki, protezy oraz implanty ortopedyczne [28, 37]. Za główny czynnik wirulencji tej grupy bakterii uważa się zdolność tworzenia złożonych struktur biofilmowych na powierzchniach abiotycznych jak również na powierzchni uszkodzonej tkanki [8, 15]. Wśród gronkowców koagulazo-ujemnych wywołujących zakażenia u ludzi gatunkiem dominującym jest *S. epidermidis*.

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań; tel. 61 829 59 36; e-mail: ewasz@amu.edu.pl

Tabela I  
 Gatunki i podgatunki wyróżnione w rodzaju *Staphylococcus* sp.  
 [1, 7, 15, 17, 30, 32, 36, 45, 47]

<i>S. agnetis</i>	<i>S. lentus</i>
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	<i>S. lugdunensis</i>
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>S. lutrae</i>
<i>S. arlettae</i>	<i>S. massiliensis</i>
<i>S. auricularis</i>	<i>S. microti</i>
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	<i>S. muscae</i>
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	<i>S. nepalensis</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. pasteurii</i>
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	<i>S. pettenkoferi</i>
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i>	<i>S. petrasii</i>
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. piscifermentans</i>
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	<i>S. rostri</i>
<i>S. condimenti</i>	<i>S. saccharolyticus</i>
<i>S. delphini</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>
<i>S. devriesei</i>	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>
<i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i>	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>
<i>S. felis</i>	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>
<i>S. fleurettii</i>	<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>
<i>S. gallinarum</i>	<i>S. simiae</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. simulans</i>
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	<i>S. stepanovicii</i>
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	<i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i>
<i>S. hyicus</i>	<i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i>
<i>S. intermedius</i>	<i>S. vitulinus</i>
<i>S. jettensis</i>	<i>S. warneri</i>
<i>S. kloosii</i>	<i>S. xylosum</i>

Coraz częściej obserwuje się infekcje wywołane przez szczepy *S. haemolyticus*, *S. hominis* i *S. saprophyticus*. Natomiast znacznie rzadziej czynnikiem etiologicznym infekcji człowieka są *S. warneri*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. caprae*, *S. xylosum*, *S. sciuri*, *S. chromogenes*, *S. auricularis*, *S. schleiferi*, *S. cohnii*, *S. quorum*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* [5, 12, 21, 38, 42, 43, 48–50]. Z materiałów pobranych od zwierząt izolowane są głównie *S. intermedius*, *S. sciuri* i *S. hyicus* [15, 33, 34]. Rosnący udział gronkowców koagulazo-ujemnych w zakażeniach ludzi i zwierząt stwarza konieczność prawidłowej ich identyfikacji, co z kolei umożliwi precyzyjne określenie roli poszczególnych gatunków gronkowców w chorobotwórczości. Fenotypowa identyfikacja gronkowców koagulazo-ujemnych jest długotrwała i uciążliwa. Powszechnie stosowane testy komercyjne nie odznaczają się wysoką wiarygodnością [3, 39, 53]. Na przestrzeni kilkunastu ostatnich lat zaproponowano

kilkanaście metod opartych na analizie DNA bakteriynego, które zdaniem autorów umożliwiają identyfikację gatunków gronkowców.

## 2.1. Różnicowanie gatunków na postawie sekwencji 16S rDNA

Ze względu na wysoce konserwatywny charakter 16S rDNA gronkowców nie jest możliwe różnicowanie wszystkich gatunków [46]. K w o k i wsp. [26] określili, że podobieństwo sekwencji 16S rDNA szczepów reprezentujących 29 gatunków gronkowców jest bardzo wysokie i wynosi od 92 do 99%. Jednak B e c k e r i i wsp. [3] wykazali możliwość różnicowania 38 gatunków gronkowców na podstawie sekwencji końcowego regionu genu 16S rRNA o długości 464 pz, obejmującego nukleotydy od pozycji 54 do 510. Określono, że poszczególne gatunki obejmują szczepy bakteriynne z przynajmniej 98,7% podobieństwem sekwencji nukleotydowej. Wszystkie szczepy referencyjne i typowe poszczególnych gatunków gronkowców mogły być rozróżnione z wyjątkiem *S. intermedius* i *S. delphini*. Taką samą sekwencją nukleotydową miały szczepy *S. pulvereri* i *S. vitulinus*, które obecnie uważane są za jeden gatunek. Wynik analizy sekwencji wyżej wymienionego fragmentu 16S rDNA umożliwił różnicowanie podgatunków w obrębie *S. carnosus*, *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. schleiferi* i *S. succinus*. Natomiast niemożliwe było różnicowanie podgatunków *S. aureus*, *S. capitis*, *S. equorum*, *S. saprophyticus* i *S. sciuri*.

W 2010 roku ukazała się praca przedstawiająca wyniki badań mające na celu opracowanie metody identyfikacji gronkowców w oparciu o analizę restrykcyjną fragmentu sekwencji 16S rDNA. O n n i i wsp. [31] zaprojektowali startery umożliwiające amplifikację zmiennego regionu genu 16S rRNA. W wyniku reakcji PCR otrzymano produkt o wielkości 1403 pz, który następnie był podany trawieniu enzymami restrykcyjnymi: *RsaI*, *PstI* i *AluI*. Uzyskane fragmenty DNA rozdzielano elektroforetycznie w denaturującym żelu poliakrylamidowym. O n n i i wsp. [31] do swych badań włączyli 9 szczepów referencyjnych oraz liczną grupę szczepów wyizolowanych z mleka owiec (tabela II).

## 2.2. Wykorzystanie polimorfizmu międzygenowego 16S rRNA i 23S rRNA do identyfikacji gronkowców

C o u t o i wsp. [6] zaproponowali wykorzystanie polimorficznych regionów pomiędzy genami kodującymi 16S rRNA i 23S rRNA (ITS, internal transcribed spacer) do identyfikacji gronkowców. Regiony ITS odznaczają się różną wielkością oraz wysokim stopniem zróżnicowania sekwencji u poszczególnych gatunków bakterii. Zalety i wady tej metody przedsta-

Tabela II

Porównanie wybranych molekularnych metod identyfikacji bakterii z rodzaju *Staphylococcus*

Metoda	Zalety	Wady
<b>RFLP sekwencji 16S rDNA</b> [31]	– możliwość różnicowania 9 szczepów referencyjnych: <i>S. epidermidis</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. hominis</i>	– brak możliwości różnicowania izolatów należących do gatunków <i>S. epidermidis</i> , <i>S. caprae</i> i <i>S. capitis</i>
<b>analiza polimorfizmu międzygenowego 16S rRNA i 23S rRNA</b> [6]	– unikatowe profile dla 29 typowych i referencyjnych szczepów gronkowców – możliwość różnicowania trzech podgatunków <i>S. sciuri</i>	– wysokie podobieństwo profili DNA w obrębie gronkowców należących do grupy <i>S. saprophyticus</i> obejmującej następujące gatunki: <i>S. cohnii</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. saprophyticus</i> – wysokie podobieństwo wzorów DNA szczepów <i>S. schleiferi</i> i <i>S. vitulus</i> oraz <i>S. piscifermentas</i> i <i>S. carnosus</i> – brak możliwości odróżnienia podgatunków w obrębie <i>S. cohnii</i> i <i>S. schleiferi</i>
<b>RFLP genu <i>gap</i></b> [27]	– możliwość identyfikacji 28 gatunków gronkowców	– i <i>S. capitis</i> przeprowadzenie analizy RFLP wymaga zastosowania trzech enzymów restrykcyjnych, <i>DdeI</i> , <i>BspHI</i> i <i>TaqI</i> .
<b>RFLP genu <i>hsp60</i></b> [2]	– możliwość identyfikacji 12 szczepów typowych reprezentujących najczęściej izolowane gatunki gronkowców: <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> , <i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> , <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. schleiferi</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. xylosum</i> i <i>S. warneri</i>	– zróżnicowane profile DNA uzyskane dla szczepów <i>S. aureus</i> i <i>S. lugdunensis</i> , możliwe jest jednak określenie przynależności gatunkowej tych izolatów
<b>RFLP genu <i>dnaI</i></b> [16]	– pozwala na uwidocznienie różnic pomiędzy profilami DNA 41 referencyjnych szczepów	– metoda ta umożliwia różnicowanie podgatunków w obrębie: <i>S. capitis</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. cohnii</i> i <i>S. hominis</i>
<b>RFLP genu <i>tuf</i></b> [24]	– możliwość identyfikacji 11 najczęściej izolowanych gatunków gronkowców: <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. lugdunensis</i>	– przeprowadzenie tej analizy wymaga zastosowania czterech enzymów restrykcyjnych: <i>BstZ17I</i> , <i>MseI</i> , <i>BieI</i> i <i>HinI</i>
<b>Analiza sekwencyjna genu <i>sodA</i></b> [35]	– pozwala na różnicowanie 40 typowych szczepów gronkowców	– brak możliwości różnicowania większości podgatunków gronkowców: <i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> i <i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i> , <i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i> i <i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i> , <i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> i <i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> , <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> i <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> , <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> i <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> , <i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i> i <i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>
<b>Analiza sekwencyjna genu <i>rpoB</i></b> [9]	– umożliwia różnicowanie 29 gatunków typowych szczepów gronkowców – polimorfizm sekwencji genu <i>rpoB</i> pozwala na odróżnienie gatunku <i>S. caprae</i> od <i>S. capitis</i>	

wiono w tabeli II. Przy zastosowaniu metody ITS-PCR zbadano przynależność 617 szczepów wyizolowanych od hospitalizowanych pacjentów. Zidentyfikowano 11 gatunków gronkowców (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. aureus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. caprae*, *S. carnosus*, *S. cohnii*), 25 izolatów nie udało się zaklasyfikować do żadnego gatunku. Autorzy zaznaczają, że wzory DNA uzyskane dla szczepów należących do gatunków *S. aureus*, *S. caprae*, *S. haemolyticus* i *S. lugdunensis* cechowały się

wysokim polimorfizmem, pomimo tego, według wyżej wymienionych autorów możliwa jest wiarygodna diagnostyka gronkowców.

### 2.3. Identyfikacja gronkowców na podstawie sekwencji oraz analizy restrykcyjnej genu *gap*

Yugueros i wsp. [51, 52] zaproponowali identyfikację gatunków i podgatunków gronkowców na podstawie analizy restrykcyjnej genu *gap*. Koduje on

białko, dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Gen *gap* jest konserwatywny, jednakże fragment o wielkości 933 pz (obejmujący nukleotydy od pozycji 22 do 956) odznacza się zmiennością, która może być wykorzystana do identyfikacji gronkowców. W wyniku trawienia enzymem *AluI* i rozdziału w żelu agarozowym uzyskano wzory składające się od 5 do 9 fragmentów DNA [51]. Przeprowadzenie analizy RFLP genu *gap* wymaga zastosowania aparatu do elektroforezy z długą drogą rozdziału elektroforetycznego oraz agaru MetaPhor, który umożliwia rozdzielenie małych fragmentów DNA. Zaobserwowano polimorfizm wzorów DNA w obrębie gatunków *S. epidermidis*, *S. hominis* i *S. simulans*. Natomiast dla 120 szczepów *S. aureus* uzyskano taki sam profil DNA. Yu g u e r o s i wsp. [52] stwierdzili możliwość identyfikacji 24 gatunków gronkowców. W 2007 roku L a y e r i wsp. wskazali na możliwość identyfikacji 28 gatunków gronkowców na podstawie analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych terminalnego regionu genu *gap*, który odznacza się wysokim stopniem zmienności sekwencji (tabela II).

Analiza częściowej sekwencji genu *gap* pozwoliła na utworzenie drzewa filogenetycznego i wyłonienie czterech grup *S. hyicus/S. intermedius*, *S. haemolyticus/S. simulans*, *S. sciuri* oraz *S. aureus/S. epidermidis* [13]. Podobieństwo sekwencji szczepów zaliczanych do jednego gatunku było bardzo wysokie, np. dla szczepów gatunku *S. epidermidis* wynosiło powyżej 99%. Wykazano większy polimorfizm sekwencji genu *gap* w porównaniu z sekwencjami genów 16S rRNA, *rpoB*, *hsp60* i *sodA*. Sekwencja genu *gap* pozwoliła na zróżnicowanie gatunków blisko spokrewnionych, *S. caprae* i *S. capitis*, co nie było możliwe w oparciu o sekwencję 16S rDNA.

#### 2.4. Sekwencja genu *hsp60* jako marker genetyczny stosowany w klasyfikacji i identyfikacji gronkowców

Pierwsze badania dotyczące możliwości identyfikacji gronkowców na podstawie analizy sekwencji genu *hsp60* zostały przeprowadzone przez G o h a i wsp. [14]. Gen *hsp60* koduje 60 kDa białko szoku cieplnego, określane także jako HSP60 lub GroEL. Białko to towarzyszy przy prawidłowym fałdowaniu białek i występuje w komórkach organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. *Hsp60* reprezentuje gen metabolizmu podstawowego (housekeeping gene) i ze względu na wysoce konserwatywny charakter jest użytecznym markerem do badań filogenetycznych [25]. K w o k i wsp. [26] stwierdzili, że podobieństwo sekwencji fragmentu genu *hsp60* o wielkości 600 pz 28 gatunków gronkowców wynosi od 74 do 93%. Na podstawie analizy sekwencji fragmentu genu *hsp60* czterdziestu gatunków i podgatunków gronkowców skonstruowano dendrogram. Wyodrębniono 6 grup reprezentowanych przez następujące gatunki:

*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. intermedius*, *S. sciuri*. Otrzymane wyniki wykazują zgodność z rezultatami uzyskanymi na podstawie sekwencji genu 16S rRNA [26]. Zaproponowano różnicowanie gatunków gronkowców na podstawie analizy restrykcyjnej fragmentu genu *hsp60*. Produkt amplifikacji o wielkości 550 pz uzyskano dla 12 szczepów typowych reprezentujących najczęściej izolowane gatunki gronkowców. W wyniku analizy restrykcyjnej wyżej wymienionego amplikonu enzymem *AluI* otrzymano profile DNA składające się z 1–4 fragmentów, które były charakterystyczne dla 12 szczepów typowych (tabela II). Metodę tą wykorzystano do określenia przynależności gatunkowej 89 izolatów gronkowców wyosobnionych z materiałów pobranych od ludzi leczonych w brazylijskich szpitalach. Zidentyfikowano 11 gatunków gronkowców. Dla izolatów należących do gatunków *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. xyloso* i *S. warneri* jak i dla szczepów referencyjnych odpowiadającego im gatunku otrzymano takie same profile DNA [2]. W 2008 zastosowano analizę RFLP genu *hsp60* do identyfikacji szczepów wyizolowanych z mleka pobranego od krów z zapaleniem gruczołu mlekowego [40]. W wyniku przeprowadzonej analizy restrykcyjnej enzymem *AluI* uzyskano dla szczepów *S. chromogenes*, *S. hyicus* i *S. capitis* bardzo podobne wzory DNA. Brak satysfakcjonujących rezultatów, skłonił autorów do zastosowania dwóch dodatkowych enzymów restrykcyjnych, *HindIII* i *PvuII*, co umożliwiło różnicowanie wyżej wymienionych gatunków.

#### 2.5. Polimorfizm genu *dnaJ* wykorzystany w identyfikacji *Staphylococcus* spp.

S h a h i wsp. [41] zaproponowali identyfikację gronkowców na podstawie zróżnicowania sekwencji wewnętrznej obszaru genu *dnaJ*. Gen koduje białko szoku cieplnego DnaJ określane również jako Hsp40. Podobieństwo fragmentu sekwencji (883 pz) genu *dnaJ* 45 typowych szczepów gronkowców wynosi 77,6%, co wskazuje na jego wyższy potencjał różnicujący niż genów 16S rRNA, *rpoB*, *hsp60* i *sodA*. Sekwencja wyżej wymienionego fragmentu genu *dnaJ* nie pozwala jednak na zróżnicowanie podgatunków w obrębie *S. capitis*, *S. carnosus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* i *S. sciuri* ze względu na bardzo wysokie podobieństwo (97,3%). Możliwe jest natomiast zróżnicowanie *S. aureus* subsp. *aureus* i *S. aureus* subsp. *anaerobius* oraz *S. cohnii* subsp. *cohnii* i *S. cohnii* subsp. *urealyticus*. Dendrogram utworzony na podstawie podobieństwa sekwencji genu *dnaJ* wykazał istnienie ośmiu grup w obrębie rodzaju *Staphylococcus*: *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. hyicus-S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. lugdunensis*. W 2008 r. H a u s c h i l d

i Stepanovic [16] zaproponowali identyfikację gronkowców na podstawie analizy restrykcyjnej wewnętrznego obszaru genu *dnaJ*. Zastosowanie enzymów restrykcyjnych *XapI* i *Bsp143I* pozwala na uwidocznienie różnic pomiędzy profilami DNA 41 referencyjnych szczepów (tabela II). Do badań zostały również włączone 23 izolaty kliniczne. Zaproponowana metoda umożliwiła identyfikację wszystkich szczepów. Analiza wykazała, że szczepy należące do gatunków *S. aureus*, *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. vitulinus* mają takie same profile DNA jak odpowiadający im szczep gatunku referencyjnego. Poprawność identyfikacji potwierdzono stosując analizę restrykcyjną genu *gap* oraz sekwencji genu 16S rRNA.

### 2.6. Różnicowanie gatunków gronkowców na podstawie sekwencji genu *tuf*

Ze względu na wysoce konserwatywny charakter genu *tuf*, analiza jego sekwencji może być stosowana do wykrywania filogenetycznych relacji między gatunkami gronkowców. Gen *tuf*, koduje czynnik Tu (EF-Tu) uczestniczący w procesie elongacji łańcucha peptydowego. Martineau i wsp. [29] zsekwencjonowali fragment genu *tuf* o wielkości 884 par zasad następujących gatunków: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*. Stwierdzono, że podobieństwo sekwencji wynosi od 89 do 97%. Rezultaty tych badań pozwoliły na zaprojektowanie starterów i uzyskanie produktu amplifikacji o wielkości 370 pz dla 27 referencyjnych szczepów gronkowców z kolekcji ATCC. Największe podobieństwo sekwencji fragmentów genu *tuf* stwierdzono dla szczepów należące do gatunków *S. haemolyticus* i *S. hominis* oraz *S. capitis* i *S. epidermidis*, natomiast największe różnice odnotowano między szczepami *S. auricularis* i *S. haemolyticus* oraz *S. auricularis* i *S. lugdunensis*. Heikens i wsp. [18] wykazali, że różnicowanie gatunków w oparciu o sekwencję genu *tuf* odznacza się wyższym potencjałem różnicującym niż w oparciu o sekwencję genów *sodA* i 16S RNA. Wyniki uzyskane przez Martineau i wsp. [29] pozwoliły na opracowanie przez inną grupę badaczy [24] metody RFLP umożliwiającej identyfikację 11 najczęściej izolowanych gatunków gronkowców (tabela II).

### 2.7. Diagnostyka gatunków gronkowców w oparciu o polimorfizm genu *sodA*

Poyart i wsp. [35] zaproponowali identyfikację gronkowców na podstawie analizy sekwencji genu *sodA*, kodującego dysmutazę ponadtlenkową. Fragment tego genu o wielkości 429 pz umożliwia różnicowanie 40 typowych szczepów gronkowców (tabela II). Wyniki

analizy sekwencji genu *sodA* pozwoliły na skonstruowanie drzewa filogenetycznego podobnego do uzyskanego na podstawie analizy sekwencji 16S rDNA oraz *hsp60*. Sivadon i wsp. [43] wykorzystali analizę częściowej sekwencji genu *sodA* do identyfikacji gronkowców koagulazo-ujemnych wyizolowanych z materiałów pobranych od ludzi z zakażeniem kości i stawów. Porównano uzyskane sekwencje nukleotydowe z zamieszczonymi w bazie danych sekwencjami szczepów referencyjnych i typowych, i na tej podstawie ustalono, że izolaty należały do *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. caprae*, *S. pasteurii*, *S. simulans* i *S. cohnii*.

### 2.8. Identyfikacja na podstawie sekwencji genu *rpoB*

Gen metabolizmu podstawowego *rpoB*, koduje podjednostkę beta polimerazy RNA. Analiza pełnej sekwencji genu *rpoB* kilku gatunków gronkowców wykazała, że może ona być dogodnym markerem służącym do badań taksonomicznych i filogenetycznych [9]. Do dalszych analiz został wybrany fragment o wielkości 751 pz odznaczający się polimorfizmem, porównywanie sekwencji 29 gatunków gronkowców wykazało podobieństwo wynoszące 71,6–93,6% (tabela II). Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na utworzenie drzewa filogenetycznego i wyłonienie dziewięciu grup: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. sciuri*, *S. auricularis*, *S. aureus* i *S. caseolyticus*. W 2009 r. Sampimom i wsp. z powodzeniem zidentyfikowali 172 szczepy wyizolowane z mleka krowiego na podstawie sekwencji genu *rpoB*, zaliczono je do 17 gatunków gronkowców. Najliczniej były reprezentowane: *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. warneri* i *S. equorum*. Równolegle, podjęto próbę identyfikacji izolatów przy zastosowaniu testów komercyjnych API Staph ID 32 (bioMérieux, France) oraz Staph-Zym (Rosco, Taastrup, Denmark). Wykazano, że przy użyciu API Staph ID 32 poprawnie zidentyfikowano 41% izolatów, a przy Staph-Zym 31% izolatów. Uzyskane wyniki jednoznacznie wykazały konieczność stosowania metod molekularnych w identyfikacji gronkowców pochodzenia zwierzęcego, ponieważ różnicowanie w oparciu o testy komercyjne obarczone jest wysokim odsetkiem nieprawidłowo sklasyfikowanych szczepów.

### 3. Zastosowanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym w diagnostyce gronkowców

Technika real-time PCR umożliwia identyfikację bakterii po 3–4 godzinach, liczonych od pobrania materiału. Zaletą tej metody jest również czułość, zaś wadą możliwość identyfikacji tylko wybranych gatunków

gronkowców. Kobayashi i wsp. [23] zaproponowali identyfikację izolatów *S. aureus* i *S. epidermidis* ze starterami zaprojektowanymi dla sekwencji *tuf*. Natomiast Iwase i wsp. [20] zastosowali startery komplementarne do sekwencji *sodA* w celu identyfikacji szczepów należących do gatunku *S. epidermidis*. Ta sama grupa japońskich badaczy wykazała możliwość różnicowania trzech gatunków *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* na podstawie analizy krzywej topnienia [19]. Natomiast Skow i wsp. [44] stwierdzili możliwość identyfikacji 9 najczęściej izolowanych gatunków gronkowców z materiałów klinicznych (*S. aureus*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. warneri*) przy zastosowaniu reakcji real-time PCR ze starterami komplementarnymi do nukleotydów w pozycjach 28–44 oraz 309–290 sekwencji 16S rDNA. Metodę real-time PCR zweryfikowano testując przynależność gatunkową 37 izolatów gronkowców koagulazo-ujemnych i 56 szczepów *S. aureus*. Należy pokreślić, że wszystkie izolaty *S. aureus* zostały poprawnie zidentyfikowane. Jeden szczep *S. capitis* został zidentyfikowany jako *S. epidermidis*, natomiast pozostałe gronkowce koagulazo-ujemne zostały poprawnie zidentyfikowane.

#### 4. Wykorzystanie spektrometrii mas w identyfikacji gronkowców

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o możliwości wykorzystania spektroskopii mas w diagnostyce laboratoryjnej. Spektrometria mas typu MALDI-TOF polega na analizie składu białek komórkowych, głównie tych występujących w dużych ilościach w komórce bakteryjnej jak białka rybosomalne i umożliwia automatyczną identyfikację mikroorganizmów na podstawie profilu białkowego. Bergeron i wsp. [4] zastosowali spektrometrię mas typu MALDI-TOF do różnicowania gronkowców, a uzyskane wyniki porównali z identyfikacją uzyskaną na podstawie analizy sekwencji genów *tuf* i *gap*. Stwierdzono, że 138 szczepów zostało poprawnie zidentyfikowanych, 4 nieprawidłowo, a pozycji taksonomicznej 39 izolatów nie ustalono. Należy zaznaczyć, że 5 gatunków gronkowców nie zostało włączonych do bazy danych spektrometru mas. Procent poprawnie zidentyfikowanych szczepów wyniósł 81,5%. Autorzy podkreślają, że spektrometria mass umożliwia szybką oraz tańszą identyfikację bakterii, niż ma to miejsce w przypadku analiz molekularnych opartych na bezpośrednim sekwencjonowaniu genu. Jednakże, różnicowanie gronkowców na podstawie sekwencji genu *tuf* jest znacznie bardziej wiarygodne i umożliwia identyfikację wszystkich izolatów. Autorzy wskazują na konieczność poszerzenia bazy danych spektrometru mas o nowo opisane oraz rzadko izolowane gatunki gronkowców,

co niewątpliwie przyczyniłoby się do wzrostu odsetka prawidłowo zidentyfikowanych szczepów. Wyższą efektywność identyfikacji uzyskali Dupont i wsp. [11]. Badaniami objęli 230 szczepów gronkowców reprezentujących 20 gatunków. Prawidłowo zidentyfikowano 93,2% szczepów, przy czym po wykluczeniu gatunków, które nie figurowały w bazie danych spektrometru mas, odsetek poprawnie zidentyfikowanych szczepów wzrósł do 97%. Dubois i wsp. [10] również uzyskali bardzo wysoki odsetek prawidłowo zidentyfikowanych szczepów (99,3%), wśród 152 izolatów, jedynie jednego pozycja taksonomiczna nie została ustalona. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że spektrometria mas typu MALDI-TOF daje możliwość wiarygodnej identyfikacji gronkowców.

#### 5. Podsumowanie

W ciągu ostatnich kilkunastu lat zanotowano olbrzymi postęp w identyfikacji i filogenetycznej klasyfikacji gronkowców. Zastosowanie metody bezpośredniego sekwencjonowania konserwatywnych genów stało się dogodnym sposobem wiarygodnej identyfikacji gronkowców, określenia pozycji nowego gatunku w obrębie rodzaju oraz rekonstrukcji filogenezy tej grupy bakterii. Uważa się, że techniki oparte na analizie sekwencji genów metabolizmu podstawowego, powinny być uznane za złoty standard w identyfikacji gronkowców i stanowić metody referencyjne. Liczne zespoły badawcze podejmują próby opracowania metod identyfikacji gronkowców w oparciu o technikę RFLP, która umożliwiłaby analizę większej liczby szczepów w krótszym czasie niż to ma miejsce w przypadku sekwencjonowania. Wydaje się, że największy potencjał różnicujący ma metoda oparta na analizie restrykcyjnej fragmentu genu *dnaJ*. Obecnie szczególnym zainteresowaniem cieszą się metody identyfikacji gronkowców prowadzone w oparciu o technikę real-time PCR. Niewątpliwą zaletą tej metody jest czułość, szybkość wykonania i łatwość interpretacji uzyskanych wyników. Duże nadzieje wiąże się również z spektrometrią mas, która mogłaby mieć większe zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej.

#### Piśmiennictwo

1. Al Masalma M., Raoult D., Roux V.: *Staphylococcus massiliensis* sp. nov., isolated from a human brain abscess. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1066–1072 (2010)
2. Barros E.M., Iório N.L.P., de Freire Bastos M.C., Santos K.R.N., Giambiagi-deMarval M.: Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a partial *groEL* gene sequence. *Diag. Microbiol. Infec. Dis.* **59**, 251–257 (2007)

3. Becker K., Harmsen D., Mellmann A., Meier Ch., Schumann P., Peters G., von Eiff Ch.: Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* Species. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4988–4995 (2004)
4. Bergeron M., Dauwalder O., Gouy M., Freydiere A.-M., Bes M., Meugnier H., Benito Y., Etienne J., Lina G., Vandenesch F., Boisset S.: Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **30**, 343–354 (2011)
5. Chaves F., García-Álvarez M., Sanz F., Alba C., Otero J.R.: Nosocomial spread of a *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* strain causing sepsis in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4877–4879 (2005)
6. Couto I., Pereira S., Miragala M., Sanches I.S., Lencastre H.: Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3099–3103 (2001)
7. De Bel A, van Hoorde K, Wybo I., Vandoorlaer K., Echahidi F., Brand E., Schumamm P., Ieven M., Soetens O., Piérard D. Van-damme P.: *Staphylococcus jettensis* sp. nov., a novel coagulase-negative staphylococcal species isolated from human clinical. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1**, doi: 10.1099/ijss.0.044438-0 (2013)
8. de Silva G.D., Kantzanou M., Justice A., Massey R.C., Wilkinson A.R., Day N.P., Peacock S.J.: The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 382–388 (2002)
9. Drancourt M., Raoult D.: *rpoB* Gene Sequence-Based Identification of *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1333–1338 (2002)
10. Dubois D., Leyssene D., Chacornac J.P., Kostrzewa M., Schmit P.O., Talon R., Bonnet R., Delmas J.: Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 941–945 (2010)
11. Dupont C., Sivadon-Tardy V., Bille E., Dauphin B., Beretti J.L., Alvarez A.S., Degand N., Ferroni A., Rottman M., Herrmann J.L., Nassif X., Ronco E., Carbonnelle E.: Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 998–1004 (2010)
12. Frank K.L., del Pozo J.L., Pater R.: From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for *Staphylococcus lugdunensis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 111–133 (2008)
13. Ghebremedhin B., Layer F., König W., König B.: Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1019–1025 (2008)
14. Goh S.H., Santucci Z., Kloos W.E., Faltyn M., George C.G., Driedger D., Hemmingsen S.M.: Identification of *Staphylococcus* species and subspecies by the chaperonin 60 gene identification method and reverse checkerboard hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 3116–3121 (1997)
15. Götz F., Bannerman T., Schleifer K.L.: The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. (w) The Prokaryotes. Third edition. A Handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. red. M. Dworkin., S. Falkow, E. Rosenberig, K.-H. Schleifer, E. Stackebrands, 2006, vol. 4, s. 5–75
16. Hauschild T., Stepanovic S.: Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of *dnaJ* gene. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 3875–3879 (2008)
17. Hauschild T., Stepanović S., Zakrzewska-Czerwińska J.: *Staphylococcus stepanovicii* sp. nov., a novel novobiocin-resistant oxidase-positive staphylococcal species isolated from wild small mammals. *Syst. Appl. Microbiol.* **33**, 183–187 (2010)
18. Heikens E., Fleer A., Paauw A., Florijn A., Fluit A.C.: Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2286–2290 (2005)
19. Iwase T., Seki K., Shinji H., Mizunoe Y., Masuda S.: Development of a real-time PCR assay for the detection and identification of *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri*. *J. Med. Microbiol.* **56**, 1346–1349 (2007)
20. Iwase T., Hoshina S., Seki K., Shinji H., Masuda S., Mizunoe Y.: Rapid identification and specific quantification of *Staphylococcus epidermidis* by 5' nuclease real-time polymerase chain reaction with a minor groove binder probe. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **60**, 217–219 (2008)
21. Kaufman D., Fairchild D.: Clinical microbiology of bacterial and fungal sepsis in very-low-birth-weight infants. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 638–680 (2004)
22. Kloos W.E., Bannerman T.L.: *Staphylococcus* and *Micrococcus*. (w) Manual of Clinical Microbiology. red. P.R. Murray, E. Baron., M.A Pfallen., F.C Tenover, R. Tenover. ASM Press, Washington, 1999, D.C, s. 507
23. Kobayashi N., Bauer T.W., Sakai H., Daisuke Togawa D., Lieberman I.H., Fujishiro T., Procop G.W.: The use of newly developed real-time PCR for the rapid identification of bacteria in culture-negative osteomyelitis. *J. Bone Spine*, **73**, 745–747 (2006)
24. Kontos F., Petinakia E., Spiliopouloub I., Maniatis M., Maniatis A.N.: Evaluation of a novel method based on PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the *tuf* gene for the identification of *Staphylococcus* species. *J. Microbiol. Methods*, **55**, 465–469 (2003)
25. Kwok A.Y.C., Su S.-Ch., Reynolds R.P., Bay S.J., Av-Gay Y., Dovichi N.J., Chow A.W.: Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1181–1192 (1999)
26. Kwok A.Y.C., Chow A.W.: Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 87–92 (2003)
27. Layer F., Ghebremedhin B., König W., König B.: Differentiation of *Staphylococcus* spp. by terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene. *J. Microbiol. Methods*, **70**, 542–549 (2007)
28. Mack D., Rohde H., Harris L.G., Davies A.P., Horstkotte M.A., Knobloch J.K.-M.: Biofilm formation in medical device-related infection. *Inter. J. Art. Organs* **29**, 343–359 (2006)
29. Martineau F., Picard F.J., Danbing KE., Paradis S., Roy P.H., Ouellette M., Bergeroni M.G.: Development of a PCR Assay for identification of *Staphylococci* at genus and species levels. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 2542–2547 (2001)
30. Nováková D., Pantůček R., Hubálek Z., Falsen E., Busse H.J., Schumann P., Sedláček I.: *Staphylococcus microti* sp. nov., isolated from the common vole (*Microtus arvalis*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 566–573 (2010)
31. Onni T., Sanna G., Cubeddu G.P., Marogna G., Lollai S., Leori G., Tola S.: Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from ovine milk samples by PCR-RFLP of 16S rRNA and *gap* genes. *Vet. Microbiol.* **144**, 347–352 (2011)
32. Pantůček R., Švec P., Dajcsc J.J., Machová I., Černohlávková J., Šedoe O., Gelbičová T., Mašlaňová I., Doškař J., Zdráhal Z., Růžičková V., Sedláček I.: *Staphylococcus petrasii* sp. nov.

- including *S. petrasii* subsp. *petrasii* subsp. nov. and *S. petrasii* subsp. *croceilyticus* subsp. nov., isolated from human clinical specimens and human ear infections. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**, 90–95 (2013)
33. Piette A., Verschraegen G.: Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet. Microbiol.* **134**, 45–54 (2009)
  34. Pottumarthy S., Schapiro J.M., Prentice J.L., Houze Y.B., Swanzy S.R., Fang F.C., Cookson B.T.: Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5881–5884 (2004)
  35. Poyart C., Quesne G., Boumaila C., Trieu-Cuot P.: Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative *Staphylococci* by using the *sodA* gene as a target. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4296–4301 (2001)
  36. Riesen A., Perreten V.: *Staphylococcus rostri* sp. nov., a haemolytic bacterium isolated from the noses of healthy pigs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2042–2047 (2010)
  37. Rodhe H., Mack D., Christner M., Burdelski Ch., Franke G., Knobloch J.K.-M.: Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Rev. Med. Microbiol.* **17**, 45–54 (2006)
  38. Ross T.L., Fuss E.P., Harrington S.M., Cai M., Perl T.M., Merz W.G.: Methicillin-resistant *staphylococcus caprae* in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 363–367 (2005)
  39. Sampimon O.C., Zadoks R.N., De Vlieghe S., Supre K., Haesebrouck F., Barkema H.W., Sol J., Lam T.J.G.M.: Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Vet. Microbiol.* **136**, 300–305 (2009)
  40. Santos O.C.S., Barros E.M., Brito M.A.V.P., de Freire Bastos M.C., dos Santos K.N., Giambiagi-deMarval M.: Identification of coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis using RFLP-PCR of the *groEL* gene. *Vet. Microbiol.* **130**, 134–140 (2008)
  41. Shah M.M., Iihara H., Noda M., Song S.X., Nhung P.H., Ohkusu K., Kawamura Y., Ezaki T.: *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 25–30 (2007)
  42. Shittu A., Lin J., Morrison D., Kolawole D.: Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections. *J. Med. Microbiol.* **53**, 51–55 (2004)
  43. Sivadon V., Rottman M., Chaverot S., Quincampoix J.-C., Avettand V., de Mazancourt P., Bernard L., Trieu-Cuot P., Feron J.-M., Lortat-Jacob A., Piriou P., Judet T., Gaillard J.-L.: Use of genotypic identification by *sodA* sequencing in a prospective study to examine the distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species among strains recovered during septic orthopedic surgery and evaluate their significance. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2952–2954 (2005)
  44. Skow A., Mangold K.A., Tajuddin M., Huntington A., Fritz B., Thomson R.B., Kaul K.L.: Species-level identification of Staphylococcal isolates by real-time PCR and melt curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2876–2880 (2005)
  45. Supré K., De Vlieghe S., Cleenwerck I., Engelbeen K., Van Trappen S., Piepers S., Sampimon O.C., Zadoks R.N., De Vos P., Haesebrouck F.: *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2739–2744 (2010)
  46. Takahashi T., Satoh I., Kikuchi N.: Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 725–728 (1999)
  47. Taponen S., Supré K., Piessens V., van Coillie E., de Vlieghe S., Koort J.M.K.: *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 61–65 (2012)
  48. Van Der Zwet W.C., Debets-Ossenkopp Y.J., Reinders E., Kapi M., Savelkoul P.H.M., Van Elburg R.M., Hiramatsu K., Vandenbroucke-Grauls C.M.E.: Nosocomial spread of a *Staphylococcus capitis* strain with heteroresistance to vancomycin in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2520–2525 (2002)
  49. van Hoovels L., Vankeerberghen A., Boel A., van Vaerenbergh K., De Beenhouwer H. First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human.: *J. Clin. Microbiol.* **44**, 4609–4612 (2006)
  50. Widerström M., Wiström J., Ferry S., Karlsson C., Monsen T.: Molecular epidemiology of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from women with uncomplicated community-acquired urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1561–1564 (2007)
  51. Yugueros J., Temprano A., Berzal B., Sanchez M., Herranz C., Luengo J.M., Naharro G.: Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase-encoding gene as a useful taxonomic tool for *Staphylococcus* spp. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 4351–4355 (2000)
  52. Yugueros J., Temprano A., Sanchez M., Luengo J.M., Naharro G.: Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism of gap gene. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3693–3695 (2001)
  53. Zadoks R.N., Jeffrey L., Watts J.L.: Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. *Vet. Microbiol.* **134**, 20–28 (2009)



## SPIS TREŚCI

Profesor Hilary Koprowski (1916–2013) .....	133
D. Wojcieszńska, K. Hupert-Kocurek, U. Guzik – Mikrobiologiczny rozkład kwasu cynamonowego i jego hydroksypochoodnych .....	135
Ł. Kuryk, M. Wieczorek, B. Litwińska – Polio – zagadkowy wirus .....	143
E. Abramczuk, K. Pancer, B. Litwińska – Wirusy paragrypy w aspekcie zakażeń wirusowych osób po przeszczepach szpiku lub płuc .....	153
M. Jach, R. Łoś, M. Maj, A. Malm – Probiotyki – aspekty funkcjonalne i technologiczne .....	161
K. Szymanek-Majchrzak, A. Młynarczyk, G. Młynarczyk – Oporność <i>Staphylococcus aureus</i> na glikopeptydy .....	171
J. Kozdrój – Metagenom – źródło nowej informacji o mikroorganizmach glebowych .....	185
A. A. Zasa da – Występowanie i chorobotwórczość dla człowieka potencjalnie toksynotwórczych maczugowców – <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Corynebacterium ulcerans</i> i <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	201
E. Szczuka, N. Makowska, A. Kaznowski – Molekularne metody identyfikacji bakterii z rodzaju <i>Staphylococcus</i> .....	211

## CONTENTS

Profesor Hilary Koprowski (1916–2013) .....	133
D. Wojcieszńska, K. Hupert-Kocurek, U. Guzik – Microbiological degradation of cinnamic acid and its hydroxyl-derivatives .....	135
Ł. Kuryk, M. Wieczorek, B. Litwińska – Polio – a mysterious virus .....	143
E. Abramczuk, K. Pancer, B. Litwińska – Human parainfluenza viruses as the cause of viral infections in patients after stem cells or lung transplantation .....	153
M. Jach, R. Łoś, M. Maj, A. Malm – Probiotics – technological and manufacturing aspects .....	161
K. Szymanek-Majchrzak, A. Młynarczyk, G. Młynarczyk – Resistance of <i>Staphylococcus aureus</i> strains to glycopeptides .....	171
J. Kozdrój – Metagenome – a new source of information about soil microorganisms .....	185
A. A. Zasa da – The occurrence and pathogenicity of potentially toxinogenic corynebacteria – <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Corynebacterium ulcerans</i> and <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> .....	201
E. Szczuka, N. Makowska, A. Kaznowski – Molecular methods for the identification of bacteria from the genus <i>Staphylococcus</i> .....	211

