

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW

# Postępy Mikrobiologii

Advances in Microbiology

Kwartalnik

**Tom 54**

**Zeszyt 3•2015**

LIPIEC – WRZESIEŃ

CODEN:

PMKMAV 54 (3)

2015

Index Copernicus ICV = 9,65 (2013)

Impact Factor ISI = 0,286 (2014)

Punktacja MNiSW = 15,00 (2013)

<http://www.pm.microbiology.pl>

## RADA REDAKCYJNA

JACEK BARDOWSKI (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN), DARIUSZ BARTOSIK (Uniwersytet Warszawski),  
JACEK BIELECKI (Uniwersytet Warszawski), RYSZARD CHRÓST (Uniwersytet Warszawski), JERZY DŁUGOŃSKI (Uniwersytet Łódzki),  
NADZIEJA DRELA (Uniwersytet Warszawski), EUGENIA GOSPODAREK (Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy),  
JERZY HREBENDA (Uniwersytet Warszawski), WALERIA HRYNIEWICZ (Narodowy Instytut Leków),  
MAREK JAKÓBISIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), JACEK MIĘDZOBRODZKI (Uniwersytet Jagielloński),  
ANDRZEJ PIEKAROWICZ (Uniwersytet Warszawski), ANTONI RÓŻALSKI (Uniwersytet Łódzki),  
ALEKSANDRA SKŁODOWSKA (Uniwersytet Warszawski), RADOŚLAW STACHOWIAK (Uniwersytet Warszawski),  
BOHDAN STAROŚCIAK (Warszawski Uniwersytet Medyczny), BOGUSŁAW SZEWCZYK (Uniwersytet Gdański),  
ELŻBIETA TRAFNY (Wojskowa Akademia Techniczna), STANISŁAWA TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (Państwowy Zakład Higieny),  
GRZEGORZ WĘGRZYN (Uniwersytet Gdański), PIOTR ZIELENKIEWICZ (Uniwersytet Warszawski)

## REDAKCJA

JACEK BIELECKI (redaktor naczelny), BOHDAN STAROŚCIAK (zastępca),  
RADOŚLAW STACHOWIAK (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

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

### Sekretarz

Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski  
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, tel. (22) 554 13 12, fax (22) 554 14 04  
e-mail: radeks@biol.uw.edu.pl

## PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY

Redaktor odpowiedzialny: STEFANIA GIEDRYS-KALEMBA (Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie)

Adres Redaktora działu Publikacje Metodyczne i Standardy  
ul. Malinowa 11, 72-003 Wołczkowo  
tel. 605031324, fax: (91) 3113186, e-mail: kalemba@mp.pl lub kalemba@pum.edu.pl

## STALI RECENZENCI:

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

CZASOPISMO WYDAWANE Z FINANSOWĄ POMOCĄ  
MINISTERSTWA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

ISBN 978 - 83 - 923731 - 3 - 1

### **Informacja o zdjęciu na okładce:**

*Komórki zrekombinowanego szczepu *Bacillus subtilis* w trakcie inwazji komórek eukariotycznych linii HeLa  
(SEM LEO, powiększenie 2 300 X).*

*Ze zbiorów Zakładu Mikrobiologii Stosowanej Instytutu Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego.*

---

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

Nakład 1150, Objętość 13 ark. wyd., Papier offset 90 g

---

Skład i druk: Zakład Wydawniczy Letter Quality, tel. 22 115 38 10, 607 217 879  
e-mail: roma.walendzewicz@gmail.com; projekt okładki: Jerzy Grzegorkiewicz

1. Wstęp. 2. Znaczenie mikrobiomu jelitowego w etiopatologii niektórych chorób. 3. Czynniki wpływające na kształtowanie się mikrobiomu. 4. Interakcje pomiędzy bakteriami jelitowymi i gospodarzem – systemy komunikacji. 5. Mikrobiom a zachowanie homeostazy. 6. Podsumowanie

### The role of gut microbiome in the maintenance of host homeostasis

**Abstract:** Recent study on intestinal microbiome irrevocably altered the view that mammalian metabolism is solely influenced by their genome. Intestinal microbiota harbor a repertoire of protein encoding genes that by far exceed the gene pool found in the host genome. This has established the importance of the gut microbiome, because part of the responsibility for host metabolic regulation is devolved to the microbial symbionts. Subtle changes in co-metabolic profiles in response to physiological perturbations or environmental factors lead to many diverse disease processes including inflammatory bowel diseases, colorectal cancer, obesity, circulatory disease, and others. In most mammals, the gut microbiome is dominated by four phyla: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria*. The host has evolved to establish many processes that sustain unresponsiveness toward the commensal bacteria while at the same time maintaining responsiveness toward pathogens. The intestinal microbiome and mucosal tissues are intertwined by multiple interactions influencing host health or disease. Microbes, in response to environmental or host cues, form highly coordinated, multi-cellular networks through intercellular cross-species and cross-domain signaling pathways, resulting in potent expansion of adaptive response to environmental changes. Similarly, the host is constantly sampling and assessing colonizing organisms and regulates defense mechanism. Under physiological conditions, the intestinal community serves the host via several ways including maturation and regulation of intestinal immune system, energy metabolism, intestinal response to epithelial cell injury and others. Changes to the intestinal milieu influence this advantageous balance is seriously injured, as benign commensals sensing danger rapidly switch to feared pathogens and initiate a coordinated program to invade the succumbed tissues. Molecular mechanisms responsible for recognizing the intestinal microflora are diverse, including numerous pathways like Toll-like receptors (TLRs), formylated peptide receptors (FPRs), nucleotide binding oligomerization-like receptors (NODs) and others with corresponding signal transduction routes. NF- $\kappa$ B depending signaling induce the inflammatory and proapoptotic response. Gastric and mucosal mucosa is engaged, with the ability to respond to inflammatory signals via production of different mediators, i.e. TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 and IL-12. Many commensal bacteria have the ability to activate anti-inflammatory responses inducing expression of target genes mediating anti-inflammatory and antiapoptotic effects i.e. IL-10 and TGF- $\beta$ . Under physiological circumstances, these host-microbiome interactions are considered to be placed at the exquisitely equilibrated state between pro-inflammatory and anti-inflammatory responses.

1. Introduction. 2. The role of the gut microbiome in etiopathogenesis of some systemic diseases. 3. Factors influencing gut microbiome composition. 4. Bidirectional relationship between gut microbiome and host-cross talk process. 5. Microbiom in the maintenance of host homeostasis. 6. Concluding remarks

**Słowa kluczowe:** jelitowy mikrobiom, molekularna interakcja między gospodarzem i drobnoustrojami, utrzymanie homeostazy

**Key words:** gut microbiome, molecular host-microbes interaction, homeostasis maintenance

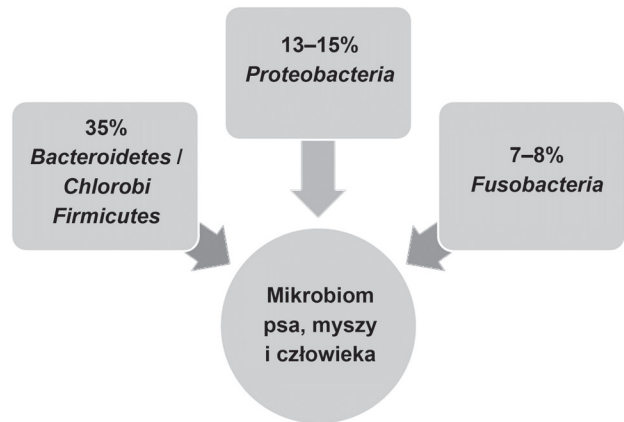
## 1. Wstęp

Po niecałej dekadzie od zsekwencjonowania genomu człowieka dochodzimy do przekonania, że metabolizm ssaków nie zależy wyłącznie od produktów ich genów, ale podlega również wpływowi zasiedlających określone nisze ekologiczne mikroorganizmów. Ich całościowy kształt wraz ze wspólnym genomem określany jest mikrobiomem. Samych tylko bakterii jest prawie 10 razy więcej niż komórek somatycznych gospodarza i w większości zlokalizowanych w przewodzie pokarmowym. Genom człowieka, a także innych ssaków został więc wzbogacony przez miliony genów koewoluujących z nimi drobnoustrojów dzięki czemu gospodarz uzyskał poten-

cjalnie wiele nowych biologicznych możliwości zakodowanych we wspólnym interaktywnym genomie. Dzięki temu uzyskał przydomek super organizmu [6, 26, 29, 51]. W wyniku ukształtowanego mutualizmu, po części, za regulację metabolizmu gospodarza odpowiadają więc symbiotyczne mikrobionty. Ścisłe fizyczne i funkcjonalne powiązanie mikrobiomu jelitowego z lokalnym układem immunologicznym można uznać za pewnego rodzaju szczególnie narząd odpowiedzialny za miejscowy i ogólny stan fizjologiczny lub patologiczny organizmu, jak np. reakcje autoimmunologiczne, alergie, otyłość, zaburzenia w krążeniu, nieswoiste zapalenia jelit, rak jelita, metabolizm leków, pooperacyjną rekonwalescencję, czy nawet autyzm [33, 42]. Nie bez

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: marian\_binek@sggw.pl

znaczenia pozostaje również fakt, że około 10% energii, którą uzyskuje gospodarz pochodzi z bakteryjnych produktów fermentacji [40]. U większości ssaków mikrobiom jelitowy stanowią głównie bakterie zaliczane do czterech typów, tj. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* i *Proteobacteria*. Ich kompozycja i stabilność specyficznie związane są z gospodarzem [59]. Na podstawie dwuletniej obserwacji dynamiki mikrobiomu jelitowego człowieka ustalono, że 60% bakterii nie podlega zmianie [16, 46]. Różnice w ich składzie są bardziej znaczące u niemowląt niż osób dorosłych. U tych ostatnich w miarę postępu życia mikrobiom jelitowy stabilizuje się i skupia podobne typy bakterii [50]. Zróżnicowanie jelitowych mikrobiomów pomiędzy poszczególnymi osobnikami i populacjami, w sensie zarówno kulturowym, socjalnym, jak i geograficznym stawia pytanie o to, co należy rozumieć pod pojęciem tzw. „zdrowego” mikrobiomu oraz, czy istnieje stała jego część określana jako rdzenna, charakterystyczna dla określonej populacji i decydująca o zachowaniu zdrowia. Dokonujący się postęp w technologiach sekwencjonowania DNA stwarza możliwości wykorzystania analizy metagenomowej w badaniach złożonych ekosystemów, jakim bez wątpienia pozostaje ekosystem jelitowy. Zakłada się, że liczne sekwencje w losowo badanych metagenomach odpowiadają liczniej wstępującym gatunkom bakterii, zaś gatunki występujące rzadko reprezentowane są przez nieliczne sekwencje. Na tej podstawie możemy zarówno porównawczo analizować dany ekosystem, jak i badać na niego wpływ wielu czynników środowiskowych, w tym środków leczniczych [55, 63, 68]. Tak więc metagenomowa analiza pozwala pośrednio na uzyskiwanie informacji na temat funkcji określonych populacji drobnoustrojów, ponieważ ich obecność lub nieobecność może być wiązana z aktualnym stanem fizjologicznym makroorganizmu. W badaniach Gill i wsp. [24], dotyczących mikrobiomu końcowego odcinka jelit dwojga zdrowych osób stwierdzono znaczące różnice w ich metagenomie, co z kolei przekładało się na różnice w obecności szeregu klas genów, wśród nich tych zaangażowanych w wytwarzanie energii, transport cukrów, aminokwasów, nukleotydów i co-enzymu, a także genów, których produkty biorą udział w biosyntezie, transporcie jonów nieorganicznych i wtórnym metabolizmie. Istotne różnice funkcjonalne mikrobiomu pomiędzy poszczególnymi osobnikami ponownie skłaniają do pytania o zdefiniowanie stałego (rdzennego) mikrobiomu, a więc kluczowych gatunków bakterii, czy nawet szczepów od obecności, których zależeć będzie zdrowie gospodarza. Odpowiedź nie wydaje się jednoznaczna i w niektórych opiniach, rdzenny mikrobiom w rozumieniu zbioru gatunków czy szczepów bakterii prawdopodobnie nie istnieje, natomiast przejawia się na poziomie funkcjonalnym, a więc produkty określonych genów zaangażowane są



Rys. 1. Typowe proporcje poszczególnych typów i klas bakterii składających się na mikrobiom jelitowy ssaków

w metabolizm gospodarza [64, 65]. Wydaje się również, że niektóre gatunki bakterii stale i stabilnie zasiedlają jelita różnych gatunków gospodarzy. Porównanie DNA bakterii obecnych w kale psa, otyłych i normalnych myszy oraz człowieka wykazało, że w 35% były to sekwencje typowe dla *Bacteroidetes/Chlorobi* oraz *Firmicutes*, w 13–15% typowe dla *Proteobacteria* i 7–8% typowe dla *Fusobacteria* (Rys. 1). Hierarchiczne pogrupowanie kilku metagenów jelitowych wspomnianych gospodarzy wykazało ich filogenetyczne i metaboliczne podobieństwo [36, 62, 64].

O ile udział i znaczenie bakterii w jelitowym mikrobiomie jest przynajmniej we fragmentach poznane, o tyle rola wirusów, grzybów i pasożytów pozostaje ciągle niejasna. Ze wstępnych danych wynika, że w przeciwieństwie do mikrobiomów bakteryjnych, wiromy pozostają unikatowe i ściśle związane z poszczególnymi osobnikami, niezależnie od stopnia ich genetycznego powiązania. Z drugiej strony ich między personalne zróżnicowanie pozostaje niewielkie [54]. Z kolei z badań nad podawaniem zdrowym osobom antybiotyków o szerokim spektrum działania, pośrednio wynika, że w jelitach dochodzi do wzrostu liczby drożdżaków z rodzaju *Candida*. Jak wiadomo, *C. albicans* ułatwiają translokację *Escherichia coli* poprzez bariery jelitowe, co skutkuje nie tylko drastycznymi zmianami w jelitowym mikrobiomie, ale również rozprzestrzenianiem się drobnoustrojów poza przewód pokarmowy [18]. Co do znaczenia pasożytów jelitowych w zachowaniu zdrowia gospodarza wiadomo niewiele. Jedną z hipotez powstawania niektórych współczesnych chorób, jak np. alergii, nieswoistego zapalenia jelit, cukrzycy I typu, a także stwardnienia rozsianego wskazuje na ich podłoże wynikające z nadmiernej higieny. Udowodniono związek pomiędzy zmniejszoną ekspozycją na patogeny, a zwiększoną odpowiedzią zapalną u takich osób oraz z drugiej strony mniejszą aktywnością i zaburzeniami ze strony układu immunologicznego u nosicieli robaków jelitowych [18, 25].

Wydaje się zatem, że mutualizm pomiędzy jelitowym mikrobiomem a gospodarzem może być ściślejszy niż początkowo sądzono i jego odkrywanie na poziomie proteomu i metabolomu przyczyni się do lepszego zrozumienia w nim funkcji mikroorganizmów, a także takiego ich modulowania, aby służyły zachowaniu zdrowia makroorganizmu.

## 2. Znaczenie mikrobiomu jelitowego w etiologii niektórych chorób

Udział mikrobiontów jelitowych w wywoływaniu wielu chorób przewodu pokarmowego jest powszechnie znany. W mniejszym stopniu zmiany w tym środowiskiem wiąże się z chorobami systemowymi, obejmującymi inne tkanki i bardziej odległa okolice ciała gospodarza, jak np. mózg, serce, czy naczynia obwodowe. Jednymi z najczęściej odnotowanych chorób dotyczących zamożne społeczeństwa są nieswoiste zapalenia jelit (inflammatory bowel disease – IBD), których etiologie, przynajmniej po części, wiąże się z jakościowym składem jelitowego mikrobiomu. Z doświadczeń na zwierzętach wynika, że do wywołania zapalenia jelit konieczne są bakterie, a z porównania składu mikroflory osób cierpiących na IBD i osób zdrowych, że u tych pierwszych ma miejsce mniejsze zróżnicowanie w obrębie *Firmicutes* i *Bacteroides*. Do nasilenia objawów choroby przyczyniają się szczepy *E. coli*, które wykazują zdolność penetracji przez śluz jelitowy [23]. Wydaje się, że w patogenezie IBD istotną rolę odrywa polimorfizm genu kodującego wewnątrzkomórkowy receptor NOD2, dzięki czemu odpowiedź gospodarza na bakteryjny peptydoglikan jest osłabiona. Nosiciele *NOD2* wykazują od 1, 75 do 4 razy wyższą podatność na chorobę Leśniowskiego-Crohna. Dalsze reakcje pomiędzy gospodarzem i drobnoustrojami modulowane są przez liczne prozapalne i antyzapalne cytokiny uwalniane przez gospodarza w odpowiedzi na bakteryjną stymulację [35].

Podobnie, dostrzegany jest związek pomiędzy jelitową mikroflorą a zachorowaniami na nowotwory, przede wszystkim przewodu pokarmowego. Rak okrężnicy zajmuje trzecie miejsce wśród najczęściej występujących chorób nowotworowych w zindustrializowanych społeczeństwach oraz drugie jako przyczyna śmierci w tej grupie chorych. Doświadczenia na zwierzętach laboratoryjnych potwierdzają udział w etiologii nowotworów jelitowych mikrobiontów. W doświadczeniu, w którym myszy pozbawiono genu kodującego transkrypcyjny czynnik wzrostu beta 1 (*Tgfb1*), stwierdzono że w odpowiedzi na konwencjonalną mikroflorę zwierzęta reagowały rozwojem przewlekłego raka okrężnicy [21]. Z kolei myszy *germ-free* (GF) z niedoborem IL-10 odporne na raka okrężnicy zachorowały na tę chorobę

po zasiedleniu przez normalną mikroflorę jelitową [66]. Za podstawowy mechanizm w bakteryjnej etiologii jelitowych nowotworów przyjmuje się zmianę składu mikrobiontów spowodowaną dietą i w konsekwencji pojawieniem się metabolitów indukujących rozwój choroby [47, 58]. Istnieje epidemiologiczny związek pomiędzy występowaniem raka okrężnicy i prostaty, a zwiększoną produkcją siarkowodoru przez bakterie redukujące siarkę, jak np. *Desulfovibrio vulgaris* [11]. Rozwojowi tej grupy bakterii sprzyja dieta bogata w mięso, szczególnie czerwone. Bakterie redukujące siarkę konkurują z drobnoustrojami metanogennymi o wodór, który wykorzystują do wytwarzania siarkowodoru, a ten hamuje utlenianie kwasu n-masłowego w komórkach nabłonka jelitowego. Kwas masłowy pełni potencjalną funkcję inhibitora deacetylazy histonowej, sprzyja proliferacji kolonocytów, a także wpływa na ekspresję genu p21, przez co zapobiega rozwojowi raka okrężnicy [29]. Innym bakteryjnym czynnikiem indukującym rozwój raka okrężnicy jest 4-parakrezol. Czynniki ten wytwarzany jest między innymi przez *Clostridium difficile* i niektóre szczepy *Lactobacillus*. Krezol powstaje z przemian tyrozyny i fenyloalaminu w szlaku 4-hydroksy octanofenyłu, który następnie podlega bakteryjnej dekarboksylacji. Z kolei u chorych na *osteosarcoma* wykrywano takie metabolity bakterii jelitowych jak: putresceina, hipuran, i propionian 4-hydroksyfenyłu, a u chorych na raka piersi mleczan 4-hydroksyfenyłu będący produktem bakteryjnej degradacji tyrozyny. Wysokobiałkowa dieta cechująca społeczeństwa krajów rozwiniętych wpływa również na zwiększoną sekrecję pierwszorzędowych kwasów żółciowych, przekształcanych następnie przez bakterie w okrężnicy do kwasów drugorzędowych. Jeden z nich, jakim jest kwas dezoksycholowy jest czynnikiem karcinogennym. Jego obecność skorelowana jest z występowaniem bakterii wytwarzających 7 $\alpha$ -dehydroksylazy, jak np. *Clostridium* [27].

Drobnoustrojom jelitowym przypisuje się również znaczenie w wywoływaniu cukrzycy. Pozbawienie myszy cukrzycowych receptora MyD88 rozpoznającego bakterie powodowało ich oporność na cukrzycę typu pierwszego, natomiast pozbawienie ich mikroflory powodowało objawy cukrzycy. Przytoczony fakt sugeruje, że bakterie jelitowe odgrywają rolę w etiopatogenezie tej choroby [27, 33]. Cukrzyca drugiego typu (oporna na insulinę) silnie powiązana jest z otyłością. Na choroby te wpływają określone przemiany metaboliczne będące wynikiem zaburzeń w składzie jelitowej mikroflory. Z doświadczeń na zwierzętach wynika, że oporność na insulinę uwarunkowana jest między innymi bakteryjnymi produktami przemiany cholicy i kwasów żółciowych [22].

Ostatnie badania wskazują również na bakteryjną etiopatogenezę otyłości. Dieta wysokotłuszczowa

przyczynia się do obniżenia ogólnej liczby bakterii jelitowych oraz wzrostu bakterii Gram-ujemnych. Odkryto również mechanizmy poprzez, które bakterie wpływają na zwiększone przyrosty wagowe gospodarza. Należą do nich:

- zwiększenie biodostępności energetycznej w wyniku przekształcanie niestrawnych składników pokarmowych do związków absorbowlanych,
- w wyniku wewnętrznego bakteryjnego metabolizmu dochodzi do zwiększonej syntezy SCFAs i aktywacji syntezy trójglicerydów,
- wysokotłuszczowa dieta zmienia metabolizm bakterii w wyniku którego cholina ulega przemianom do metyloamin. Opisana sytuacja skutkuje deficytem choliny co z kolei doprowadza do chorób wątroby,
- zdolność jelitowego mikrobiomu do wpływania na ekspresję genów gospodarza sprzyjających rozwojowi otyłości, jak np. w wyniku hamowania genu kodującego angiopoetynowo-podobny czynnik 4 (*Angptl4*), którego produkt przyczynia się do obniżenia aktywności lipazy lipoproteinowej lub indukcji czynnika FIAF (fasting-induced adipose factor) wpływającego na zwiększenie wolnych kwasów tłuszczowych i tłuszczu w ogóle. Z obserwacji na myszach, jak i ludziach wynika, że u otyłych osobników dochodzi do obniżenia liczby *Bacteroidetes* i wzrostu *Firmicutes*, od których może zależeć zwiększone spożywanie żywności [4, 19].

Dieta wysokotłuszczowa prowadzi do dyslipidemii manifestującej się wzrostem cholesterolu, trójglicerydów i lekkiej frakcji cholesterolu oraz spadkiem frakcji ciężkiej. Dyslipidemia powoduje przesunięcie w składzie mikroflory jelitowej na korzyść bakterii Gram-ujemnych. Obecność tłuszczu sprzyja transportowi lipopolisacharydu ze światła jelit do krwi, co prowadzi do endotoksemii i indukcji odpowiedzi prozapalnej. Jak wykazano w doświadczeniu na szczurach podawanie LPS-u prowadziło do wzrostu masy ciała zwierząt, oporności na insulinę oraz nadmiaru tłuszczu odkładanych w wątrobie [7].

Oprócz wielu chorób związanych z przewodem pokarmowym, jelitowej mikroflorze przypisuje się również wpływ na funkcjonowanie innych narządów, jak np. układu nerwowego. Pojawianie się zaburzeń ze strony przewodu pokarmowego u pacjentów autystycznych zwróciły uwagę na mikroflorę jelitową jako potencjalny czynnik przyczyniający się do rozwoju wspomnianej choroby. Porównanie mikroflory dzieci zdrowych i chorych wskazało u tych ostatnich 10-krotny wzrost liczby *Clostridium* spp. [61]. Niewykluczone, że wytwarzane przez klostridia neurotoksyny mogą przyczyniać się do manifestowania się niektórych objawów autyzmu. W moczu u takich pacjentów stwierdzono

podwyższona ilość hipuranu, fenyloacetylo glutaminy oraz produktów przemiany tryptofanu/kwasu nikotynowego będących produktami kometabolizmu gospodarza-mikrobiom jelitowy [69].

Jak wynika z krótkiego przeglądu niektórych chorób, których etiopatogenezę wiąże się z jelitowym mikrobiomem, istotną rolę w ich powstawaniu odgrywa dieta gospodarza. W wyniku kometabolizmu gospodarza i drobnoustrojów jelitowych powstają określone metabolity o bezpośrednim szkodliwym działaniu lub stanowiące chemiczne sygnały aktywujące układ immunologiczny, szlaki przekazywania sygnału w komórkach, prowadzące np. do apoptozy itp. Poznanie, bakteryjnych produktów powstających ze specyficznych substratów wchodzących w skład diety gospodarza pozwoliłoby na sterowanie metabolizmem ssaków zarówno poprzez dobór składników pokarmowych, jak i składników mikrobiomu.

### 3. Czynniki wpływające na kształtowanie się mikrobiomu

W warunkach naturalnych skład mikrobiotów jelitowych podlega ścisłej kontroli i jest regulowany przez gospodarza, jak i przez same drobnoustroje. W procesie tym zaangażowanych jest wiele mechanizmów z obu stron, często wzajemnie powiązanych. Drobnoustroje stymulują między innymi gospodarza do produkcji śluzu, który w jelitach grubych wewnętrzną warstwą o gęściejszej konsystencji przylega do komórek nabłonka jelitowego i stanowi fizyczną barierę zapobiegającą penetracji do nich bakterii. Z kolei w luźniejszej warstwie skierowanej do światła jelit usytuowane są liczne receptory odpowiadające epitopom mikrobiotów (microbiota-associated molecular patterns – MAMPs) warunkując specyficzną adhezję [48]. Rozpoznawanie drobnoustrojów jelitowych przez gospodarza odbywa się na drodze wielu mechanizmów, w tym poprzez usytuowane na wielu komórkach białka błonowe, jak receptory Toll-podobne (Toll-like receptors), białka NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) i IPAF (IL-1 $\beta$ -converting enzyme protease activator factor) należące do rodziny receptorów NLR (nucleotide-binding oligomerization domain), receptory formylowanych peptydów (formylated peptide receptors – FRPs), lektyny typu C itp. Wiązanie się poszczególnych epitopów drobnoustrojów ze wspomnianymi receptorami powoduje aktywację komórek gospodarza i uruchamianie szlaku transdukcji sygnału. W następstwie aktywacji przez jelitowe patogeny czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B dochodzi do odpowiedzi zapalnej i proapoptotycznej. Dla zachowania równowagi, wiele komensalnych bakterii ogranicza zależną od NF- $\kappa$ B transdukcję sygnału oraz indukuje wytwa-

rganie TGF- $\beta$  oddziałującego antyzapalnie i antyapoptotycznie [48]. Zaangażowanie bakteryjnych genów w regulację przekazywania sygnału w komórkach nabłonka jelitowego wykazano na przykładzie komórek linii HT-29 transfekowanych plazmidem z wklonowanym genem alkalicznej fosfatazy, będącym pod kontrolą czynników wiążących zależnych od NF- $\kappa$ B. Na podstawie analizy metagenomowej odkryto dwa loci prawdopodobnie występujące u nowego gatunku *Bacteroides*, które kodowały zależny od ATP transport oraz lipoproteinę odpowiedzialną za oddziaływanie na NF- $\kappa$ B [37].

Ciekawym mechanizmem przyczyniającym się do kształtowania się składu jelitowych mikrobiontów przez gospodarza jest modulowanie przez limfocyty CD3<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> T zależnej od białka NOD2 aktywacji komórek nabłonka jelitowego przez bakteryjne peptydoglikany. W wyniku ekspresji amidazy PGLYRP-2 (Peptidoglycan recognition proteins -2), która trawiąc połączenia pomiędzy cukrowcowym rdzeniem i peptydami niszczy rozpoznawane przez NOD2 epitopy peptydoglikanu. W następstwie zmienionej konformacji wspomnianej struktury, nie dochodzi do pobudzenia komórek niosących NOD2 i w konsekwencji odpowiedź gospodarza na bakteryjne peptydoglikany pozostaje ograniczona. PGLYRP2 na drodze opisanego mechanizmu może również kształtować wrodzoną odpowiedź gospodarza zależną od białek NOD [20]. Niektóre mikrobionty jelitowe wpływają na stosunek obecnych w śluzówce jelit limfocytów regulatorowych T do T<sub>H17</sub>. Te ostatnie stanowią specyficzną subpopulację limfocytów CD4<sup>+</sup> T odpowiedzialnych za produkcję IL-17, IL-17F i IL22 [3]. Uczestniczą w indukcji odpowiedzi immunologicznej przeciwko jelitowym patogenom i odpowiedzi zapalnej skierowanej przeciwko patogenom bakteryjnym i grzybiczym. W utrzymywaniu homeostazy w jelitach zaangażowanych jest wiele różnych populacji limfocytów T o aktywności supresorowej, uczestniczących w hamowaniu odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko jelitowym komensalicznym drobnoustrojom, między innymi poprzez sekrecję oddziałującej przeciwzapalnie IL-10 [34]. W nabywaniu przez nie pamięci uczestniczą komórki nabłonka jelitowego, komórki dendrytyczne błony podstawnej i węzłów chłonnych. Dodatkowo międzynabłonkowe limfocyty TCR  $\gamma\delta^+$  w miejscach uszkodzenia komórek nabłonka jelitowego wydzielają keratynocytowy czynnik wzrostowy uczestniczący w odtworzeniu ich warstwy [48].

Do innych ważnych mechanizmów biorących udział w regulacji jelitowego mikrobiomu należy zaliczyć indukcję przez komensaliczne mikroorganizmy sekrecji przez komórki Paneth'a peptydu angiogeniny 4 o aktywności skierowanej przeciwko bakteriom Gram-dodatnim pozwalającym na utrzymanie w dominują-

cej liczbie bakterii Gram-ujemnych [13, 28]. Podobnie stymulowanie przez mikroorganizmy wytwarzania lektyny typu-C-RegIIIy przyczynia się w sumie do ograniczania liczby bakterii [67]. Produkowane przez komórki nabłonka jelitowego defensyny wraz z kryptodynami oddziałują bezpośrednio antibakteryjnie oraz immunomodulacyjnie kształtując w ten sposób kompozycję bakterii jelitowych. Z kolei interakcje pomiędzy samymi bakteriami, w tym antagonizm, wiązanie się ze specyficznymi receptorami białek mucynowych, indukcja wytwarzania przez komórki gospodarza fukozylowanych glikanów wykorzystywanych jako źródło energii również w istotny sposób służy kształtowaniu jelitowego mikrobiomu [48]. Zatem „zdrowy” mikrobiom decyduje o zachowaniu w środowisku homeostazy, oddziałuje antyapoptotycznie, reguluje swój skład, dostarcza niedostępnych dla gospodarza czynników odżywczych, jak np. krótkołańcuchowych lotnych kwasów tłuszczowych, a także hamuje rozwój flory patogenicznej.

#### 4. Interakcje pomiędzy bakteriami jelitowymi i gospodarzem – systemy komunikacji

Mikrobionty określonych ekosystemów wykształciły złożony system odczuwania zmian zachodzących w środowisku, w którym występują i reagowania na nie. W odpowiedzi mogą zmieniać swój fenotyp, np. na zjadliwy czy też modulować liczebność populacji. W warunkach dostatku składników pokarmowych i innych korzystnych czynników, zbiorowisko mikroorganizmów wykazuje stabilny i powolny wzrost. Natomiast w sytuacji zagrożenia i współzawodnicstwa o pokarm, wspólnota mikroorganizmów ulega destabilizacji, może dochodzić do ujawnienia się cech zjadliwości, np. manifestujących się konkurencją z gospodarzem o składniki odżywcze, inwazją do komórek i tkanek, uruchomieniem szeregu procesów obronnych, jak np. tworzenie biofilmu, produkcja toksyn itp. [60]. Bakterie wykształciły w tym celu wiele struktur i mechanizmów błonowego i transbłonowego przekazywania i przetwarzania sygnałów, poprzez które odbierają bodźce ze środowiska i odpowiadają na nie. Wieloskładnikowe błonowe „biocujniki” zdolne są do odbierania zarówno sygnałów fizjochemicznych, jak np. pH, obecności składników pokarmowych, ciśnienia osmotycznego, jak również rozpuszczalnych i strukturalnych składników gospodarza, np. składowych powierzchni jego komórki, stanu mikrośrodowiska, obecności składników odpornościowych, np. interferonu gamma, dynorfin, produktów uszkodzenia tkanek, czy końcowych produktów niedotlenienia tkanek jak np. adenozyne [1, 38, 60]. Czynniki środowiskowe zbierane są na powierzchni komórki

bakteryjnej i następnie transportowane do cytoplazmy, gdzie są przetwarzane przez drugi system czuciowy, znany jako *quorum sensing signaling system*. Jest to hierarchiczny system regulacji, poprzez który zbiorowisko bakterii może oszacować i regulować swoją liczebność, jak również zsynchronizować zachowanie populacji za pomocą małych dyfundujących cząsteczek przepływających pomiędzy sąsiadującymi komórkami. Okazuje się, że bakterie wykorzystują *quorum sensing system* nie tylko do kontrolowania swojej populacji ale również do odpowiedzi na czynniki gospodarza uwolnione w następstwie uszkodzenia jego tkanek, elementy układu odpornościowego, końcowe produkty niedotlenienia tkanek itp. W odpowiedzi na wspomniane sygnały tworzą wysoce skoordynowaną, wielokomórkową sieć powiązań obejmującą zarówno komórki różnych gatunków bakterii, jak i gospodarza, przede wszystkim komórki nabłonka jelitowego, komórki zaangażowane w indukcję odpowiedzi immunologicznej (dendrytyczne, prezentujące antygen) i komórki zaangażowane w rozwój odczynu zapalnego (limfocyty, granulocyty). Tak więc dochodzi do międzydomenowego molekularnego dialogu (chemical crosstalk) pomiędzy bakteriami, a różnymi tkankami gospodarza. W ten sposób np. cząsteczki uczestniczące w systemie obronnym gospodarza mogą aktywować lub wyciszać bakteryjny *quorum sensing system* i podobnie cząsteczki uczestniczące w *quorum sensing system* mogą aktywować sygnały wysyłane przez gospodarza, lub je wyciszać [1, 60]. Przetwarzanie informacji pochodzących ze środowiska uzależnione jest od genetycznych możliwości mikroorganizmów i zachodzi poprzez włączanie lub wyłączenie określonych genów, ich wymianę lub wyciszenie. W konsekwencji drobnoustroje uzyskują nowe właściwości, dzięki którym są bardziej przystosowane do określonego środowiska, jak również ujawniają się lub nie ich cechy zjadliwości. Z drugiej strony, gospodarz stale kontroluje i ocenia zasiedlające go mikroorganizmy i odpowiednio reguluje te procesy za pośrednictwem różnych mechanizmów odpornościowych zapobiegających rozwojowi zakażenia. Opisane procesy dynamicznych powiązań i wymiany informacji odbywają się w przygranicznej strefie na styku bakterii, komórek nabłonka jelitowego, komórek dendrytycznych, limfocytów, granulocytów i innych określanej jako interaktom. Opisane zjawisko funkcjonowania wielokierunkowej sieci powiązań, poprzez którą możliwe jest przesyłanie sygnału i porozumiewanie się bakterii z bakteriami, bakterii z gospodarzem i gospodarza z bakteriami zasadniczo zmienia dotychczasowe spojrzenie zarówno na mechanizmy kształtowania się i funkcjonowania określonych ekosystemów, jak i patogenę bakterijnych chorób. Podobnie, innej ocenie podlegają same mikroorganizmy, które już nie stanowią zbiorowiska autonomicznych komórek, ale mikrobiolo-

giczne konsorcja, będące swego rodzaju protokankami, w których komórki zdolne są do wzajemnego komunikowania się i przetwarzania informacji. Można więc pokusić się o stwierdzenie, że na wzór grup społecznych tworzą strukturalne i socjalne wspólnoty z wyodrębnionymi centrami „decyzyjnymi” i węzłami przesyłania informacji [5].

## 5. Mikrobiom a zachowanie homeostazy

Sposób w jaki jelitowy mikrobiom wpływa na zachowanie ogólnej homeostazy gospodarza nie jest do końca jasny. W warunkach fizjologicznych mikroflora komensaliczna aktywnie uczestniczy w utrzymaniu jelitowej bariery gospodarza poprzez stymulowanie wytwarzania śluzu, zapewnienie ciągłości i ścisłości połączeń komórek nabłonka i sprawności jelitowego układu immunologicznego [59]. Na zasadzie kompetencyjnego wykluczania i antagonizmu chronią przed kolonizowaniem się drobnoustrojów patogennych, indukują wytwarzanie przeciwciał IgA, uczestniczą w trawieniu związków wielkocząsteczkowych, zmniejszając w ten sposób pulę potencjalnych antygenów. Wytwarzają także krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFAs) stanowiące składniki odżywcze dla komórek nabłonka, regulują ich wzrost i różnicowanie, zmniejszają przepuszczalność połączeń międzykomórkowych i indukują wytwarzanie ochronnych białek szoku cieplnego i mucyny. SCFAs dodatkowo indukują syntezę dekarboksylazy ornityny, która reguluje syntezę poliamin odgrywających rolę we wzroście komórek i naprawie uszkodzeń komórek śluzówki [41, 48, 49, 53]. Jelitowy układ immunologiczny obejmuje komórki nabłonka jelitowego, międzykomórkowe limfocyty, kępki Peyera, wiele komórek ulokowanych w błonie podstawnej i węzły chłonne krezkowe. Komórki nabłonka jelitowego mimo, że nie są profesjonalnymi komórkami prezentującymi antygen to takie zdolności wykazują. Są spolaryzowane i dochodzi u nich do ekspresji klasycznego MHC I, MHC II i nieklasycznego MHC I. Sekrecja mikrocząsteczek zawierających MHC służy do rozpoznania antygenów bakterii znajdujących się w świetle jelit. Limfocyty obecne między komórkami nabłonka jelitowego zapewniają ochronę gospodarzowi poprzez regulowanie odpowiedzi zapalnej oraz uczestnictwo w naprawianiu uszkodzeń nabłonka (limfocyty TCR  $\gamma\delta^+$  wydzielają keratynocytowy czynnik wzrostu niezbędny do odtworzenia nabłonka) [9, 10, 12, 43, 45].

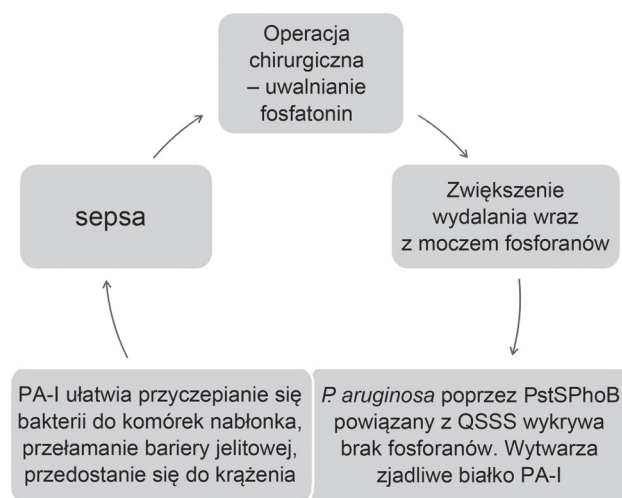
Funkcjonowanie opisanych struktur podlega zaburzeniom w określonych sytuacjach, jak np. znacznych zranień i krwotoków w następstwie których może dochodzić do zmniejszonej produkcji śluzu jelitowego. Podobnie, w następstwie wielobakteryjnej sepsy, dochodzi do zmniejszonego wytwarzania jelitowego



białka TFF3 (intestinal trefoil factor 3) stabilizującego warstwę śluzową i wpływającego na naprawę uszkodzeń śluzówki. Wspomnianemu zjawisku towarzyszy zmniejszona sekrecją przez komórki Paneth'a defensyny 5 charakteryzującej się szerokim antybakteryjnym spektrum działania [70]. Wiele patogenów jelitowych powoduje zmiany w środowisku jelit i składzie mikroflory skutkujące drastycznymi zaburzeniami w „szczelności” nabłonka i sprawności układu immunologicznego. Enteropatogenne *E. coli* (EPEC), toksyny wytwarzane przez *C. difficile*, czy *Vibrio cholerae*, lektyna PA-I produkowana przez *Pseudomonas aeruginosa* poprzez modulację międzykomórkowej macierzy zwiększają jej przepuszczalność [2, 48]. Okazuje się, że do podobnych efektów dochodzi w następstwie zakażeń zlokalizowanych również poza przewodem pokarmowym, jak np. zapalenia płuc i będącego jego efektem niedotlenienia, czy sepsy skutkującej zaburzeniami w krążeniu [15]. Dodatkowo w wyniku wielobakteryjnej sepsy oraz niedokrwienia jelit dochodzi do gwałtownego zmniejszenia się liczby limfocytów w przestrzeniach międzykomórkowych, błonie podstawnej oraz kępkach Peyer'a. Obserwuje się również zwiększoną apoptozę komórek nabłonka i limfocytów B błony podstawnej. Bardzo istotnym zmianom podlega także wytwarzanie przeciwciał IgA. Obserwuje się ich spadek w następstwie endotoksemii, poparzeń czy też sepsy, chociaż w tym ostatnim przypadku dane są sprzeczne. Obniżona odpowiedź immunologiczna przejawiająca się zahamowaniem wytwarzania IgA może być spowodowana zwiększoną apoptozą, lub też niedostateczną produkcją IL-5 stymulującą produkcję wspomnianych immunoglobulin [17, 31, 39]. Śluzówka żołądka i jelit w odpowiedzi na czynniki indukujące zapalenie reaguje wytwarzaniem wielu różnych bioaktywnych czynników, jak IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , białko dużej mobilności B1 (high-mobility group B1 – HMGB1), IL-2, IL-4, IL-13 oraz sygnały zależne od RAGE (receptor for advanced glycation end products), które wpływają na funkcjonowanie bariery jelitowej, w tym przepuszczalność śluzówki. Z kolei IL-10 oraz TGF $\beta$  przyczyniają się do jej uszczelnienia [44, 52, 56, 57]. Endotoksemia powoduje uwalnianie głównie przez enterocyty oraz niektóre komórki błony podstawnej jelita cienkiego i okrężnicy IL-6. Podobny wpływ wywiera IL-1 $\beta$ . Na podstawie doświadczeń *in vitro* wykazano, że IFN $\gamma$  bierze udział w transcytozie *E. coli* poprzez komórki nabłonka, co powoduje, że wspomniane bakterie mogą penetrować poprzez śluzówkę jelit niezależnie od jej szczelności [13]. Do ograniczania translokacji bakterii przez warstwę komórek nabłonka przyczynia się natomiast insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1) [30]. Podobnie alkaliczna fosfataza uczestnicząc w defosforylacji reszt fosforanowych LPS-u przyczynia się do detoksykacji tej substancji co zapobiega penetracji drobnoustrojów

przez barierę komórek nabłonka i przyczynia się do utrzymywania homeostazy w jelitach [59].

Na znaczenie drobnoustrojów jelitowych w etiologii uogólnionych zapaleń i dysfunkcji wielu narządów zwrócono uwagę już w latach 80. XX wieku. Określone drobnoustroje lub ich konsorcja indukowały systemowe zapalenie doprowadzające do postępującej dysfunkcji wielu narządów. Niesprawne mechanizmy bariery jelitowej w połączeniu z niewydolnym układem immunologicznym umożliwiały translokację bakterii do krążenia i wywoływanie sepsy [8, 13]. Poznanie i zrozumienie mechanizmów towarzyszących wspomnianym zjawiskom jest niezwykle trudne ponieważ wymaga bieżącego śledzenia dynamicznych procesów na poziomie mikrobiomu (genów mikrobiontów kodujących czynniki zjadliwości i ich produktów) inflamasyonu (genów gospodarza uczestniczących w indukcji zapalenia i odpowiedzi immunologicznej oraz ich produktów) i interaktomu (sygnałów środowiskowych i między domenowej komunikacji), których wypadkową jest zachowanie homeostazy lub rozwój choroby. Co więcej nawet częściowe monitorowanie zachodzących interakcji pomiędzy produktami genów mikrobiontów, a produktami genów gospodarza zawsze będzie spóźnione i będzie się odnosiło do sytuacji przeszłej. Mnogość drobnoustrojów oraz ich niezwykle możliwości adaptacyjne w odpowiedzi na wiele sygnałów gospodarza i środowiska sprawiają, że nawet przy współczesnych możliwościach komputerowej analizy danych nie jesteśmy w stanie przewidzieć możliwego kierunku ich zmian i wytworzenia zjadliwego fenotypu [60]. Częściowo poznano mechanizm wywołania sepsy przez jelitowe *P. aeruginosa* w następstwie zabiegu operacyjnego (Rys. 2.). Podczas wspomnianego zabiegu dochodzi do uwalniania się fosfatonin, które z kolei zwiększają wydalanie wraz z moczem fosforanów.



Rys. 2. Możliwy mechanizm wywołania sepsy przez jelitowe szczepy *Pseudomonas aeruginosa* w następstwie zabiegu operacyjnego

Jelitowe szczepy *P. aeruginosa* wykrywają brak fosforanów poprzez wysoce konserwatywny wieloskładnikowy fosfocuciowy system regulatorowy PstS-PhoB powiązany z *quorum sensing*, obecny także u innych patogenów jelitowych, jak np. *Klebsiella*, *Serratia*, czy *Enterococcus* [32]. W konsekwencji dochodzi do ekspresji zależnego od *quorum sensing* białka zjadliwości, PA-I lektyny/adhezyjny. Powstałe białko ułatwia przyczepianie się bakterii do komórek nabłonka jelitowego, w którego konsekwencji dochodzi do przełamania bariery jelitowej i przedostawanie się do krążenia systemowego produkowanych letalnych cytotoksyn, jak np. egzotoksyny A, a to skutkuje sepsą.

W warunkach doświadczalnych, doustne podanie myszom fosforanów podczas zabiegów chirurgicznych na jelitach chroniło zwierzęta przed rozwojem sepsy jelitowej spowodowanej przez *P. aeruginosa*, w tym również przez szczepy wielooporne, co może potwierdzać, że podjęta terapia przyczyniła się do niwelacji sygnałów wysyłanych do środowiska przez gospodarza i doprowadziła do braku reakcji ze strony potencjalnych patogenów [60, 71]. Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia można postawić dalsze pytania, a mianowicie, czy niedostatek fosforanów może być uniwersalnym sygnałem dla innych patogenów do ujawniania swojego zjadliwego fenotypu oraz, czy obecność wspomnianych związków może być wyrazem dobrej kondycji gospodarza? Opisany przykład pokazuje jednak, że poprzez poznanie określonych sygnałów uwalnianych przez gospodarza do środowiska i reakcji na nie składowych mikrobiomu możliwe jest wpływanie na zachowanie jego zdrowia lub rozwoju choroby. Podejmowane badania, w oparciu o metagenomikę, metatranskryptomikę, proteomikę i metabolomikę bardzo przybliżają nas do wspomnianego celu oraz przyczyniają się do poznania jednostkowej odpowiedzi gospodarza na zakażenie i podejmowane leczenie. Niewykluczone, że już w niedalekiej przyszłości będziemy dysponowali kompletną wiedzą na temat obecnych u człowieka i zwierząt mikroorganizmów, występujących u nich genów i potencjalnych ich produktów, które w danym czasie i miejscu będą aktywowane przez sygnały wysyłane przez gospodarza i będą wpływały na powstanie i rozwój określonego zakażenia. Pozwoli nam to na zrozumienie, dlaczego te same drobnoustroje raz pozostają niegroźnymi kolonizatorami naszych tkanek, a kolejnym razem groźnymi dla życia patogenami. Aktualnie matematyczne metody modelowania i symulacji w oparciu o dotychczas poznane molekularne cechy drobnoustrojów, komórek i tkanek gospodarza będące ekstrapolacją danych laboratoryjnych i badań klinicznych, starają się komputerowo wizualizować określone scenariusze służące rozwiązywaniu problemów klinicznych, koordynowaniu terapii i rozwoju badań nad nowymi lekami.

## 6. Podsumowanie

Mikrobionty bytujące w przewodzie pokarmowym ssaków stanowią najliczniejszy ekosystem żywych organizmów. Szacuje się, że u człowieka liczba komórek przedstawicieli *Bacteria* i *Archea* na obszarze jelit osiagającym około 400 m<sup>2</sup> może wynosić od 10<sup>13</sup> do 10<sup>14</sup> oraz od 10<sup>14</sup> do 10<sup>15</sup> towarzyszącym im bakteriofagów nie uwzględniając innych wirusów i eukariotycznych pasożytów [59]. Gospodarz i bytująca w jego przewodzie pokarmowym mikroflora tworzą ukształtowany przez tysiąclecia współistnienia kompleksowy system ekologiczny, będący formą związku przynoszącego nie tylko obopólne korzyści, ale wręcz uzależniający istnienie jednych od drugich. Geny mikrobiontów zwiększają ogólną pulę genów gospodarza, a potencjalnie ich produkty interferują z jego życiowymi procesami. Mikroorganizmy wykształciły na drodze ewolucyjnej mechanizmy zmienności i przystosowawcze do określonych warunków życia. Wytwarzają w tym celu wiele struktur i mechanizmów błonowego i transosłonowego przekazywania i przetwarzania sygnałów, poprzez które odbierają bodźce ze środowiska i odpowiadają na nie. Podobnie, odpowiedź ze strony gospodarza nie zależy tylko od potencjalnych cech kodowanych w bakteryjnym genomie, ale również od procesów na poziomie molekularnym towarzyszącym relacjom bakterie-gospodarz, ich dynamiki i przestrzeni, w której mają miejsce, jak również czasu ich trwania. Pokazuje to istnienie wielokierunkowej sieci powiązań, poprzez którą możliwe jest przesyłanie sygnału i porozumiewanie się bakterii z bakteriami, bakterii z gospodarzem i gospodarza z bakteriami i jest ilustracją chemicznego i molekularnego języka pomiędzy mikro- i makroorganizmami, na drodze którego kształtują się ich wzajemne relacje służące utrzymaniu delikatnej równowagi. Włączenie w ostatnich dekadach do badań mikroflory jelitowej nowych technik opartych na sekwencjonowaniu metagenomu i wykrywaniu specyficznych dla określonych gatunków, a nawet klonów sekwencji, znacznie przybliżyły nam zjawiska i relacje pomiędzy gospodarzem a jego mikroflorą. Uzyskana wiedza znajduje praktyczne zastosowanie do zindywidualizowanego leczenia, poszukiwania punktów odniesienia dla stosowanych leków, jak również celowego kształtowania pomiędzy jelitowymi mikrobiontami i gospodarzem relacji służących zachowaniu homeostazy.

## Piśmiennictwo

1. An D., Shapiro M., Crandall M., Issa M., West M.: Critical illness as ecological collapse: modeling the impact of stress, ischemia, and therapy on host-bacterial ecology of the gut. *Surg. Infect.* 9, 277 (2008)

2. Alverdy J.C., Chang E.B.: The re-emerging role of the intestinal microflora in critical illness and inflammation: why the gut hypothesis of sepsis syndrome will not go away. *J. Leuk. Biol.* **83**, 461–466 (2008)
3. Atarashi K., Tanoue T., Honda K.: Induction of lamina propria Th17 cells by intestinal commensal bacteria. *Vaccine*, **28**, 8036–8038 (2010)
4. Backhed F., Manchester J.K., Semenkovich C.F., Gordon J.L.: Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 979–998 (2007)
5. Binek M.: Od postulatów Kocha do Socjomikrobiologii. *Medycyna Wet.* **67**, 151–156 (2011)
6. Binek M.: Mikrobiom człowieka – zdrowie i choroba. *Post. Mikrobiol.* **51**, 27–36 (2012)
7. Cani P.D., Neyrinck A.M., Fava F., Knauf C., Burcelin R.G., Tuohy K.M., Gibson G.R., Delzenne N.M.: Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, **50**, 2374–2383 (2007)
8. Carrico C.J., Meakins J.L., Marshall J.C.: Multipleorgan-failure syndrome. *Arch. Surg.* **121**, 196–197 (1986)
9. Chen Y., Chou K., Fuchs E., Havran W.L., Boismenu R.: Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial  $\gamma\delta$  T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14338–14343 (2002)
10. Christ A. D., Blumberg R. S.: The intestinal epithelial cell: immunological aspects. *Springer Semin. Immun.* **18**, 449–461 (1997)
11. Christl S.U., Gibson G.R., Cummings J.H.: Role of dietary sulphate in the regulation of methanogenesis in the human large intestine. *Gut*, **33**, 1234–1238 (1992)
12. Chung C.S., Watkins L., Funches A., Lomas-Neira J., Cioffi W.G., Ayala A.: Deficiency of gammadelta T lymphocytes contributes to mortality and immunosuppression in sepsis. *A.J.P.R.I.C.P.* **291**, R1338–R1343 (2006)
13. Clark J.A., Coopersmith C.M.: Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the “motor” of critical illness. *Shock*, **28**, 384–393 (2007)
14. Clark E., Hoare C., Tanianis-Hughes J., Carlson G.L., Warhurst G.: Interferon  $\gamma$  induces translocation of commensal *Escherichia coli* across gut epithelial cells via a lipid raft-mediated. *Proces. Gastroenterol.* **128**, 1258–1267 (2005)
15. Coopersmith C.M., Stromberg P.E., Davis C., Dunne W.M., Amiot D.M. 2nd, Karl I.E., Hotchkiss R.S., Buchman T.G.: Sepsis from *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia decreases intestinal proliferation and induces gut epithelial cell cycle. *Arrest. Crit. Care Med.* **31**, 1630–1637 (2003)
16. Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.L., Knight R.: Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, **326**, 1694–1697 (2009)
17. Coutinho H.B., Robalinho T.I., Coutinho V.B., Amorim A.M., Furtado A.F., Ferraz A., Ferraz E., Walker F., King G., Sewell H.F., Wakelin D.: Intra-abdominal sepsis: an immunocytochemical study of the small intestine mucosa. *J. Clin. Path.* **50**, 294–298 (1997)
18. Diebel L.N., Liberati D.M., Diglio C.A., Dulchavsky S.A., Brown W.J.: Synergistic effects of *Candida* and *Escherichia coli* on gut barrier function. *J. Traum.* **47**, 1045–1050 (1999)
19. Dumas M.E., Barton R.H., Toye A., Cloarec O., Blancher C., Rothwell A., Fearnside J., Tatoud R., Blanc V., Lindon J.C., Mitchell S.C., Holmes E., McCarthy M.I., Scott J., Gauguier D., Nicholson J.K.: Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12511–12516 (2006)
20. Duerr C., Salzman N.H., Dupont A., Szabo A., Normark B.H., Normark S., Locksley R.M., Mellroth P., Hornef M.W.: Control of intestinal Nod2-mediated peptidoglycan recognition by epithelium-associated lymphocytes. *Muc. Immunol.* **4**, 25–334 (2011)
21. Engle S.J., Ormsby I., Pawlowski S., Boivin G.P., Croft J., Balish E., Doetschman T.: Elimination of colon cancer in germ-free transforming growth factor beta 1-deficient mice. *Cancer Res.* **62**, 6362–6366 (2002)
22. Fearnside J.F., Dumas M.E., Rothwell A.R., Wilder S.P., Cloarec O., Toye A., Blancher C., Holmes E., Tatoud R., Barton R.H., Scott J., Nicholson J.K., Gauguier D.: Phylometabonomic patterns of adaptation to high fat diet feeding in inbred mice. *PLoS ONE*, **3**, e1668 (2008)
23. Frank D.N., St Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R.: Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13780–13785 (2007)
24. Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S., Gordon J.L., Relman D.A., Fraser-Liggett C.M., Nelson K.E.: Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, **312**, 1355–1359 (2006)
25. Guarner F., Bourdet-Sicard R., Brandtzaeg P., Gill H.S., McGuirk P., van Edebe W., Versalovic J., Weinstock J.V., Rook G.A.: Mechanism of disease: the hygiene hypothesis revisited. *Nat. Clin. Pract. Gastroenter. Hepatol.* **3**, 275–284 (2006)
26. Hattori M., Taylor T.D.: The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Research*, **16**, 1–12 (2009)
27. Holmes E., Li J.V., Athanasiou T., Ashrafian H., Nicholson J.K.: Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease. *Trends Microbiol.* **19**, 349–359 (2011)
28. Hooper L.V., Stappenbeck T. S., Hong C. V., Gordon J. I.: Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* **4**, 269–273 (2003)
29. Hu S., Dong T.S., Dalal S.R., Wu F., Bissonnette M., Kwon J.H., Chang E.B.: The microbe-derived short chain fatty acid butyrate targets miRNA-dependent p21 gene expression in human colon cancer. *PLoS ONE*, **6**, e16221 (2011)
30. Hunninghake G.W., Doerschug K.C., Nymon A.B., Schmidt G.A., Meyerholz D.K., Ashare A.: Insulinlike growth factor-1 levels contribute to the development of bacterial translocation in sepsis. *A.J.R.C.C.M.* **182**, 517–525 (2010)
31. Hurt R.T., Matheson P.J., Mays M.P., Garrison R.N.: Immune-enhancing diet and cytokine expression during chronic sepsis: an immune-enhancing diet containing Larginine, fish oil, and RNA fragments promotes intestinal cytokine expression during chronic sepsis in rats. *J. Gastrointest. Surg.* **10**, 46–53 (2006)
32. Kendall M.M., Sperandio V.: Quorum sensing by enteric pathogens. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **23**, 10–15 (2007)
33. Kinross J.M., Darzi A.W., Nicholson J.K.: Gut microbiome-host interactions in health. *Gen. Medicine*, **3**, 14–26 (2011)
34. Krist K., Erdei A., Bajtaj Z.: Set a thief to catch a thief: self-reactive innate lymphocytes and self-tolerance. *Autoimmun. Rev.* **7**, 278–283 (2008)
35. Kühn R., Löhler J., Rennick D., Rajewsky K., Müller W.: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, **75**, 263–274 (1993)
36. Kurokawa K., Itoh T., Kuwahara T., Oshima K., Toh H., Toyoda A., Takami H., Morita H., Sharma V.K., Srivastava T.P., Taylor T.D., Noguchi H., Mori H., Ogura Y., Ehrlich D.S., Itoh K., Takagi T., Sakaki Y., Hayashi T., Hattori M.: Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Research*, **14**, 169–181 (2007)
37. Lakhdari O., Cultrone A., Tap J., Gloux K., Bernard F., Ehrlich S.D., Lefevre F., Dore J., Blottiere H.M.: Functional

- metagenomics: a high throughput screening method to decipher microbiota-driven NF-kappa B modulation in the human gut. *PLoS One*, **5**, e13092 (2010)
38. Levin B.R., Antia R.: Why we don't get sick: the within-host population dynamics of bacterial infections. *Science*, **292**, 112–115 (2001)
  39. Liu C., Li A., Weng Y. B., Duan M. L., Wang B. E., Zhang S.W.: Changes in intestinal mucosal immune barrier in rats with endotoxemia. *World J. Gastroenterol.* **15**, 5843–5850 (2009)
  40. Macfarlane G.T., Macfarlane S.: Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery system, bioavailability and functional interaction in the gut. *Curr. Opin. in Biotech.* **18**, 156–162 (2007)
  41. Macpherson A. J., Uhr T.: Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, **303**, 1662–1665 (2004)
  42. Madach K., Kristof K., Tulassay E., Ivanyi Z., Erdei A., Kiraly A., Gal J., Bajtay Z.: Mucosal Immunity and the intestinal microbiome in development of critical illness. *ISRN Immun.* Vol. **2011**, Article ID 545729 (2011)
  43. Madara J.L., Nash S., Moore R., Atisook K.: Structure and function of the intestinal epithelial barrier in health and disease. *Monogr Pathol.* **31**, 306–324 (1990)
  44. Madsen K.L., Lewis S.A., Tavernini M.M., Hibbard J., Fedorak R.N.: Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion. *Gastroenterol.* **113**, 151–159 (1997)
  45. Mallegol J., van Niel G., Heyman M.: Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes. *Blood Cell. Mol. Dis.* **35**, 11–16 (2005)
  46. Manichanh C., Varela E., Martinez C., Antolin M., Llopis M., Dore J., Giralt J., Guarner F., Malagelada J.R.: The gut microbiota predispose to the pathophysiology of acute prodradiotherapy diarrhea. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 1754–1761 (2008)
  47. Monleón D., Morales J.M., Barrasa A., López J.A., Vázquez C., Celda B.: Monleon, Metabolite profiling of fecal water extracts from human colorectal cancer. *NMR Biomed.* **22**, 342–348 (2009)
  48. Neu J., Sharma R., Young C.: Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *J. Biomed. Biotech.* DOI:10.1155/2010/305879 (2010)
  49. Ohata A., Usami M., Miyoshi M.: Short-chain fatty acids alter tight junction permeability in intestinal monolayer cells via lipoxigenase activation. *Nutrition*, **21**, 838–847 (2005)
  50. Palmer C., Bik E.M., DiGiulio D.B., Relman D.A., Brown P.O.: Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* **5**:e177 (2007).
  51. Peterson J., Guyer M. i wsp.: The NIH human microbiome project. *Genome Res.* **19**, 2317–2323 (2009)
  52. Raman K.G., Sappington P.L., Yang R., Levy R., Prince J., Liu S., Watkins S., Schmidt A., Billiar T., Fink M.: The role of RAGE in the pathogenesis of intestinal barrier dysfunction after hemorrhagic shock. *AJ PhG LPh.* **291**, G556–G565 (2006)
  53. Ren H., Musch M.W., Kojima K., Boone D., Ma A., Chang E. B.: Short-chain fatty acids induce intestinal epithelial heat shock protein 25 expression in rats and EIC 18 cells. *Gastroenterol.* **121**, 631–639 (2001)
  54. Reyes A., Haynes M., Hanson N., Angly F.E., Heath A.C., Rohwer F., Gordon J.I.: Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, **466**, 334–338 (2010)
  55. Riesenfeld C.S., Schloss P.D., Handelsman J.: Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 525–552 (2004)
  56. Roche J. K., Martins C. A. P., Cosme R., Fayer R., Guerrant R.L.: Transforming growth factor  $\beta$ 1 ameliorates intestinal epithelial barrier disruption by *Cryptosporidium parvum* in vitro in the absence of mucosal T lymphocytes. *Infect. Immun.* **68**, 5635–5644 (2000)
  57. Sappington P. L., Yang R., Yang H., Tracey K. J., Delude R. L., Fink M. P.: HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterol.* **123**, 790–802 (2002)
  58. Scanlan P.D., Shanahan F., Clune Y., Collins J.K., O'Sullivan G.C., O'Riordan M., Holmes E., Wang Y., Marchesi J.R.: Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environ. Microbiol.* **10**, 789–798 (2008)
  59. Schujt T.J., van der Poll T., Wiersing W.J. Gut microbiome and host defense interactions during critical illness (w) Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine, red. J.-L. Vincent, Springer-Verlag, Berlin, 2012, s. 29–36
  60. Seal J.B., Morowitz M., Zabornia O., An G., Alverdy J.C.: The molecular Koch's postulates and surgical infection: a view forward. *Surgery*, **147**, 757–765 (2010)
  61. Sekirov I., Russell S.L., Antunes L.C., Finlay B.B.: Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* **90**, 859–904 (2010)
  62. Swanson K.S., Dowd S.E., Suchodolski J.S., Middelbos I.S., Vester B.M., Barry K.A., Nelson K.E., Torralba M., Henrissat B., Coutinho P.M., Cann J.K., White B.A., Fahey G.C.Jr.: Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J.* **5**, 639–649 (2011)
  63. Tringe S.G., Rubin E.M.: Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 805–814 (2005)
  64. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I.: An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**, 1027–1031 (2006)
  65. Turnbaugh P.J., Hamady M., Yatsunenko T., Cantarel B.L., Duncan A., Ley R.E., Sogin M.L., Jones W.J., Roe B.A., Affourtit J.P., Egholm M., Henrissat B., Heath A.C., Knight R., Gordon J.I.: A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, **457**, 480–484 (2009)
  66. Uronis J.M., Muhlbauer M., Herfarth H., Rubinas T., Jones G., Jobin Ch.: Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS ONE*, **4**, e6026 (2009)
  67. Wlodarska M., Finlay B.B.: Host immune response to antibiotic perturbation of the microbiota. *Muc. Immunol.* **3**, 100–103 (2010)
  68. von Mering C., Hugenholtz P., Raes J., Tringe S.G., Doerks T., Jensen L.J., Ward N., Bork P.: Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. *Science*, **315**, 1126–1130 (2007)
  69. Yap I.K., Angley M., Veselkov K.A., Holmes E., Lindon J.C., Nicholson J.K.: Urinary metabolic phenotyping differentiates children with autism from their unaffected siblings and age-matched controls. *J. Proteome. Res.* **9**, 2996–3004 (2010)
  70. Yang M. Z. L. Y., Zhou T. E., Yang Z. F., Wen L. Q., Chang J. X.: Changes of the immunological barrier of intestinal mucosa in rats with sepsis. *World J. Emerg. Med.* **1**, 138–143 (2010)
  71. Zaborina O., Lepine F., Xiao G., Valuckaite V., Chen Y., Li T., Ciancio M., Zaborin A., Petrof E.O., Turner J.R., Rahme L.G., Chang E., Alverdy J.C.: Dynorphin activates quorum sensing quinolone signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, **3**, e35 (2007)

Beata Tokarz-Deptuła<sup>1\*</sup>, Joanna Śliwa-Dominiak<sup>2</sup>, Mateusz Adamiak<sup>1</sup>,  
Michał Kubiś<sup>1</sup>, Anna Ogórkiewicz<sup>2</sup>, Wiesław Deptuła<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra Immunologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński  
<sup>2</sup>Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Wpłynęło w marcu 2013 r.

1. Wprowadzenie. 2. Wirofag Sputnik. 3. Wirofag Sputnik 2. 4. Wirofag Mavirus. 5. Wirofag OLV. 6. Inne wirofagi. 7. Wirofagi a wirusy satelitarne. 8. Podsumowanie

### Virophages – new biological elements

**Abstract:** Virophages are viruses which infect mainly giant viruses, from so-called super-family NCLD (nucleocytoplasmic large DNA viruses), which includes Mimivirus, Mamavirus, Lentille, CroV or Phycodna virus. They occur in the aquatic environment as infectious agents, especially for protozoa, flagellates, algae and micro-algae (mainly *Spirulina* sp. and *Chlorella* sp.). The first known virophage was Sputnik, for which the dominant host is Mamavirus living on the protozoa *Acanthamoeba* (*A.*) *polyphaga*. However, it can infect also Mimivirus living on protozoa *A. castellanii*. Sputnik was also considered as satellite virus, as its replication cycle requires the presence of Mamavirus or Mimivirus and also its genetic material is DNA. Thus, it is the first described dsDNA satellite virus. This virophage has its own gene encoding the capsid and its replication takes place in the Mamavirus and/or Mimivirus “factories”, creating a link between viruses and the animated world. The second discovered virophage after Sputnik was Sputnik 2, which was found in amoeba contaminated fluid (*Acanthamoeba polyphaga*) infected with the giant virus – *Lentille*. Sputnik 2, similarly to Sputnik, has the ability to introduce its DNA into the host genome, as evidenced by the discovery of its small fragments in the *Lentille* virus genome. The third discovered virophage was Mavirus, for which the host is a CroV virus (*Cafeteria roenbergensis virus*) infecting algae *Cafeteria* (*C.*) *roenbergensis*. Mavirus differs from Sputnik and Sputnik 2 as its cubic capsid has a diameter of 60 nm and its genome was found to be closely related to the class of eukaryotic DNA transposons. Thus, it has been proposed that Mavirus might have given a start to DNA transposons in Maverick/Polinton class. The fourth described virophage is the Organic Lake Virophage (OLV). It has been identified by similarity in its capsid protein sequence to the already discovered protein sequences in Sputnik. In addition to the four virophages described in this work, there are also other registered virophages, such as Yellowstone Lake Virophage (YSLCV) 1, 2, 3, 4 and Ace Lake Mavirus – ALM.

1. Introduction. 2. Sputnik virophage. 3. Sputnik 2 virophage. 4. Mavirus virophage. 5. OLV virophage. 6. Other virophages. 7. Virophages and satellite viruses. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** ALM, OLV, Sputnik 1, 2, wirofagi, YSLV

**Key words:** ALM, OLV, Sputnik 1, 2, virophage, YSLVs

## 1. Wprowadzenie

Jedną z najbardziej zdumiewających informacji z zakresu faktów biologicznych w ostatnich kilku latach była wiadomość o istnieniu wirusów mogących atakować wirusy, a które nazwano wirofagami – „pożeraczami wirusów” [29, 35]. Fakt, że wirusy atakują komórki bakteryjne był znany już od 1896 roku i te określono jako bakteriofagi. Wśród wirusów opisano również bardzo ciekawe, groźne patogeny infekujące rośliny, nazwane od 1971 roku wiroidami. Natomiast obecnie zarejestrowano zdumiewający fakt, że wirus nie będący organizmem komórkowym, potrafi atakować inne wirusy, też nie będące komórkami.

Wykazano, że wirofagi infekują głównie olbrzymie wirusy – powyżej 400 nm – m.in. z rodzaju Mimivirus, którego przykładem jest APMV (*Acanthamoeba polyphaga mimivirus*), pierwszy opisany przedstawiciel wirusów olbrzymich, czy wirusy olbrzymie z rodzaju

Mamavirus [8, 9, 29]. Według La Scola [22] oprócz tych dwóch wirusów olbrzymich – Mimi- i Mamawirusów – występują także inne wirusy olbrzymie, określane jako NCLDV (Nucleocytoplasmic Large DNA Viruses), których 19 wyizolowano z prób środowiskowych, w latach od 2008 do 2010. Przyjmuje się, że aż 14 z nich, to wirusy o wymiarze większym niż 400 nm, wykazujące podobieństwo do pierwszego scharakteryzowanego wirusa olbrzymia – Mimiwirusa, które są infekowane przez wirofagi [6, 8, 21, 26, 29]. Opisane obecnie wirofagi, rzucają nowe światło na istotę „życia”, w tym wirusów i pokazują, że została przekroczona bariera dzieląca wirusy od organizmów komórkowych [6, 26, 27, 35], co w szczególności wiąże się z faktem opisanym wirusa nazwanego Mamawirusem, większego od odkrytego wcześniej Mimiwirusa [5, 29]. Wykazano, że oba te wirusy olbrzymie (Mimiwirus i Mamawirus), pod wieloma aspektami są do siebie podobne [5, 6, 8, 21, 26], a ponadto wykazano, że na kapsydzie Mamawirusa

\* Autor korespondencyjny: Katedra Immunologii, Wydział Biologii US, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; tel. 91 444 16 10; fax 91 444 16 06; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl

Tabela I  
Opisane wirofagi [4, 7, 8, 14, 16, 27, 31, 34]

| Lp. | Wirofagi  | Miejsce występowania       | Zaobserwowane miejsce zakażenia i miejsce odkrycia  |
|-----|---|----------------------------|---|
| 1.  | Sputnik   | Mamavirus i Mimivirus      | Pierwotniak ( <i>Acanthamoeba (A) polyphaga</i> ) – woda z wieży wiertniczej w Bradford Pierwotniak ( <i>A. castellanii</i> ) |
| 2.  | Sputnik 2   | Lentille virus             | Pierwotniak ( <i>A. polyphaga</i> ) – płyn soczewek kontaktowych u kobiety  |
| 3.  | Mavirus   | CroV                       | Wiciowiec jednokomórkowy ( <i>Cafeteria roenbergensis</i> ) – woda morska Texasu bogata w zooplankton                         |
| 4.  | OLV (Organic Lake Virophage)                                  | Phycodna virus             | Glony morskie – woda silnie zasolonego Jeziora Organicznego na Antarktydzie   |
| 5.  | YSLV 1 (Yellowstone Lake Virophage 1) – materiał metagenomowy | Phycodna lub Mimivirus (?) | Mikroalgi? – wody jeziora w pakru Yellowstone   |
| 6.  | YSLV 2 (Yellowstone Lake Virophage 2) – materiał metagenomowy | Phycodna lub Mimivirus (?) | Mikroalgi? – wody jeziora w pakru Yellowstone   |
| 7.  | YSLV 3 (Yellowstone Lake Virophage 3) – materiał metagenomowy | Phycodna lub Mimivirus (?) | Mikroalgi? – wody jeziora w pakru Yellowstone   |
| 8.  | YSLV 4 (Yellowstone Lake Virophage 4) – materiał metagenomowy | Phycodna lub Mimivirus (?) | Mikroalgi? – wody jeziora w pakru Yellowstone   |
| 9.  | ALM (Ace Lake Mavirus) – materiał metagenomowy                | Mimivirus (?)              | Pierwotniaki? – wody Antarktyki   |

jest mały intruz, będący także wirusem [5, 6, 8, 21, 26]. Temu „pasażerowi” nadano sympatyczną nazwę Sputnik (ros. „towarzysz podróży”), na cześć nazwanego tak pierwszego satelity Ziemi [6, 8, 20, 26, 28, 29]. Wykazano także, że dominującym gospodarzem dla Sputnika jest Mamavirus, żyjący na pierwotniakach *Acanthamoeba (A) polyphaga*, choć dowiedziono, że Sputnik może również skutecznie infekować Mimiwirusa żyjącego na pierwotniakach *A. castellanii* i co ważne, z tą samą kinetyką replikacji [8, 28]. Fakty te dały początek badaniom tych niecodziennych „elementów” biologicznych jakimi są opisane wirofagi (tab. I), spośród których, w obecnej pracy opisano cztery – to jest Sputnik, Sputnik 2, Mavirus i OLV.

## 2. Wirofag Sputnik

Sputnik można uznać za najstarszy i pierwszy poznany – w 2008 roku – wirofag, który jest małym dsDNA wirusem o ikosaedralnym kapsydie średnicy ok. 74 nm [5]. Jego kapsomery są formowane z trimerycznych cząsteczek głównego białka kapsydu, złożonych w pseudoheksamerycznych i pentamerycznych jednostkach, tworzących zewnętrzną powłokę kapsydu w wirionie [21] i są ulokowane w wierzchołkowej części kapsydu, nie tworząc wypukleń. W centralnej części pentameru tworzą jamę, która może służyć jako portal do wyjścia lub wejścia DNA [31, 34]. Badania mikroskopią elektronową wirofaga Sputnik wykazały także obecność dwuwarstwowej lipidowej błony pod jego kapsydem, co potwierdzono badaniami za pomocą spektrometrii mas,

a która to błona składa się od 12% do 24% z lipidów, w tym głównie z fosfatydyloseryny, co dowodzi o istnieniu tłuszczowej membrany wewnątrz Sputnika, otaczającej DNA [8]. Obecnie wiadomo, że infekcja ameb *A. polyphaga* przez Sputnik, zachodzi tylko z udziałem Mamawirusa oraz Mimiwirusa. Potwierdzeniem tych faktów są badania zespołu La Scola [8, 21], w których wykazano, że infekcja tych ameb Sputnikiem, przy jednoczesnym braku Mama- czy Mimiwirusa, nie spowodowała lizy komórek ameb, co potwierdzone zostało wykazaniem braku cząstek Sputnika w tych amebach, w obrazie mikroskopii elektronowej (TEM) i immunofluorescencyjnym, choć nadal droga wnikania Mama- czy Mimiwirusów do ameb, jest mało poznana [8, 21]. Jedynie wykazano, że w przypadku Mimiwirusa dostaje się on do ludzkich i mysich makrofagów na drodze fagocytozy, czyli mechanizmu najczęściej utożsamianego z pochłanianiem zarazków przez komórki fagocytujące np. komórki PMN (polimorfonuklearne – granulocyty obojętnochłonne) [8]. Ponadto dowiedziono, że włókna powierzchniowe tak Mamawirusa jak i Mimiwirusa, mające glikozylowane białka długości ok. 140 nm i średnicy 1,4 nm, przyczyniając się do ich wyjątkowej wielkości i są oddzielone białkiem czołowym o około 25 kDa, które jest przymocowane do kapsydu [20]. To gęste pokrycie kapsydu tymi włóknami, tworzy warstwę ochronną, odporną na proteazy, co sprawdzono traktując te wirusy lizozymem [31]. Pokrycie to przypomina peptydoglikan występujący w bakteriach i możliwe, że ten element przyczynia się też do aktywacji mechanizmu wejścia Mamawirusa i Mimiwirusa, w tym także innych olbrzymich wirusów min. do ameb [6, 8, 20, 27,

31]. Wykazano, że dzięki włóknom powierzchniowym olbrzymich wirusów, wirofag Sputnik może być pochłaniany wraz z Mama- i Mimiwirusami przez ameby, do tej samej wakuoli endocytarnej [8, 29]. Dowiedziano to przy pomocy immunofluorescencji mysimi przeciwciałami anty-Sputnik, które wykryto wewnątrz ameby, już w 30 min po infekcji wirusami olbrzymimi (Mama- i Mimiwirusem) [8]. Ponadto lokalizacja sygnałów Sputnika i Mimiwirusa u ameb dodatkowo wskazuje, że oba te wirusy rozpoczynają funkcjonowanie, w tych samych endocytarnych wakuolach [8]. Natomiast jak do tej pory, nieopisano mechanizmu uwalniania genomu Sputnika z cytoplazmy ameb, choć przyjmuje się, że prawdopodobnie uwalnia się on dzięki „dostawom” do ameb między innymi Mimiwirusa [8]. Obecnie wiadomo jest, że w trakcie replikacji, genom Mimiwirusa wydostaje się przez otwór utworzony w błonie endocytarnej wakuoli w amebie i wewnętrznej błonie wirusowej, co stanowi element procesu związanego z przegrupowaniem na dużą skalę kapsydu Mimiwirusa [34]. Stwierdzono, że genom Mimiwirusa, jest zamknięty w pęcherzyku (rdzeń Mimiwirusa), który prawdopodobnie pochodzi z wewnętrznej błony wirusa [34]. Mikroskopią elektronową stwierdzono, że transkrypcja nowosyntetyzowanych cząsteczek mRNA Mimiwirusa zachodzi dość szybko, bo jego gromadzenie rejestruje się już 4 godziny po infekcji w obszarach położonych na obwodzie rdzenia wirusa, a uwalnianie wirionów potomnych Mimiwirusów zachodzi między 6 i 8 godziną po zakażeniu [8]. Ta mimiwirusowa „fabryka” działa tak, że potomne wiriony Sputnika zaczynają być wytwarzane na jednym biegunie, przed syntezą nowych cząsteczek Mimiwirusów, która zachodzi na drugim biegunie. Czasami proces ten wydaje się być podzielony na dwie części: A – część wypełniona „potomstwem” Sputnika i B – produkująca Mimiwirusa [8, 17]. Zarejestrowano, że po 16 godzinach od infekcji ameby przez Mimiwirus, komórki tych organizmów są całkowicie wypełnione nowo utworzonymi wirionami Mimiwirusa, ale także wirofagami Sputnika, z tym, że cząstki Sputnika lokalizują się w cytoplazmie ameby lub w okolicach lipidowej błony wakuoli [8, 17]. Wykazano też [8], że około 92% komórek ameb ulega lizie po 24 h hodowli z kulturami Mamawirusa, podczas gdy tylko 79% lizuje po infekcji Mamawirusem i koinfekcji Sputnikiem, to znaczy, że obecność Sputnika w 13% obniża miano zakażenia Mamawirusem, co wskazuje, że Sputnik jest „lekiem” dla ameb. Wykazano, że Sputnik związany jest tylko ze szczególnym typem gospodarza, bo np. nie replikuje z *Marseillevirus* – innym olbrzymim wirusem NCLDV, stwierdzonym w zainfekowanej amebie [2] i innymi wirusami, podobnymi do niego [1]. Zatem Sputnik może „żyć” – bytować, w tzw. związku z wirusami, ale tylko podobnymi do Mimi-, czy Mamawirusa, chociaż ma wyższe powinowactwo do Mamawirusa [8].

Genom (dsDNA) Sputnika jest wielkości 18,343 pz, którego 21 genów koduje białka o wielkości od 88 do 779 aminokwasów, a kodony START i STOP, to głównie AUG i UAA [21]. Organizacja jego genomu jest podobna do organizacji innych genomów wirusowych, w tym bardzo szczelny jest układ zbudowany z małych nakładających się otwartych ramek odczytu (ORF) [8, 21]. Średnia odległość między dwoma ORF wynosi ok. 190 reszt nukleotydów [8, 21]. Dystrybucja genów kodujących białka Sputnika wykazuje stronniczość nici w kierunku dodatniej nici 17 ORF, a wysoka zawartość A+T (73%) w jego genomie, upodabnia go do Mamawirusa i Mimiwirusa [8]. Zarejestrowano także, że ekspresja genów Sputnika nie koduje własnej zależnej od DNA polimerazy RNA, stąd przypuszcza się, że może on wykorzystywać tę z transkrypcji Mimiwirusa. Dowodem na to jest wykrycie sygnału poliadenylacji w unikalnej strukturze „spinki do włosów” Mimiwirusa [2, 3] oraz obecność późnego promotora w genomie Sputnika [8]. Podobnie jak w przypadku innych wirusów eukariotycznych, u Mimiwirusa białka kodujące geny ulegają ekspresji w postaci poliadenylowanych transkryptów. Ponad 80% z jego dojrzałych cząsteczek mRNA, na końcu 3', zawiera sekwencje palindromowe, umożliwiając doskonale sparowania, z co najmniej 13 kolejnymi nukleotydami o strukturze podobnej do struktur „spinki do włosów” [2], których jak się zakłada, w genomie Sputnika jest 16 [3]. Wykazano także, że rozkład tych sygnałów nie jest przypadkowy, ponieważ 14 z nich, znajduje się w regionach międzygenowych, natomiast tylko 2 znajdują się w samych genach. Badając transkrypty mRNA Mimiwirusa dowiedziano, że transkrypcja jego genów jest regulowana przez wczesne, średnie i późne promotory, tak jak ma to miejsce u Sputnika [8]. Oceniając białka z oczyszczonych cząsteczek Sputnika za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej wykazano [21], że białka kodowane przez ORF 20, są w 55 spośród 60 wykrytych miejsc i odpowiadają one głównie osłonce białkowej wirionów [21]. Zidentyfikowano też dwa inne białka kodowane przez ORF 8 i ORF 19, które mogą odpowiadać drobnym białkom wirionów, wykazujących acetylację ich N-końcowych aminokwasów, powszechnych w komórkach eukariotycznych. Dowiedziano, że wirusowe cząstki Sputnika zawierają wszystkie wirusowe RNA, z wyjątkiem ORF 17, który koduje transpozazy, choć ORF 17 mRNA, wykryto już po 4 h od infekcji, co dokumentuje, że gen ten jest funkcjonalny [10].

### 3. Wirofag Sputnik 2

Drugi po odkryciu Sputnika, stwierdzony w płynie zanieczyszczonym amebą (*Acanthamoeba polyphaga*) zakażoną przez olbrzymi wirus – *Lentille*, to wirofag,

który nazwano Sputnik 2. Ciekawym faktem w przypadku tego wirofaga jest to, że w jego wnętrzu znaleziono małe fragmenty DNA w postaci ruchliwych, niezależnych kawałków, które także stwierdzone były w genomie wirusa *Lentille*. Takie ruchliwe cząsteczki „pasożytniczego” DNA mogą się włączyć samodzielnie w genom gospodarza – tak jak to czynią inne wirusy (np. HIV i Herpeswirus) umieszczając swoje DNA w genomie np. zakażonych zwierząt, lub zostać na zewnątrz. Fragmenty tego DNA nazwano transpozonami, honorując podobny ich charakter do transpozonów – tzw. genów skaczących [5, 9]. Są przypuszczenia, że dzięki takiej cesze Sputnika 2, może on stanowić pewien „środek transportu” – przenoszenia genów pomiędzy gospodarzem (amebą), a wirusem olbrzymim – w tym przypadku wirusem *Lentille* [9]. Ponadto cecha ta może być wyjaśnieniem tego, że różne wirusy olbrzymie mają często podobne geny.

#### 4. Wirofag Mawirus

Podczas badań mających na celu lepsze poznanie biologii wirusa *CroV* (*Cafeteria roenbergensis virus*) infekującego algi *Cafeteria* (*C.*) *roenbergensis* odkryto wirofag, który nazwano Mawirusem (nazwa pochodzi od Maverick virus) [4, 7, 8, 14, 16]. Mawirus różni się od Sputnika i Sputnika 2 tym, że ma kubiczny kapsyd o średnicy 60 nm. U tego wirofaga nie znany jest skład białek jego wirionu, z wyjątkiem opisanego, głównego białka kapsydu MV18 (putative major capsid protein) [8, 15, 16]. Dodatkowo wykazano, że białka kapsydu, zarówno Mawirusa, jak i Sputnika są do siebie podobne, natomiast nie wykazują one podobieństwa w stosunku do białek kapsydu innych wirusów [15, 16].

Genom Mawirusa jest kolistą cząsteczką dwuniciowego DNA (dsDNA) i składa się z 19 063 pz. W jego genomie stwierdza się obecność 20 sekwencji CDSs (protein-coding sequences) o średniej długości 883 nt, nazwanych MV01, MV02, MV03, MV06, MV13, MV15, MV16, MV18, MV19 i MV20 [15]. Ekspresja genów Mawirusa podlega „maszynerii” transkrypcyjnej wirusa *CroV* w późnym stadium infekcji [15, 16]. Dziesięć sekwencji CDSs Mawirusa wykazało homologię z sekwencjami białkowymi eukariontów, retrovirusów i bakterii oraz wirusów dsDNA, a także, co najmniej z czterema genami opisanymi u Sputnika [15, 16]. Stwierdzono, że Mawirus i Sputnik mają homologiczne geny kodujące białko kapsydu i stąd jak wspomniano, białko kapsydu tych dwóch wirofagów jest podobne [15,16]. Zarejestrowano, także, że gen MV01 koduje superrodzinę 3 helikaz (SF3H heli-case) podobnych do D5 ATPazy, która jest uważana za główną helikazę replikacyjną u wirusów NCLD [18].

W przeciwieństwie do NCLDV, gdzie domena SF3H znajdująca się na C-końcu primazy-helikazy białka fuzyjnego, domena S3H Mawirusa zlokalizowana jest na N-końcu i niewyjaśniono do tej pory jej funkcji [14, 16, 18]. Natomiast gen MV02 koduje integrazę należącą do superrodziny retrovirusowych integraz (rve-INTs) [11]. Odkryto również, że zarówno integrazy Mawirusa, jak i organizmów eukariotycznych zawierają C-terminalną domenę CHROMO, która jest konserwatywnym regionem ~60 aa, zdolnym do interakcji z poszczególnymi częściami chromatyny [14, 15, 16]. MV03 koduje polimerazę B DNA (predicted protein-primed DNA polymerase B), której homologi występują u bakteriofagów, adenowirusów, jak również jako genom mitochondrialny roślin, grzybów i śluzowców [15]. MV06 koduje endonukleazy GIY-GIY, zaś MV13 zawiera domeny hydrolaz alpha/beta podobne do domen znalezionych w lipazach [35]. MV15 koduje ATPazę FtsK-HerA, zaś MV16 proteazę cysteinową, natomiast MV18 koduje główne białko kapsydu [15]. Wykazano, że domena C-terminalna MV19 ma znaczące podobieństwo do łańcuchów powierzchniowych ściany komórkowej *Bdellovibrio bacterivorous*, zaś ostatnie białko MV20 tego wirofaga zwiera trzy powtórzenia FNIP/IP22 [15]. Te trzy powtórzenia o długości ~22 aa, są obecne u Mimiwirusów, śluzowców *Dictyostelium discoideum* i *Polysphondylium pallidum*, alg *Ectocarpus siliculosus*, a także w genomie wirusa olbrzymiego *CroV* [25]. Wykazano, że genom Mawirusa okazał się być ściśle związany z klasą eukariotycznych transpozonów DNA i stąd zaproponowano, by Mawirus dawał początek transpozonom DNA w klasie Maverick/Polinton. Powstała hipoteza, że pierwotne jego formy stanowiły ochronę przed infekcjami wirusów litycznych, co doprowadziło do transformacji, rozproszenia i utrwaleńia pochłoniętych wirusów w genomie wielu komórek eukariotycznych [14, 16]. Mimo, że nie jest możliwe odtworzenie tak wczesnych ewolucyjnych wydarzeń, wydaje się, że wirusowa teoria transpozogenezy tworzy nowe pytania, m.in. czy wirofagi mogą ingerować do genomu komórki eukariotycznej oraz czy wirofagi mogą uczestniczyć w poziomym transferze genów pomiędzy gigantycznymi wirusami [14, 16]. Przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego dowiedziono, że wirofag Mawirus dostaje się do komórki *C. roenbergensis* na drodze endocytozy, za pośrednictwem białka klatryno-zależnego i rozpoczyna replikację w *CroV*, co prowadzi do powstawania nieprawidłowych struktur jego kapsydu [15, 16]. Wykazano, że w trakcie zakażenia jądro gospodarza (*C. roenbergensis*) pozostaje nienaruszone, a cząsteczek wirusów, zarówno *CroV*, jak i Mawirusa nie zaobserwowano w nim aż do późnych etapów infekcji, co sugeruje, że replikacja tych wirofagów następuje wyłącznie w cytoplazmie [15, 16].



## 5. Wirofag OLV

Wirofag Jeziora Organicznego (OLV – Organic Lake Virophage,) został opisany po raz pierwszy podczas badań prowadzonych w latach 2006–2008 w wodach antarktycznego Jeziora Organicznego, przez australijski zespół badawczy prowadzony przez mikrobiologa Ricardo Caviccholi z Uniwersytetu Nowej Południowej Walii [33]. Zidentyfikowano go dzięki podobieństwu jego sekwencji białkowych w kapsydzie do odkrytych już wcześniej sekwencji białkowych znajdujących się w Sputniku [33]. Jego genom został wykryty między sekwencjami genomowymi Phycodnawirusów, które są dużymi wirusami atakującymi algi morskie z rodzaju *Pyramimonas* [32, 33]. OLV infekując Phycodnawirusy stwarza w tym środowisku warunki do lepszego wzrostu glonów w wodach jeziora i stwarza im warunki przetrwania [24, 32, 33]. Analiza sekwencji nukleotydowych pochodzących z próbek wody pobranej z Jeziora Organicznego, wykazała obecność nowych Phycodnawirusów – dużych dsDNA wirusów infekujących glony, wśród których zidentyfikowano wirowag OLV, posiadający kulisty genom o wielkości 26 421 pz. Przyjmuje się, że OLV replikuje w komórkach zakażonych Phycodnawirusem, hamując jego dalszą replikację [24, 32, 33]. Wykazano, że aż sześć genów OLV jest związanych z genami Phycodnawirusów, co sugeruje, że nastąpiła wymiana genów między wirusami, a wirowagami prawdopodobnie podczas jednoczesnego zakażenia tego samego gospodarza. W związku z tym, że jeziora antarktyczne mają długie cykle dnia i nocy, to wzrost śmiertelności Phycodnawirusów spowodowany atakiem wirowagów, może mieć istotny wpływ na utrzymanie stabilności mikrobiologicznej. Sekwencje genomu OLV stwierdzono również w próbkach wody pobranych z jeziora Ace [24, 32, 33], co sugeruje, że OLV może występować w środowiskach wodnych na różnych obszarach naszej planety [32]. Ciekawym jest fakt wykrycia homologów Sputnika w OLV, w regionach V20 kodujących białka chemotaktyczne monocyta MCP, V3 – kodujące ATPazę DNA oraz białka V13 – kodujące domniemaną polimerazę DNA, a także homologii genów o nieznannej funkcji w regionach V9, V18, V21 i V32 [33]. Ponadto, w genomie OLV wykryto region OLV12 pochodzący od wirusa infekującego *Chlorella*, co oznacza, że musiała nastąpić wymiana materiału genetycznego między OLV, a dsDNA Phycodnawirusem. Porównując genom OLV z genomem OLPV (*Organic Helper Phycodnaviruses*) wykazano, że 7408 pz OLV, kodujących 6 białek (OLV17-22) jest podobnych w 32–65% do sekwencji zarówno w regionach OLPV-1 i OLPV-2, obecnych u Phycodnawirusa atakującego algi morskie. Badania te umożliwiły zrozumienie roli niektórych regionów wykazując, że regiony OLV20 i OLV13, kodującą trójniciową strukturę kolagenu [33]. Stwier-

dzono, że OLV22 koduje małe białko (152AA) o nieznannej funkcji, jednak o wysokim podobieństwie do APMV. Natomiast niektóre geny znajdujące się w regionach OLV19 i OLV20 kodujące – podobnie jak regiony OLV20 i 13 – białka takie jak kolagen, prawdopodobnie ułatwiają interakcje pomiędzy wirowagiem, a atakowanym przez nie wirusem [33]. Opisano, że region OLV12 jest unikalny dla OLV, ponieważ składa się z C-końca i posiada konserwatywną domenę hipotetycznych białek należących do *Chlorella* wirusów oraz domenę N-końcową najbardziej zbliżoną do 3 klasy lipaz, które mogą odpowiadać za selektywność OLV w stosunku do PVs (Protein Variability Server), jak też homologii NCLDV, które są zaangażowane w replikacji DNA [33]. Domena helikaz OLV25 jest podobna do białka obecnego u zielonej algi morskiej *Ostreococcus lucimarinus*, co sugeruje związek OLV z gospodarzem. Wykazano, że geny charakterystyczne dla OLV, wskazują na umiejętność dostosowania się do systemu replikacyjnego OLPV [30]. Wirus OLV przede wszystkim posiada N6 adenospecyficzną metylotransferazę DNA, podobnie jak OLPV. W OLPV-1 geny bakteryjne restrykcyjnego systemu modyfikacji znajdują się w sąsiedztwie genu kodującego metylazę-S typu I, rozpoznającą białko domeny i helikazę DNA odległą ale związaną z III typem podjednostki endonukleazy restrykcyjnej [33]. Zarejestrowano, że prototyp *Chlorella* wirusa PBCV-1, ma zdolność ograniczania aktywności endonukleaz dostających się do wirionu i degradującego DNA gospodarza wkrótce po zakażeniu [33]. Wskazuje to, że N6 adenospecyficzna metylotransferaza DNA obecna w OLV, zmniejsza atak endonukleolityczny za pośrednictwem OLPV na komórki gospodarza [33]. W celu dokonania oceny, w jaki sposób OLV wpływa na aktywność OLPV oraz dynamikę wzrostu i rozwoju populacji gospodarza, wykonano stymulację Lotka-Volterra, w której założono, że OLV jest drapieżnikiem atakującym OLPV. To doświadczenie wykazało, że zmniejszyła się liczba OLPV w komórkach populacji algi morskiej, co udowadnia, że wirowag zmniejsza ogólną śmiertelność glonów, na których bytuje oraz co manifestuje się zwiększoną ich częstotliwością zakwitów w okresach letnich [19, 23, 33].

## 6. Inne wirowagi

Poznanie istoty głównie występowania wirowaga Sputnika, choć zapewne także i występowanie innych wirowagów (tab. I), rzuca nowe światło na temat „życia” w tym wirusów [6, 8, 26, 28, 35]. Wśród innych wirowagów oprócz Sputnika, Sputnika 2, Mawirusa, Organic Lake Virophage – OLV, zarejestrowano występowanie jeszcze 5 innych tj. Yellowstone Lake Virophage 1, 2, 3, 4 – YSLV-1, 2, 3, 4 i Ace Lake Mavirus – ALM (tab. I). Wirowagi te występują głównie na wirusach olbrzymich

z tak zwanej super – rodziny NCLD – nucleocytoplasmic large DNA viruses, jak Mimivirus, Mamavirus, Lentille, CroV czy Phycodna, które są głównie ich gospodarzem i które występują w środowisku wodnym jako czynniki zakaźne głównie dla mikroalg (głównie *Spirulina* sp. i *Chlorella* sp.) jak i prawdopodobnie pierwotniaków (tab. I). Przypuszcza się i to, że wirusy te mogą z czasem wyewoluować i zakażać także inne morskie organizmy [8]. Ponadto zwracając uwagę na obserwowane miejsca zakażenia i miejsce odkrycia wszystkich opisanych dotąd wirofagów (tab. I), jak wody z wieży wiertniczej w Bradford, płyn do soczewek kontaktowych, wody morskie Texasu, silnie zasolone wody Jeziora Organicznego na Antarktydzie czy wody jeziora parku Yellowstone (tab. I) wskazują, że nie ma granicy środowiska wodnego, co do ich obecności [8]. Przypuszcza się, że być może już wkrótce, będzie można klasyfikować opisane wirofagi (tab. I) jako czwartą domenę życia, co jeszcze kilka lat temu wydawałoby się absurdalne, bo przecież o samym wirusie wciąż nie można powiedzieć, że „żyje”, chociaż fakt, że może on być infekowany przez inne wirusy, zmienia podejście do istotnych aspektów definiujących „życie”, właśnie tych czynników zakaźnych [6, 8, 26, 28, 35]. Najbardziej poznany spośród wirofagów Sputnik [29], stał się ogniwem łączącym wirusy ze światem ożywionym, stąd można założyć, że w świecie mikrobiologii, w tym wirusologii, fakty z nim związane rzucają nowe spojrzenie, na te zdawałoby się dobrze dotąd poznane czynniki zakaźne, jakimi są wirusy, a wśród których dochodzi do licznych zmian ewolucyjnych. Ponadto metagenomiczne badania oceanu z ostatnich lat, ujawniły mnóstwo sekwencji genetycznych ściśle związanych z wirusami olbrzymimi, co nasuwa podejrzenia, że są one pasożytami planktonu i możliwe, że nośnikami nowych wirofagów, do tej pory nie zarejestrowanych. Ważnym wydaje się być i to, że podczas tych badań wód oceanu, wśród zidentyfikowanych w nich genów, ponad 70% jest takich, których nigdy wcześniej nie identyfikowano [26].

## 7. Wirofagi, a wirusy satelitarne

Wirusy satelitarne są czynnikami, które zależą od innego wirusa tzw. pomocniczego, który jest im potrzebny do replikacji. Ponieważ pierwszy opisany wirofag Sputnik wymaga obecności Mamawirusa lub Mimiwirusa aby osiągnąć swój cykl replikacji ale posiadający własny gen kodujący kapsyd, można go uznać za wirus satelitarny. Termin wirus satelitarny – satelita, został po raz pierwszy wprowadzony w 1962 roku przez Kassinis'a, opisującego związek między wirusem nekrozy tytoniu (TNV) i towarzyszącym mu małym wirusem nekrozy tytoniu (STNV) [8]. Wśród wirusów satelitarnych są dwie klasy, to jest wirusy wewnętrzne – o geno-

mie kodującym własne białka kapsydu oraz kwasy nukleinowe (ssDNA lub ssRNA) i wirusy o genomie nie kodującym żadnych białek strukturalnych [8].

Pierwsza klasa jest reprezentowana przez jeden z ludzkich wirusów związanych z adenowirusami – wirusami towarzyszącymi adenowirusom – AAV, (*adeno-associated virus*), które zostały odkryte w 1965 roku w preparatach wirusowych jako małe, bezosłonkowe wirusy z kapsydem ikosaedralnym w zakresie od 20 do 24 nm średnicy [8]. Obecnie AAV są sklasyfikowane jako *Dependovirus* w rodzinie *Parvoviridae*, ale nie są ujęte w grupie satelitarnych wirusów w klasyfikacji ICTV [12]. Druga klasa satelitarnych wirusów obejmuje wszystkie wirusy satelitarne [12] składa się z wirusów ssRNA infekujących owady (podgrupa 1) i rośliny (podgrupa 2). Przykładem wirusa z podgrupy 1 jest wirus satelitarny powodujący chroniczny paraliż pszczoł (CBPSV), który po raz pierwszy został opisany w 1980 roku [12], charakteryzujący się wielkością ok. 17 nm i posiadający jedno białko kapsydowe wielkości ok. 15 kDa [8]. Genom wirusa CBPSV, składa się z trzech fragmentów ssRNA równej wielkości i około 1100 reszt nukleotydowych każdy, o różnych strukturach drugorzędowych. Jednak nie jest do końca pewne, czy CBPSV jest prawdziwym wirusem satelitarnym [8]. Obecnie, za najbardziej uznane wirusy satelitarne uważa się jednak te, które przypominają STNV (wirusem nekrozy tytoniu), będący przedstawicielem podgrupy 2 i wszystkie one zależą od wirusów roślinnych, potrzebnych im do replikacji. Stąd w przypadku Sputnika można uznać go za satelitę (wirus satelitarny), gdyż wiadomo, że do swojej replikacji wymaga on obecności Mamawirusa i/lub Mimiwirusa. Sputnik jest pierwszym opisanym wirusem satelitarnym dsDNA, posiadającym genom o wielkości 18,3 pb i kapsydie o około 50 nm (średnicy o około 74 nm) i o głównej masie cząsteczkowej białka kapsydu wynoszącej 65 kDa, co pokazuje jego wielkość i co oznacza, że jest on większy niż obecnie znane wirusy satelitarne. Ponadto w przeciwieństwie do AAV, Sputnik nie może zainfekować ameby w przypadku braku Mamawirusa i/lub Mimiwirusa, stąd stwierdza się, że namnożenie Sputnika odbywa się w „fabrykach” Mamawirusa i/lub Mimiwirusa, co potwierdzono hybrydyzacją *in situ*, za pomocą sondy specyficznej dla Sputnika w Mamawirusie [8]. Ponadto zarejestrowano, że obniżenie zjadliwości wirusów jest m.in. związane ze zmniejszeniem ich replikacji, co jest często obserwowane w związku z wirusami satelitarnymi, choć w takich przypadkach nie zarejestrowano zmian w ich morfologii. Warto dodać, że wirofag Sputnik różni się od innych wirusów satelitarnych i tym, że nie hamuje procesu replikacji gospodarza, co prowadzi do wytwarzania cząstek Mamawirusa, ale z nadmierną grubością warstwy osłonki i niekompletnych skupisk włókien na obwodzie jego cząstek [8, 28].

## 8. Podsumowanie

Wśród takich niecodziennych form życia, jakim są wirofagi, w tym wirofag Sputnik, który można tak nazwać głównie w ze względu na jego miejsce występowania i możliwość zakażenia, zarejestrowano także i takie, które kolonizują wirusy ale i atakują wyższe organizmy, nie tylko pierwotniaki, ale także wiciowce, glony i mikroalgi. Te formy „życia”, wydaje się, że stwarzają nadzieję, iż w niedługim czasie mogą stać się nowymi elementami i formami, wśród opisanych obecnie trzech domen życia.

## Piśmiennictwo

- Boyer M., Raoult D. i wsp.: Gigant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 21848–21853 (2009)
- Byrne D., Grzela R., Lartigue A., Audic S.P., Chenivesse S., Encinas S.P., Claverie J.M., Abergel C.: The polyadenylation site of Mimivirus transcripts obeys a stringent „hairpin rule”. *Genome Res.* **19**, 1233–1242 (2009)
- Claverie J.M., Abergel C.: Mimivirus and its Virophage. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 49–66 (2009)
- Claverie J.M., Abergel C.: Mimivirus: the emerging paradox of quasi-autonomous viruses. *Trends Genet.* **26**, 431–437 (2010)
- Claverie J.M., Grzela R., Lartigue A., Bernadac A., Nitsche S., Vacelet J., Ogata H., Abergel C.: Mimivirus and Mimiviridae: Giant viruses with an increasing number of potential hosts, including corals and sponges. *J. Invert. Pathol.* **101**, 172–180 (2009)
- Claverie J.M., Ogata H.: How to Infect a Mimivirus. *Science*, **321**, 1305–1306 (2008)
- Culley A.: Virophages to viromes: a report from the frontier of viral oceanography. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 52–57 (2011)
- Desnues C., Boyer M., Raoult D.: Sputnik, a virophage infecting the viral domain of life. *Adv. Virus. Res.* **82**, 63–89 (2012)
- Desnues C., Raoult D. i wsp.: Provirophages and transpovirons as the diverse mobilome of giant viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 18078–18083 (2012)
- Desnues C., Raoult D.: Inside the lifestyle of the virophage. *Inter-virology*, **53**, 293–303 (2010)
- Desnues C., Raoult D.: Virophages question the existence of satellites. *Nature Rev. Microb.* **10**, 234 (2012)
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A.: *Virus Taxonomy: VIII<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, London, 2005
- Fischer M.G., Allen M.J., Wilson W.H., Suttle C.A.: Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 19508–19513 (2010)
- Fischer M.G., Suttle C.A.: A virophage at the origin of large DNA transposons. *Science*, **332**, 231–234 (2011)
- Fischer M.G.: Genetic and ultrastructural characterization of Cafeteria roenbergensis virus and its virophage Mavirus. *PhD thesis, Univ. Brit. Columbia*, Vancouver, 2011
- Fischer M.G.: Sputnik and Mavirus: more than just satellite virus. *Nat. Rev. Microb.* **10**, 88 (2012)
- Fischer M.G.: Wenn viren viren infizieren. *BIOspektrum*, **19**, 619–621 (2013)
- Iyer L.M., Balaji S., Koonin E.V., Aravind L.: Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res.* **117**, 156–184 (2006)
- Kurpovic M., Cvirkaite-Krupovic V.: Virophages or satellite viruses? *Nature*, **9**, 762–763 (2011)
- Kuznetsov Y.G., Xiao C., Sun S., Raoult D., Rossmann M., McPherson A.: Atomic force microscopy investigation of the giant mimivirus. *Virology*, **1**, 127–137 (2010)
- La Scola B., Raoult D. i wsp.: The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature*, **455**, 100–105 (2008)
- La Scola B., Campocasso A., N’dong R., Fournous G., Barrassi L., Flaudrops C., Raoult D.: Tentative characterization of new environmental giant viruses by MALDI-TOF mass spectrometry. *Intervirology*, **53**, 344–353 (2010)
- La Scola B., Raoult D.: The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature*, **455**, 100–104 (2008)
- Nature Website, <http://www.nature.com/news/2011/110328/full/news.2011.188.html> (17 Marca 2014 roku)
- O’Day D.H., Suhre K., Myre M.A., Chatterjee-Chakraborty M., Chavez S.E.: Isolation, characterization, and bioinformatic analysis of calmodulin-binding protein cmbB reveals a novel tandem IP22 repeat common to many *Dictyostelium* and Mimivirus proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**, 879–888 (2006)
- Pearson H.: ‘Virophage’ suggests viruses are alive. *Nature*, **454**, 677 (2007)
- Raoult D., Audic S., Robert C., Abergel C., Renesto P., Ogata H., La Scola B., Suzan M., Claverie J.M.: The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science*, **306**, 1344–1350 (2004)
- Ruiz-Sanez J., Rodas J.D.: Viruses, virophages, and their living nature. *Acta Virol.* **54**, 85–90 (2010)
- Tokarz-Deptuła B., Śliwa-Dominiak J., Kubiś M., Deptuła W.: Mimiwirus APMV, Mamawirus oraz jego wirofag – budowa i charakterystyka. *Post. Mikrobiol.* **52**, 105–109 (2013)
- ViralZone Website, [http://expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/670.html](http://expasy.org/viralzone/all_by_species/670.html) (17 Marca 2014 roku)
- Xiao C., Kuznetsov Y.G., Sun S., Hafenstein S.L., Kostyuchenko V.A., Chipman P.R., Suzan-Monti M., Raoult D., McPherson A., Rossmann M.G.: Structural studies of the giant mimivirus. *PLoS Biol.* **7**, 92 (2009)
- Yau S., Cavicchioli R.: Microbial communities in Antarctic lakes: entirely new perspectives from metagenomics and metaproteomics. *Microbiol. Austr.* **11**, 157–159 (2011)
- Yau S., Cavicchioli R. i wsp.: Virophage control of Antarctic algal host-virus dynamics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **108**, 6163–6168 (2011)
- Zauberman N., Mutsafi Y., Halevy D.B., Shimoni E., Klein E., Xiao C., Sun S., Minsky A.: Distinct DNA exit and packaging portals in the virus *Acanthamoeba* polyphaga mimivirus. *PLoS Biol.* **6**, 114 (2008)
- Zhou J., Zhang W., Yan S., Xiao J., Li B., Pan Y., Wang Y.: Diversity of virophages in metagenomic data sets. *J. Virol.* **87**, 4225–4236 (2013)

## CZynniki wirulencji grzybów z rodzaju *Candida* istotne w patogenezie zakażeń występujących u pacjentów żywionych pozajelitowo

Magdalena Sikora<sup>1\*</sup>, Marlena Gołaś<sup>1</sup>, Katarzyna Piskorska<sup>1</sup>, Ewa Swoboda-Kopec<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wpłynęło w marcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Czynniki ryzyka wystąpienia zakażenia o etiologii grzybiczej. 3. Czynniki wirulencji grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*. 4. Zjawisko wzrostu w postaci biofilmu. 5. Sekrecja enzymów hydrolitycznych. 6. Zjawisko dimorfizmu. 7. Podsumowanie

### Virulence factors of *Candida* species important in the pathogenesis of infections in patients with total parenteral nutrition

**Abstract:** Fungal infections constitute a vital clinical issue concerning various groups of patients, among them patients with total parenteral nutrition. The most common etiological infection factors, affecting the aforementioned group of patients, are among others yeastlike fungi. In clinical specimens, the predominant genus of yeastlike fungi, as isolated from the patients with total parenteral nutrition, is *Candida* spp. The species of yeastlike fungi of the *Candida* genus generate various pathogenic factors enabling invasion process and the progression of the subsequent infection stages. The most crucial of them are:

- ability to adhere and ability to form biofilms. This feature, with the mediation of adhesion proteins, enables the fungi to grow on the biomaterial surfaces, to invade the host's tissue, and conditions survival and existence in the environment;
- dimorphism. Creation of two antigenically different forms – yeast and hyphae – conditions specific escape from the immunological system of the macroorganism;
- high enzymatic activity. Hydrolytic, proteolytic and lipolytic activity, featuring primarily the adaptative function, is the indicator of the metabolic stimulation required for the infection process.

Due to the insignificant pathogenic potential of the *Candida* genus fungi, associated with the fact of their natural existence on skin and mucous membrane, the research is currently often directed at detection of the factors responsible for the colonisation and development of the fungal infections. These research attempts are aimed at differentiating between both processes.

1. Introduction. 2. Risk factors of fungal infections. 3. Virulence factors of the *Candida* genus. 4. The phenomenon of biofilm formation. 5. Hydrolytic enzymes secretion. 6. Dimorphism. 7. Conclusions

**Słowa kluczowe:** czynniki wirulencji, infekcje grzybicze, żywienie pozajelitowe

**Key words:** fungal infections, total parenteral nutrition, virulence factors

### 1. Wstęp

W grupach pacjentów chirurgicznych otrzymujących okołoperacyjne żywienie pozajelitowe stwierdza się więcej komplikacji infekcyjnych niż w grupach nieotrzymujących TPN (total parenteral nutrition – całkowite żywienie pozajelitowe). U tych pacjentów występuje więcej komplikacji nie infekcyjnych. Powikłania infekcyjne towarzyszące najczęściej żywieniu parenteralnemu to zapalenie płuc i bakteriemia [63]. Uogólnione infekcje odcewnikowe są powodem znacznej śmiertelności w grupach pacjentów otrzymujących TPN. Kolonizacja cewnika może również prowadzić do rozwinięcia infekcji miejscowych: septycznego, zakrzepowego zapalenia żył, wsierdza i innych infekcji ogniskowych [25].

Jako główną przyczynę infekcji pochodzenia odcewnikowego wskazywane są: gronkowce – *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*; pałeczki Gram-ujemne – *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* oraz grzyby drożdżopodobne. Według najnowszych danych infekcje odcewnikowe

mogą być spowodowane również przez inne mikroorganizmy, w tym ostatnio stwierdzone w Japonii zakażenie odcewnikowe *Bacillus cereus* [39]. Wśród izolatów grzybów drożdżopodobnych kolonizujących cewniki naczyniowe i najczęściej powodujących zakażenia, dominują gatunki *Candida albicans* [40] oraz *Candida parapsilosis* [9]. Wykazano, że ponad połowę wszystkich mikroorganizmów izolowanych z epizodów infekcji uogólnionych u osób otrzymujących długoterminowe leczenie żywieniowe stanowią bakterie Gram-dodatnie. Wśród nich dominują rodzaje *Staphylococcus* i *Enterococcus*. Bakterie Gram-ujemne to ok. 23% wszystkich izolatów. Najczęściej w materiałach klinicznych tej grupy chorych występują *K. pneumoniae* i *E. coli*. Grzyby drożdżopodobne hodowane są z 22% wszystkich materiałów. Autorzy podkreślają również, iż ok. 23% wszystkich epizodów infekcji uogólnionych posiada etiologię mieszaną [42, 43]. Obecnie obserwuje się stały wzrost zakażeń o etiologii grzybiczej. Zhao i wsp. oszacowali w swoich badaniach częstość zakażeń grzybiczych na 29% [82].

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel. 628-37-29; e-mail: sikorka78@yahoo.com

## 2. Czynniki ryzyka wystąpienia zakażenia o etiologii grzybiczej

Dane literaturowe wskazują potencjalne czynniki ryzyka wystąpienia kandydozy uogólnionej, którymi są: cewnikowanie wewnątrzżylne (97% przypadków), antybiotykoterapia (91%), żywienie pozajelitowe (54%), przebyty zabieg operacyjny (46%), terapia immunosupresyjna (38%), guz złośliwy (27%), wcześniej przebyta grzybica (26%), transplantacja narządu (16%), neutropenia (12%) oraz wcześniejsza kolonizacja (11%) [1, 28]. Najczęściej infekcje powodowane przez grzyby z rodzaju *Candida* rozwijają się u pacjentów z neutropenią lub defektem w funkcji neutrofilów bądź makrofagów [28]. Dowiedziono, że stosowanie całkowitego żywienia pozajelitowego zwiększa ryzyko wystąpienia kandydemii 3,8-krotnie w porównaniu do pacjentów nie przechodzących infekcji. Jako czynniki ryzyka predysponujące do rozwoju wystąpienia kandydemii wymieniane są: leukopenia, przewlekła niewydolność nerek, zabieg operacyjny w obrębie jamy brzusznej, pobyt na oddziale intensywnej terapii, cewnikowanie wewnątrzżylne, stosowanie żywienia parenteralnego i długookresowa kortykoterapia [2]. U pacjentów z rozwiniętą kandydemią obserwowana jest podwyższona częstość kolonizacji grzybami z rodzaju *Candida* oraz występowanie wcześniejszych infekcji np. kandydurii. Stosowanie TPN zostało zakwalifikowane jako czynnik predysponujący do rozwoju kandydemii i może stać się przyczyną nawracających infekcji grzybiczych [9]. Zaobserwowano również następującą interakcję pomiędzy stosowaniem całkowitego żywienia parenteralnego, a neutropenią występującą u pacjentów. Stosowanie TPN stanowi czynnik ryzyka wystąpienia kandydemii jedynie w przypadku braku neutropenii. Natomiast sama neutropenia jest czynnikiem ryzyka jedynie przy braku TPN [30]. Drożdżaki *Candida* spp. znajdują się w chwili obecnej na czwartym miejscu wśród najczęściej spotykanych czynników etiologicznych infekcji uogólnionych; ich liczba wzrasta na oddziałach intensywnej terapii. Chow i wsp. wyodrębnili sześć niezależnych czynników predysponujących do rozwoju infekcji uogólnionych o etiologii innej niż *C. albicans* między innymi: operacja przebyta przed przyjęciem na oddział intensywnej terapii oraz stosowanie TPN. Natomiast do czynników ryzyka predysponujących do rozwoju infekcji uogólnionych o etiologii *C. albicans* zakwalifikowano między innymi operacje przeprowadzone podczas pobytu na oddziale intensywnej terapii i ponownie stosowanie TPN [12]. Według niektórych danych 80% infekcji uogólnionych o etiologii *Candida* spp., związanych z wysoką – 50% śmiertelnością, rozwija się u pacjentów przebywających na oddziałach intensywnej terapii i ambulatoryjnych cewnikowanych do żyły centralnej. Stwierdzono, że istotnym czynnikiem ryzyka u tych pacjentów jest stosowanie żywienia parenteralnego [1, 13].

### 2.1. *Candida* spp. jako czynnik etiologiczny infekcji

Ponad 17 gatunków z rodzaju *Candida* to czynniki etiologiczne zakażeń u ludzi [57]. Wśród nich drobnoustrojami najczęściej wywołującym infekcje jest *C. albicans*. Inne gatunki to *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis* [57, 69]. Mogą one wywoływać zakażenia endogenne i egzogenne. Natomiast *C. krusei* nie występująca wśród flory fizjologicznej – wyłącznie egzogenne [69]. Częstość infekcji egzogennych zwiększa się wraz ze wzrostem zastosowania cewnikowania wewnątrznaczyniowego i żywienia pozajelitowego [21].

Infekcje inwazyjne powodowane przez grzyby z rodzaju *Candida* stanowią poważny problem u chorych z obniżoną odpornością. Głównymi czynnikami ryzyka są: obecność cewnika w żyłę centralnej, żywienie pozajelitowe, antybiotykoterapia, przewlekła niewydolność nerek [3, 62] oraz długi pobyt na oddziale intensywnej terapii i wcześniejsza kolonizacja błon śluzowych przez komórki grzyba z rodzaju *Candida* [62]. Barberino i wsp. w oparciu o analizę jednozmienną ustalili, że wśród 69 przypadków jedynie 14 szczepów zostało zidentyfikowane jako *C. albicans*. Inne gatunki z rodzaju *Candida* odnaleziono w 8 przypadkach: *C. tropicalis* (4 izolaty), *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. famata* (po jednym izolacie). Autorzy wskazują na stały wzrost gatunków z grupy non-*albicans* jako czynników etiologicznych fungemii. Podkreślają również, że wzrost występowania tego rodzaju infekcji notowany jest głównie na oddziałach internistycznych i chirurgicznych, nie w klinikach onkologicznych lub transplantacyjnych. Sugerują, że infekcje grzybicze przestały dotyczyć jedynie pacjentów z niesprawnie działającym układem immunologicznym [3]. Przyjmuje się, że 90% przypadków grzybiczych infekcji uogólnionych powodowanych jest przez gatunki *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i *C. krusei*. *Candida albicans* jako czynnik infekcji uogólnionych występuje z różną częstością wahającą się od 37% w Ameryce Łacińskiej do 70% w Norwegii [42, 57, 62]. Dominacja w materiałach klinicznych gatunków *Candida* z grupy non-*albicans*: *C. glabrata* (49%), *C. tropicalis* (19%) oraz *C. parapsilosis* (18%), wskazuje najprawdopodobniej na stosowanie w leczeniu, u tych pacjentów, flukonazolu w terapii i profilaktyce [12, 43]. Obecnie notowane są również przypadki kandydemii o etiologii *Candida famata*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* i innych [42].

#### 2.1.1. *C. glabrata* i *C. krusei* – czynniki etiologiczne infekcji

Pomimo, że *Candida albicans* nadal jest dominującym gatunkiem wśród czynników etiologicznych inwazyjnej kandydozy na drugie miejsce pod względem częstości izolowanych gatunków wysuwa się *Candida glabrata*. Stanowi ona istotny odsetek wśród izolatów:

20–24% całkowitej ich liczby w Stanach Zjednoczonych, 10–14% w Europie i 4–7% w Ameryce Łacińskiej [57, 62]. Częstość izolacji tego gatunku zależy od miejsca toczącej się infekcji. W ostatnich latach izolowany jest coraz częściej z błon śluzowych jamy ustnej pojedynczo lub jako gatunek towarzyszący *C. albicans*. Stał się również częstym czynnikiem etiologicznym zakażeń układu moczowego infekcji uogólnionych [41]. Gatunek ten wykazuje zmniejszoną wrażliwość na flukonazol, jeden z najczęściej stosowanych leków przeciwgrzybiczych. Infekcje powodowane przez *C. glabrata* stanowią poważny problem terapeutyczny. Wyniki badań donoszą, że zanotowano istotny związek pomiędzy zwiększoną zachorowalnością na infekcje pochodzenia *C. glabrata*, a wzrastającym wiekiem pacjentów [57]. Drugi z gatunków niosący naturalną oporność na flukonazol – *Candida krusei*, jest obecnie coraz częściej izolowany, jakkolwiek odsetek izolatów nie osiąga liczby szczepów *C. glabrata*. Sytuacja ta jest najprawdopodobniej spowodowana powszechnym stosowaniem flukonazolu również w profilaktyce, co w konsekwencji prowadzi do selekcji gatunków naturalnie opornych [18, 30, 62]. W chwili obecnej największy odsetek infekcji uogólnionych o etiologii *C. glabrata* stwierdza się w Stanach Zjednoczonych [1].

### 2.1.2. *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* – czynniki etiologiczne infekcji

Wśród patogenów grzybiczych izolowanych z przypadków fungemii odcewnikowych notowany jest stały wzrost wyhodowań *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*. Fungemie o etiologii *C. albicans* stanowią jedynie ok. 1/5 przypadków [43].

Fungemie powodowane przez gatunki *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* dominują w szpitalach w Europie, Kanadzie i Ameryce Łacińskiej [1, 29]. Przyjmuje się, iż ok. 38% zakażeń *C. parapsilosis* stanowi przypadki pozaszpitalne, związane ze stosowaniem cewników wewnątrzżylnych i żywienia pozajelitowego [57]. Gatunek ten dominuje wśród izolatów wyhodowanych ze środowiska cewnika. Jako przyczynę wysokiej częstości jego izolacji autorzy podają zdolność do wytwarzania biofilmu na powierzchni biopolimerów [1, 13]. *C. parapsilosis* stała się również drugim pod względem częstości izolacji gatunkiem występującym u pacjentów z kandydemią. Przyczyna wzrostu liczby tego typu infekcji jest w chwili obecnej tematem dyskusji. Przyjmuje się, że gatunek ten posiada znacznie większą zdolność adhezji do powierzchni sztucznych np. akrylu niż *C. albicans*. Cecha ta zwiększa możliwość kolonizacji i ekspansji gatunku [1].

*C. tropicalis* jest czwartym najczęstszym gatunkiem powodującym zakażenia uogólnione w Ameryce Północnej (7% przypadków). Czynnikiem ryzyka związa-

nymi z wystąpieniem infekcji są: neutopenia i występowanie mukozytów [57]. Wykazano, że gatunek ten jest najczęstszym czynnikiem etiologicznym fungemii u pacjentów onkologicznych [29, 54].

### 3. Czynniki wirulencji grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*

Możliwość inwazji do tkanek gospodarza, przeżycie i bytowanie w jego organizmie (dzięki stworzeniu odpowiedniej niszy) oraz rozwój infekcji, grzyby drożdżopodobne zawdzięczają posiadanym czynnikom wirulencji. Tavanti i wsp. wyróżnili następujące czynniki wirulencji u *C. albicans*: zmiana fenotypu, adhezyny, dimorfizm oraz wydzielanie enzymów hydrolitycznych takich jak proteazy aspartylowe i fosfolipazy [73]. Zdolność adhezji do tkanek gospodarza, zmian morfologii oraz sekrecji enzymów hydrolitycznych zostały opisane u wszystkich gatunków z rodzaju *Candida* [68]. Atrybuty wirulencji odgrywają istotną rolę podczas procesu kolonizacji oraz rozwoju infekcji, stając się tym samym czynnikami o dwójnej funkcji [50]. Patogeneza różnych form kandydozy zależy od zróżnicowanej i czasowej regulacji ekspresji genów związanych z dimorfizmem, adhezją i sekrecją enzymów [47]. Ze względu na niski potencjał wirulencji grzybów z rodzaju *Candida*, jedynie korzystne warunki panujące w organizmie gospodarza umożliwiają im rozwój infekcji. Zmiana formy komensalnej na inwazyjną możliwa jest podczas osłabienia mechanizmów obrony gospodarza [15, 47, 68].

#### 3.1. Zjawisko adhezji

Pierwszym, krytycznym etapem zakażenia grzybiczego jest adhezja komórek [36], złożony, wieloczynnikowy proces, angażujący kilka typów adhezyn [52]. Białka te wykazują różną ekspresję na komórkach drożdżowych i na powierzchni strzępek oraz pośredniczą w adhezji poprzez różnorodne mechanizmy [83]. W pierwotnym wiązaniu się komórek *Candida* do kolonizowanej powierzchni pośredniczą zarówno czynniki niespecyficzne np. hydrofobowość powierzchni lub siły elektrostatyczne jak i specyficzne białka adhezyjne [59]. Adhezja zachodzi zarówno na powierzchni błon śluzowych gospodarza jak również na powierzchniach sztucznych i zależy od różnorodnych czynników [18]. Komórki *Candida* wiążą się do kilkunastu białek matrix zewnątrzkomórkowego tkanek żywiciela, wśród których wymienić należy: fibronektynę, lamininę fibrynogen, czy kolagen typu I i IV [8]. Kluczową rolę w procesie kolonizacji odgrywają substancje adhezyjne, umożliwiające przyleganie komórek patogenu do komórek żywiciela.

### 3.2. Białka adhezyjne *Candida* spp. – mannoproteiny

Główne adhezyny *Candida* spp. – mannoproteiny są zawarte w ścianie komórkowej grzyba i pośredniczą w przyleganiu do nabłonków. Szczepy cechujące się wyższą zdolnością adhezyjną cechuje tym samym większa patogenność [20]. W porównaniu z gatunkami *C. albicans*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* mniejsze właściwości adhezyjne posiada *C. glabrata*. Jako przyczynę tego zjawiska podaje się brak zdolności tworzenia strzępki właściwej przez ten gatunek [47]. Mannoproteiny wiążą się do powierzchni epitelium poprzez receptor glukozydów, który może być glikosfingolipidem lub antygenem grupy krwi. Istotną rolę w przyleganiu pełni również hydrofobowość powierzchni komórki, ma ona znaczenie w szczególności podczas adhezji do materiałów sztucznych [18]. Mannoproteiny posiadają również dodatkowe znaczenie, pochodzący z nich wielocukier jest związkiem o działaniu degradującym tkanki i hamującym funkcje neutrofilów [20].

### 3.3. Białka adhezyjne *Candida* spp. – EPA i ALS

Główne adhezyny występujące u *C. glabrata* to produkty genów EPA (epithelial adhesin – nabłonkowe białka adhezyjne) [53]. Rodzina genów EPA składa się z kilkunastu przedstawicieli, wśród nich najistotniejszą rolę odgrywa EPA1 kodujący lektynę. Udowodniono, że mutanty pozbawione produktu genu EPA1 wykazują zredukowane właściwości przylegania do powierzchni kolonizowanej [41, 80]. Delecja genu EPA6 powoduje natomiast zredukowanie zdolności tworzenia biofilmu [34]. U gatunku *C. albicans* istotną rolę w adhezji odgrywa rodzina genów ALS (agglutinin-like sequence, sekwencja genu przypominająca aglutyninę) kodująca osiem białek [11, 53] przypominających budową proteiny powierzchniowe Epa. Wykazują one dużą homologię z aglutyninami *S. cerevisiae* [8]. W ich sekwencji aminokwasowej wykryto domeny odpowiedzialne za formowanie agregatów o charakterze amyloidu. Komórki drożdżowe ekspresjonujące ten typ adhezyn powierzchniowych wykazują szybkie tempo agregacji, agregaty posiadają cechy amyloidu [61]. Przyleganie komórek *Candida* do podłoża i dalszy rozwój biofilmu zależy od dwóch typów białek powierzchniowych: Als1/3 oraz Hwp1 (hyphal-specific cell wall protein – białko ściany komórkowej charakterystyczne dla formy strzępkowej). Uważa się, że funkcjonują one jako wzajemnie uzupełniające się adhezyny powierzchniowe. Als1 i Als3 są do siebie bardzo zbliżone zarówno pod względem sekwencji, regulacji i funkcji. Hwp1 to proteina znana jako substrat dla transglutaminazy, umożliwiająca kowalentne wiązanie *C. albicans* do komórek epitelium. Dostępne dane sugerują, iż w trakcie powstawania środowiska biofilmu białka Als1/3 wiążą się do powierzchni sąsiednich

komórek poprzez białko Hwp1 [53, 83]. Proces wzajemnego wiązania się pojedynczych strzępek jest ważnym etapem procesu tworzenia biofilmu [83]. Białko Als1 jest szczególnie istotne w procesie adhezji do błon śluzowych we wczesnym etapie infekcji [80]. Wielu badaczy podkreśla rolę pozostałych białek z rodziny Als w procesie adhezji. Udowodniono, że do osiągnięcia maksymalnego poziomu adhezji do komórek endotelium wymagany jest równoczesny, wysoki poziom ekspresji dwóch adhezyn Als2 i Als4 [24]. Podczas gdy Als 1, 3 i 5 pośredniczą w wiązaniu komórek drożdżowych do wielu składników tkankowych gospodarza np. komórek epitelium jamy ustnej, Als 6 i 9 posiadają znacznie bardziej ograniczone właściwości wiązań i nie wykazują adhezji do komórek nabłonkowych [83].

### 3.4. Inne istotne w procesie przylegania białka adhezyjne *Candida* spp.

Podczas badań nad heterologiczną ekspresją białek przez gatunki grzybów drożdżopodobnych u *C. albicans* została wykryta adhezyna Eap1 (extracellular adherence protein – zewnątrzkomórkowe białko adhezyjne). Jej struktura przypomina białka z rodziny Als. Udowodniono, że Eap1 pośredniczy w wiązaniu komórek grzybiczych do nabłonka nerkowego oraz do materiałów sztucznych np. polistyrenu [83]. Białko Int1 (integrin-like protein – białko przypominające integrynę) *C. albicans* odgrywa istotną rolę w adhezji i filamentacji komórek tego gatunku. Umożliwia ono wiązanie do fibrynogenu, lamininy i kolagenu, a mutanty pozbawione Int1 cechuje zmniejszona wirulencja i adhezja do komórek epitelium. Proteina ta przypomina budową receptory komórek ssaczy – integryny. Dostępne dane wymieniają jeszcze inną ważną cząstkę adhezyjną *C. albicans*, białko Mnt1 (Mannosyltransferase – transferaza mannozy). Błonowa proteina typu II istotna jest w procesie glikozylacji białek mannanem [8, 80]. Wśród innych gatunków z rodzaju *Candida* geny kodujące białka Als wykryto u *C. tropicalis* i *C. dubliniensis* [80, 83] oraz *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* i *C. guilliermondii* [83].

## 4. Zjawisko wzrostu w postaci biofilmu

Biofilm definiowany jest jako społeczna struktura mikroorganizmów związana z podłożem i zamknięta w zewnątrzkomórkowej matrix [10, 59].

### 4.1. Budowa biofilmu

Biofilm tworzy się zarówno na powierzchniach sztucznych materiałów jak również na błonach śluzowych w organizmie żywiciela. Składa się on z komórek

jednego lub więcej gatunków mikroorganizmów oraz z wytwarzanego przez nie zewnątrzkomórkowej matrix [17]. Matrix zbudowane jest zazwyczaj z glikoprotein i polisacharydów syntetyzowanych przez komórki drobnoustrojów tworzących strukturę [10]. Posiada kanały, poprzez które odbywa się transport substancji pomiędzy warstwą powierzchniową, a warstwami biofilmu położonymi głębiej. Komórki otoczone matrix ściśle do siebie przylegają. Biofilm jest strukturą heterogenną, ponadto zorganizowaną [19] i posiadającą wyspecjalizowane warstwy. Mikroorganizmy znajdujące się w dojrzałej formie biofilmu wykazują różnice w tempie wzrostu, metabolizmie, syntezie substancji zewnątrzkomórkowej, wymagań odżywczych czy też poboru tlenu [17]. Strzępki są podstawowym elementem wprowadzającym strukturalną integralność i wielowarstwową architekturę charakterystyczną dla dojrzałego, w pełni rozwiniętego biofilmu [59]. Biofilm utworzony przez grzyby drożdżopodobne z grupy non – *C. albicans* to twór jednowarstwowy z nieregularnymi skupiskami komórek Y i niewielkiej ilości matrix [19]. Biofilm *C. parapsilosis* nie wykazuje dwufazowego układu odrębnych warstw. Składa się z nieregularnych pasm utworzonych z komórek [48]. Szczepki tego gatunku tworzą mniejsze ilości biofilmu, o mniej złożonej strukturze niż gatunek *C. albicans*. Formy pseudostrzępkowe *C. parapsilosis* generują jego większe ilości w porównaniu z fenotypami złożonymi z komórek drożdżowych, dodatkowo cechuje się on większą inwazyjnością [75]. Architektura biofilmu *C. albicans* zależy od powierzchni kolonizowanego substratu. Biofilm wytworzony na gładkiej, hydrofobowej powierzchni posiada wyraźną, dwufazową strukturę złożoną z warstwy zaadherowanych blastospor pokrytą elementami strzępkowymi, osadzoną w warstwie pozakomórkowej matrix. Podczas gdy biofilm tworzony na powierzchni szorstkiej i nieregularnej to gęste pasma komórek rosnących wzdłuż nierównych krawędzi powierzchni podczas fazy dojrzewania, z przerostami komórek i macierzy w biofilmie dojrzałym [48]. W zależności od rodzaju i hydrofobowości kolonizowanej powierzchni biofilm może osiągać grubość 25–450 µm [45]. Skład białek i węglowodanów w matrix zewnątrzkomórkowej różni się w zależności od stadiów rozwoju biofilmu. W fazie wczesnego wzrostu zawiera ona mniej związków węglowodanowych w porównaniu do fazy dojrzałej [48].

#### 4.2. Występowanie oraz rola biofilmu

Zjawisko wytwarzania przez komórki *Candida* spp. biofilmu jest jedną z ważniejszych cech umożliwiających rozwój infekcji, ma duże znaczenie w patogenności oraz w samym procesie zakażenia [45]. Zjawisko to jest czynnikiem powodującym 65% wszystkich infekcji szpitalnych [17, 45]. Udowodniono, że infek-

cje powodowane przez izolaty *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* czy *C. glabrata* posiadające zdolność wytwarzania biofilmu cechuje wysoka śmiertelność [75]. Wiele danych sugeruje, że dwa gatunki *C. albicans* i *C. parapsilosis*, w szczególności izolaty pochodzące z zakażeń uogólnionych posiadają największą zdolność tworzenia biofilmu. Udowodniono również, iż stosowanie TPN stymuluje rozwój biofilmu, głównie *C. parapsilosis* [36, 67, 72]. Wzrost drożdżaków np. *C. albicans* w preparatach do żywienia pozajelitowego jest postrzegany jako ważny czynnik ryzyka rozwoju fungemii odcewnikowych u tej grupy chorych. W trakcie rozwoju struktury biofilmu, wytwarzane w odpowiedzi na dużą dostępność emulsji lipidowych formy strzępkowe, wspomagają adhezję patogenu i inwazję do tkanek. Struktura ta charakteryzuje się obecnością zwiększonej liczby elementów strzępkowych w porównaniu do biofilmu wytworzonego bez dostępu do substancji lipidowych [72]. Biofilm *Candida* często powstaje na biomateriałach, z których wykonywane są implanty, cewniki, drenaże oraz protezy [19, 48], mających bezpośredni kontakt z tkankami pacjenta [45]. Większość mikroorganizmów odpowiedzialnych za rozwój infekcji, związanych z używaniem tego rodzaju materiałów, jest w stanie przetrwać na ich powierzchni w bogatym w polisacharydy środowisku [48]. W organizmie żywym występowanie biofilmu najczęściej obserwuje się w jelicie grubym i jamie ustnej, gdzie zazwyczaj pełni rolę fizjologiczną [19].

#### 4.3. Rozwój biofilmu

Podczas rozwoju biofilmu wyróżnia się następujące fazy: wczesną, pośrednią, dojrzewania oraz rozsiewu. Faza wczesna trwa ok. 11 godzin od momentu adhezji pierwszych komórek do kolonizowanej powierzchni. Komórki drożdżowe w formie planktonicznej osiadają na niej i tworzą ściśle połączenia. Po upływie 3–4 godzin pojawiają się mikrokolonie. Następująca potem faza pośrednia (12–30 godzin) cechuje się wytwarzaniem przez komórki matrix składającej się z glikozyłowanych polisacharydów mannanowych. Na tym etapie komórki różnicują się na pseudostrzępki i strzępki. W fazie dojrzewania następuje dalsza produkcja macierzy, komórki grzybowe zostają całkowicie w niej uwięzione [11, 14, 19, 48, 72]. Strzępki tworzące się w warstwie podstawnej przerastają zewnątrzkomórkową matrix sięgając od blastospor poprzez całą szerokość warstwy [11]. Ostatnim etapem tworzenia biofilmu jest faza rozsiewania. Po osiągnięciu maksymalnej gęstości komórek w jego wnętrzu część blastospor posiadających zdolność do odłączania się od macierzy rozprasza się i inicjuje nowy biofilm w miejscu jeszcze niezajętym. Uważa się, że jest to proces regulowany przez cząsteczki sygnałowe, wydzielane w systemie komunikacji komórek.



Blastospory uwalniane ze skolonizowanej powierzchni posiadają istotną cechę umożliwiającą im opuszczenie zajmowanego środowiska – regulują posiadane adhezyny zmniejszając własną zdolność adhezji [14, 22, 44]. Należy podkreślić, iż na rozwój biofilmu ma wpływ wiele czynników, w tym cechy szczepu i środowisko wzrostu [72].

#### 4.4. Oporność biofilmu na leki przeciwgrzybicze

Cechą charakterystyczną szczepów grzybów tworzących biofilm jest ich oporność na większość leków stosowanych w terapii [19, 48] oraz ochrona przed układem immunologicznym gospodarza. Stężenie leków przeciwgrzybiczych wykazujące skuteczność w stosunku do szczepów zasiedlających biofilm osiąga wartości od 5 do 8 razy wyższe niż w przypadku szczepów nie osiadłych [46]. Badania dowiodły, że wykazują one wrażliwość jedynie na echinokandyny i lipidowe formy amfoterycyny B. Tolerancja wysokich stężeń związków przeciwgrzybiczych może być spowodowana obecnością struktury stanowiącej osłonę komórek przed niekorzystnymi warunkami środowiska zewnętrznego. Wśród przyczyn odgrywających istotną rolę w rozwoju oporności biofilmu podawane są: czynny wyrzut leku – efflux, niewystarczająca możliwość jego penetracji w głąb macierzy, obecność steroli w błonach komórkowych grzybów, zjawisko „phenotypic switching” (przełączanie fenotypowe), niska aktywność metaboliczna komórek oraz tworzenie komórek przetrwałych [10, 46, 48]. Niektóre dane sugerują również, że notowana oporność biofilmu może być wynikiem bardzo dużej gęstości/liczebności komórek występujących w tej strukturze [66].

### 5. Sekrecja enzymów hydrolitycznych

Enzymy wydzielane przez grzyby do środowiska są znanymi czynnikami wirulencji wszystkich grzybów drożdżopodobnych. Jednakże ich profil może wykazywać znaczne różnice w zależności od rozpatrywanego gatunku [36]. Profil wydzielanych enzymów a także ich aktywność, może wskazywać na stopień zjadliwości danego szczepu.

#### 5.1. Hydrolazy

Enzymy hydrolityczne pośredniczą w adhezji i inwazji komórek patogenu do tkanki gospodarza. N-acetylo- $\beta$ -glukozaminidaza i  $\alpha$ -mannozydaza hamują migrację neutrofilów i osłabiają aktywność granulocytów obojętnochłonnych. Esteraza, lipazy i fosfatazy są uważane za szczególnie ważne w pierwszej fazie zakażenia, ponieważ umożliwiają dostarczenie grzybom węgla niezbędnego do wszystkich procesów życiowych, a następnie do rozwoju zakażeń [4, 16].

Umożliwiają one penetrację patogenu do tkanek, przerywanie ich ciągłości i łez błon komórkowych, w szczególności w jamie ustnej i drogach rodnych [76].

#### 5.2. Proteazy

Proteazy aspartylowe wydzielane zewnątrzkomórkowo degradują keratynę i kolagen [5], a także białka związane z odpowiedzią immunologiczną gospodarza: łańcuch ciężki przeciwciał IgG,  $\alpha_2$ -makroglobulinę, białko C<sub>3</sub>,  $\beta$ -laktoglobulinę, laktoperoksydazę [58]. Doprowadzają do uszkodzenia nabłonka w miejscu inwazji i umożliwiają przemieszczanie się patogenu w obrębie tkanki. Natomiast proteazy kwaśne ochraniają komórki grzyba przed fagocytozą [5]. Szczepy grzybów charakteryzujące się wysoką sekrecją enzymów cechuje większa zdolność adhezji do komórek nabłonkowych i większa zjadliwość [38]. Dowiedziono, że wyższa aktywność proteaz asparaginowych występuje u szczepów izolowanych z ostrych stanów infekcyjnych [37].

Proteazy aspartylowe (Saps-secreted aspartyl proteases) zostały rozpoznane jako czynniki wirulencji od momentu ich odkrycia. Proteazy aspartylowe *C. albicans* są kodowane przez wielogenową rodzinę obejmującą przynajmniej 10 różnych wysoko regulowanych genów (*SAP1-10*) [73]. Geny zostały sklasyfikowane w trzy odrębne podrodziny w oparciu o sekwencję aminokwasową. Enzymy Sap1-3 utworzyły grupę o podobieństwie sekwencji 75%, natomiast Sap4-6 90% [23, 32, 33]. Proteazy te syntetyzowane są jako preproenzymy i wydzielane zewnątrzkomórkowo za pośrednictwem ścieżki sekrecyjnej [51]. Produkty białkowe genów SAP1-3 produkowane są zarówno przez komórki drożdżowe oraz formy pseudostrzępkowe *C. albicans*. Proteazy Sap4-6 wydzielane są głównie przez pseudostrzępki [23, 32]. Geny SAP1-3 wykazują ekspresję w początkowym stadium kolonizacji epitelium oraz podczas postępującego uszkodzania tkanek. Wskazuje to na rolę proteaz Sap1-3 w inicjowaniu infekcji w obrębie powierzchni błon śluzowych [50]. Geny kodujące proteazy aspartylowe SAP7 i SAP8 *C. albicans* nie wykazują pokrewieństwa między sobą ani z pozostałymi genami SAP. Podobny brak pokrewieństwa ustalono dla genów SAP9 i SAP10. Istotną cechą proteaz Sap9 i 10 jest C-terminalna sekwencja aminokwasowa, kotwicząca te białka w błonie komórkowej [47]. Analiza ich sekwencji dowiodła znacznego podobieństwa do genów proteaz YPS1 i 2 *S. cerevisiae* [35]. Ekspresja genów SAP8-SAP10 występuje stale pod wpływem większości czynników środowiskowych zarówno u formy drożdżowej jak i strzępkowej grzyba [32]. Produkcja kilku enzymów Sap posiadających różne optimum pH

najprawdopodobniej umożliwia *C. albicans* kolonizację i infekcje różnych tkanek i środowisk. Podczas gdy optymalne pH do aktywności proteaz wydzielanych przez formę drożdżową (Sap1-3) wynosi pomiędzy 3–5, optimum pH dla Sap4-6 – wydzielanych przez formę strzępkową to 5-7. Najwyższe ilości transkryptów genów SAP5, 6 i 9 wykryto wewnątrz struktury dojrzałego biofilmu [50].

Gatunek *C. albicans* nie jest jedynym gatunkiem *Candida* wydzielającym proteazy. Ich sekrecje wykazano również u innych gatunków z rodzaju *Candida* np. u *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* [5, 47]. Wykazano, że wiele patogennych gatunków *Candida* posiada geny SAP łącznie z: *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* [52]. *C. tropicalis* posiada cztery geny SAP, *C. parapsilosis* trzy, natomiast *C. dubliniensis* osiem [52, 56].

Geny kodujące proteazy aspartylowe *C. tropicalis* są od siebie odrębne i nie można ich sklasyfikować jako jednej rodziny, tak jak to przedstawiono u *C. albicans*. Podobieństwo ich sekwencji nie przekracza 63%. Gen SAP1 *C. tropicalis* jest jednak spokrewniony z SAP8 *C. albicans*, a gen kodujący SAP4 z rodziną SAP1-3 [47, 81].

Gatunek *C. glabrata*, który w ostatniej dekadzie zyskał duże znaczenie kliniczne, nie posiada w genotypie genów SAP, w związku z tym wykazuje niski poziom zewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej [41]. Według najnowszych danych gatunki nie wytwarzające proteaz Sap, produkują białka o aktywności proteaz aspartylowych blisko spokrewnionych z yapsynami *Saccharomyces cerevisiae*. Enzymy te, nazwane proteazami Yps odgrywają ważną rolę w wirulencji *Candida glabrata* [34,35]. W genotypie grzyba *C. glabrata* zidentyfikowano klaster 11 genów YPS kodujących proteazy aspartylowe, które pełnią istotną rolę w utrzymaniu integralności ściany komórkowej, adherencji do komórek gospodarza, przeżyciu komórek grzyba wewnątrz makrofagów oraz wirulencji [34, 56]. Dowiedziono, że enzymy Yps związane są kowalentnie ze ścianą komórkową *C. glabrata*, ich miejsce aktywne posiada kontakt ze środowiskiem zewnętrznym [78].

### 5.3. Fosfolipazy

Fosfolipazy to kolejna grupa enzymów odpowiedzialna za wirulencję grzybów z rodzaju *Candida*. Biorą one udział w adherencji komórek do tkanek gospodarza i ich penetracji [65]. Nazwa fosfolipazy odnosi się do grupy enzymów hydrolizujących wiązania estrowe w glicerofosfolipidach. W zależności od miejsca docelowego działania enzymy te dzielą się na fosfolipazy A, B, C i D oraz lizofosfolipazy (Lyso-PL) [27]. Pomimo, że fosfolipaza to ważny czynnik wirulencji *C. albicans* jej rola u innych gatunków pozostaje niejasna. Wiele szczepów *C. parapsilosis* wydziela fosfolipazę jednakże nie

ustalono korelacji pomiędzy jej aktywnością a miejscem rozwoju infekcji lub obecnością innych czynników wirulencji [36]. Komórki *C. albicans* syntetyzują kilka hydrolaz wykazujących aktywność fosfolipazy: A, B1, B2, C oraz D. Fosfolipaza B1 została scharakteryzowana jako główny czynnik wirulencji grzyba [64]. Obie formy enzymu: Plb1 oraz Plb2 są wydzielane zewnątrzkomórkowo [52]. Enzym ten posiada aktywności hydrolazy: fosfolipazy B i lizofosfolipazy oraz transacetylazy [27]. Fosfolipaza A jest związana z procesem pączkowania, natomiast D odgrywa istotną rolę w przemianie formy drożdżowej w strzępkową [64]. Sekrecja fosfolipazy *C. albicans* zachodzi podczas rozwoju strzępki. Jej najwyższa aktywność występuje na końcu strzępki, w miejscu kontaktu z tkanką. Ilość produkowanej przez komórki grzyba fosfolipazy różni się w zależności od szczepu i od miejsca infekcji. Izolaty hodowane z krwi wydzielają znacznie większe ilości tego enzymu niż izolaty z moczu. Sekrecja enzymu powiązana jest również z fenotypem szczepu. Wykazano, iż fenotypy *C. albicans* „star” i „ring” wydzielają fosfolipazę w ilości podobnej do fenotypu „dzikiego”. Natomiast fenotyp „stipple” wydziela jej do 34% więcej [27]. Mukherjee i wsp. udowodnili, że szczep pozbawiony genu PLB1 kodującego fosfolipazę cechuje się zmniejszoną wirulencją [49]. Wydzielanie fosfolipaz zostało wykryte również u innych gatunków z rodzaju *Candida*. Gatunek *C. glabrata* charakteryzuje się sekrecją enzymu o aktywności fosfolipazy B oraz lizofosfolipazy podobnie jak to zaobserwowano u *C. albicans* [27, 41]. Pomimo obecności i ekspresji genów kodujących fosfolipazy, ich rola w wirulencji gatunku *C. glabrata* jest wciąż analizowana i pozostaje kwestią sporną [34].

### 6. Zjawisko dimorfizmu

Wiele gatunków w tym *C. albicans* posiada zdolność wzrostu zarówno w formie jednokomórkowej (drożdżowej) i pseudostrzępkowej lub strzępkowej [77]. Zdolność ta polegająca na zmianie morfologii komórki nazwana została dimorfizmem [50]. Pączkujące blastospory *Candida* określane są mianem komórek Y (forma Y-yeast) natomiast forma micelialna nosi nazwę komórek M (forma M-mycelium). Zmiana form komórek uzależniona jest w dużym stopniu od warunków środowiska [19]. Morfologiczna zmiana komórek grzyba z drożdżopodobnej na pseudostrzępkową jest jedną z najważniejszych cech umożliwiających kolonizację, inwazję oraz przeżycie w tkankach gospodarza podczas infekcji [26]. Komórki drożdżowe pełnią istotną rolę w procesie rozsiewu patogenu do tkanek żywiciela, natomiast formy strzępkowe są najbardziej istotne w trakcie inwazji [55, 72, 74]. Udowodniono, że obie formy *C. albicans* są zdolne do wytworzenia struktury

biofilmu [11]. Morfologiczna rozbieżność form *C. albicans* związana jest z rozwojem infekcji, „ucieczką” przed działaniem leków przeciwgrzybiczych [26] oraz przed systemem immunologicznym gospodarza [65]. Mikroorganizm ten jest w stanie wzrastać w postaci dwóch form jednocześnie: pączkujących komórek drożdżowych oraz wydłużających się form strzępkowych. Z miejsca toczącego się zakażenia izolowane są zazwyczaj obie formy grzyba, jednakże uważa się, że to forma strzępkowa rozwinęła się pierwotnie jako mechanizm penetracji tkanek [26, 79]. Formowanie strzępki jest, więc istotne w rozwoju rozsianych infekcji głębokich [55]. Czynniki, które mają wpływ na morfologię grzybów są różnorodne. Sygnały środowiskowe: pH, temperatura, stężenie glukozy i tlenu są stymulatorami włączającymi zmiany genetyczne zaangażowane w ekspresję swoistych genów. Synteza białek regulatorowych i enzymów tworzy biochemiczną podstawę do wzrostu dimorficznego. Surowica krwi jest znanym czynnikiem mającym wpływ na transformację komórek *C. albicans* [26]. N-acetyloglukozamina związek syntetyzowany przez drobnoustroje bytujące w przewodzie pokarmowym indukuje proces filamentacji komórek drożdżowych zasiedlających błony śluzowe jelit. Udowodniono również, że związek ten jest silnym induktorem zjawiska „phenotypic switching” i wpływa na powstawanie strzępkowych form morfologicznych drożdżaków [31]. Wśród czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za dimorfizm u grzybów drożdżopodobnych wielu autorów za najistotniejszy uważa białko EFG1. Czynnikiem transkrypcyjnym EFG1 jest aktywatorem procesu transformacji formy drożdżowej w pseudostrzępkową poprzez oddziaływanie na szlak cAMP [26]. Aby uniemożliwić rozdział komórek w strzępcę, geny kodujące enzymy odpowiedzialne za ten proces muszą zostać zahamowane. Fosforyzowany, tym samym aktywowany czynnik Efg1 wiąże się do promotorów tych genów, powodując supresję ekspresji enzymów [77]. Obniżony poziom ekspresji czynnika EFG1 hamuje

tworzenie formy strzępkowej lecz nie pseudostrzępkowej. Podwójne mutanty Efg1/Efg1 wytwarzają strzępki morfologicznie różne od formy „dzikiej” [71]. Podczas rozwoju infekcji mutanty pozbawione czynnika EFG1 wykazują wysoce zredukowaną zdolność do tworzenia strzępki, pociąga to za sobą zmniejszenie syntezy proteaz Sap4-Sap6 [32, 50]. Udowodniono też, że mutanty nie posiadające genów filamentacyjnych wykazują zmniejszoną wirulencję i niższy poziom infekcyjności w stosunku do komórek endotelium [60]. Efg1 jest również kluczowym czynnikiem niezbędnym dla formowania i rozwoju biofilmu *Candida* [59, 60]. Drugi szlak sygnałowy decydujący o zmianie morfotypu *Candida* to ścieżka białek Ste [7, 8, 80]. Białko Ste12 to czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny między innymi za wzrost w postaci pseudostrzępkowej [7, 80]. Zidentyfikowano liczne białka będące supresorami morfogenezy u grzybów. Najistotniejszymi z nich są białka Tup1 i Rbf1. Szczep *C. albicans* pozbawiony białka Tup1 stale tworzy formę strzępkową [6, 8, 80]. Dowiedziono, iż gen TUP1 *C. albicans* koduje supresor genów odpowiedzialnych za generowanie wzrostu filamentowego [6].

## 7. Podsumowanie

Pacjenci otrzymujący TPN stanowią jedną z grup predysponowanych do rozwoju grzybic o etiologii *Candida* spp. Wiele dostępnych danych literaturowych podkreśla, iż szczepy grzybów drożdżopodobnych charakteryzują się różnymi poziomami wirulencji. Niezaprzeczalnym stał się fakt, że nie wszystkie szczepy jednego gatunku posiadają te same cechy inwazyjności i wirulencji. Najważniejszymi cechami wirulencji istotnymi w rozwoju zakażenia grzybiczego w grupie pacjentów otrzymujących całkowite żywienie pozajelitowe są: adhezja i zdolność do tworzenia środowiska biofilmu oraz sekrecja enzymów proteo- i lipolitycznych. W tabeli zestawiono czynniki wirulencji grzybów

Tabela I  
Czynniki wirulencji grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* oraz wpływ na rozwój infekcji

| Cecha wirulencji  | Wpływ na rozwój infekcji grzybiczej  |
|-------------------|--|
| ADHEZJA           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- kolonizacja cewnika do żywienia pozajelitowego</li> <li>- brak możliwości mechanicznego usunięcia komórek grzyba</li> <li>- możliwość rozwinięcia fungemii odcewnikowej</li> </ul>  |
| BIOFILM           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- kolonizacja cewnika do żywienia pozajelitowego</li> <li>- brak możliwości mechanicznego usunięcia komórek grzyba</li> <li>- możliwość rozwinięcia fungemii odcewnikowej</li> <li>- ochrona przed działaniem antymikotyków</li> <li>- aktywne namnażanie i rozsiew komórek patogenu</li> </ul> |
| PRODUKCJA LIPAZ   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- umożliwienie wykorzystania czynników odżywczych zawartych w emulsji do żywienia pozajelitowego</li> </ul>   |
| PRODUKCJA PROTEAZ | <ul style="list-style-type: none"> <li>- umożliwienie wykorzystania czynników odżywczych zawartych w emulsji do żywienia pozajelitowego</li> <li>- umożliwienie rozsiewu komórek patogenu do tkanek</li> </ul>   |

drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* oraz ich wpływ na rozwój infekcji.

Biorąc pod uwagę przedstawione czynniki należy podkreślić, iż sterylne przygotowywanie preparatów do żywienia, odpowiednia higiena cewników oraz regularne monitorowanie mikrobiologiczne chorych to kluczowe drogi zabiegania rozwojowi zakażeń grzybiczych u pacjentów otrzymujących TPN.

## Piśmiennictwo

- Almirante B.A., Rodriguez D., Cuenca-Estrella M., Almela M.: Epidemiology, risk factors and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002–2003. *J. Clin. Microb.* **5**, 1681–1685 (2006)
- Amrutkar P.P., Rege M.D., Chen H., LaRocco M.T.: Comparison of Risk factors for Candidemia Versus Bacteremia in Hospitalized Patients. *Infection*, **34**, 322–327 (2006)
- Barberino M.G., Silva N.: Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. *Brasil. J. Infect. Dis.* **10**, 36–40 (2006)
- Batura-Gabryel H., Brajer B., Kuźniar-Kamińska B.: Biotypy enzymatyczne grzybów z rodzaju *Candida albicans* wyizolowanych od chorych na przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POCHP). *Mikol. Lek.* **10**, 243–248 (2003)
- Batura-Gabryel H., Młynarczyk W.: Aktywność proteolityczna i lipolityczna grzybów z rodzaju *Candida* wyizolowanych od chorych na przewlekłe choroby układu oddechowego. *Mikol. Lek.* **7**, 139–143 (2000)
- Braun B.R., Head W.S., Wang M.X., Johnson A.D.: Identification and Characterization of *TUP1*-Regulated Genes in *Candida albicans*. *Genetics*, **156**, 31–44 (2000)
- Calcagno A.M., Bignell E., Rogers T.R., Canedo M.: *Candida glabrata* Ste 20 is involved in maintaining cell wall integrity and adaptation to hypertonic stress, and is required for wild-type levels of virulence. *Yeast*, **21**, 557–568 (2004)
- Calderone R.A., Fonzi W.A.: Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**, 327–335 (2001)
- Cano M.V., Perz J.F., Craig A.S. et al.: Candidemia in pediatric outpatients receiving home total parenteral nutrition. *Med. Mycol.* **43**, 219–225 (2005)
- Cate J.M., Klis E.M., Pereira-Cenci T., Crielaard W.: Molecular and Cellular Mechanism That Lead to *Candida* Biofilm Formation. *J. Dent. Res.* **88**, 105–115 (2009)
- Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L.: Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *J. Bacteriol.* **183**, 5385–5394 (2001)
- Chow J., Golan Y., Ruthazer R., Karcher A.W.: Risk factors for *albicans* and non-*albicans* candidemia in the intensive care unit. *Crit. Care Med.* **36**, 1993–1998 (2008)
- Clark T.A., Slavinski S.A., Morgan J., Lott T.: Epidemiologic and Molecular Characterization of an Outbreak *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections in a Community Hospital. *J. Clin. Microb.* **42**, 4468–4472 (2004)
- Cuéllar-Cruz M., López-Romero E., Villagómez-Castro J.C., Ruiz-Baca E.: *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol.* **7**, 755–771 (2012)
- Da Costa K.R.C., Ferreira J.C., Lavrador M.A.S., Baruffi M.D., Candido R.C.: Virulence attributes and genetic variability of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. *Mycoses*, **55**, 97–105 (2012)
- Dąbkowska M., Swoboda-Kopeć E., Kawecki D., Obuch-Woszczyński P., Stelmach E., Łuczak M.: Badanie aktywności enzymatycznej szczepów *Candida* izolowanych z materiałów klinicznych chorych z układową kandydozą. *Mikol. Lek.* **12**, 123–126 (2005)
- Dawgul M., Barańska-Rybak W., Kamysz W.: Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na zdolności adhezyjne *Candida albicans*. *Sepsis*, **2**, 189–193 (2009)
- Dimopoulos G., Ntziora F., Rachiotis G., Armaganidis A., Falagas M.E.: *Candida albicans* Versus non-*albicans* Intensive Care Unit-Acquired Bloodstream Infections: Differences in Risk Factors and Outcome. *Anesth. Analg.* **106**, 523–529 (2008)
- Dorocka-Bobkowska B., Konopka K.: Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych – przegląd piśmiennictwa. *Dent. Med. Prob.* **40**, 405–410 (2003)
- Dzierżanowska D., Dąbkowska M., Garczewska B.: Grzybice narządowe. Patomechanizm, diagnostyka mikologiczna i leczenie. *Medycyna Praktyczna* (2003)
- Essendoubi M., Toubas D., Lepouse C., Leon A.: Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy. *J. Microbiol. Methods*, **71**, 325–331 (2007)
- Estivill D., Arias A., Torres-Lana A., Carrillo-Muñoz A.J., Arévalo M.P.: Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *J. Microbiol. Methods*, **86**(2), 238–242 (2011)
- Felk A., Kretschmar M., Albrecht A., Schaller M., et al.: *Candida albicans* Hyphal Formation and the Expression of the EFG-1 – Regulated Proteinases SAP4 to SAP6 Are Required for the Invasion of Parenchymal Organs. *Infect. Immun.* **70**, 3689–3700 (2002)
- Filler S.G.: *Candida* – host cell receptor-ligand interaction. *Curr. Opin. Mikrobiol.* **9**, 333–339 (2006)
- Fraher M.H., Collins C.J., Bourke J., Phelan D., Lynch M.: Cost-effectiveness of employing a total parenteral nutrition surveillance nurse for the prevention of catheter-related bloodstream infections. *J. Hosp. Infect.* **73**, 129–134 (2009)
- Ghalehnoo Z.R., Rashki A., Najimi M., Dominguez A.: The role of diclofenac sodium in the dimorphic transition in *Candida albicans*. *Microb. Pathog.* **48**, 110–115 (2010)
- Ghannoum M.A.: Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 122–143 (2000)
- Grubb S. E. W., Murdoch C., Sudbery P.E., Saville S.P.: *Candida albicans* – Endothelial Cell Interaction: Key Step in the Pathogenesis of Systemic Candidiasis. *Infect. Immun.* **76**, 4370–4377 (2008)
- Hoffmann-Santos H.D., Paula C.R., Yamamoto A.C., Tadano T., Hahn R.C.: Six-year trend analysis of nosocomial candidemia and risk factors in two intensive care hospitals in Mato Grosso, midwest region of Brazil. *Mycopathologia*, **176**, 409–415 (2013)
- Hope W., Morton A., Eisen D.P.: Increase in prevalence of nosocomial non-*Candida albicans* candidaemia and the association of *Candida krusei* with fluconazole use. *J. Hosp. Infect.* **50**, 56–65 (2002)
- Huang G., Yi S., Sahni N., Daniels K.J., Srikantha T.: N-Acetylglucosamine Induces White to Opaque Switching, a Mating Prerequisite in *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* **6**, 1–13 (2010)
- Hube B., Naglik J.: *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of gene family. *Microbiology*, **147**, 1997–2005 (2001)
- Kalkanci A., Bozdayi G., Biri A., Kustimur S.: Distribution of Secreted Aspartyl Proteinases Using a Polymerase Chain Reaction Assay with SAP Specific Primers in *Candida albicans* Isolates. *Folia Microbiol.* **50**, 409–413 (2005)

34. Kaur R., Domergue R., Zupancic M.L., Cormack B.P.: A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 378–384 (2005)
35. Krysan D.J., Ting E.L., Abeijon C., Kroos L., Fuller R.S.: Yapsins Are a Family of Aspartyl Proteases Required for Cell Wall Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, **4**, 1364–1374 (2005)
36. Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Clark T.A., Pujol C.: *Candida parapsilosis* Characterization in an Outbreak Setting. *Emerging Infect. Dis.* **10**, 1074–1081 (2004)
37. Kurnatowska A.J., Kurnatowski P.: Biotypes of fungi isolated from patients with oral cavity diseases. *Mikol. Lek.* **5**, 213–217 (1998)
38. Kurnatowska A.J., Rózga A., Kurnatowski P.: Aktywność proteinyzyny asparaginowej szczepów grzybów izolowanych z jamy ustnej. *Mikol. Lek.* **6**, 21–25 (1999)
39. Kuwahara T., Kaneda S., Shimono K., Inoue Y.: Growth of Microorganisms In Total Parenteral Nutrition Solutions Without Lipids. *Int. J. Med. Sci.* **7**, 43–47 (2010)
40. Kuwahara T., Shimono K., Kaneda S., Tamura T., Ichihara M., Nakashima Y.: Growth of Microorganisms In Total Parenteral Nutrition Solutions Containing Lipids. *Int. J. Med. Sci.* **7**, 101–109 (2010)
41. Li L., Redding S., Dongari-Bagtzoglou A.: *Candida glabrata*, an Emerging Oral Opportunistic Pathogen. *J. Dent. Res.* **86**, 204–215 (2007)
42. Luzzati R., Cavinato S., Giangreco M., Granà G., Centonze S., Deiana M.L., Biolo G., Barbone F.: Peripheral and total parenteral nutrition as the strongest risk factors for nosocomial candidemia in elderly patients: a matched case-control study. *Mycoses*, **56**(6), 664–671 (2013)
43. Marra A.R., Opilla M., Edmond M.B., Kirby D.F.: Epidemiology of Bloodstream Infections in Patients Receiving Long-term Total Parenteral Nutrition. *J. Clin. Gastroenterol.* **41**, 19–28 (2007)
44. Mnichowska-Polanowska M., Giedrys-Kalemba S.: Metody i techniki stosowane w badaniach nad biofilmem *Candida*. *Mikol. Lek.* **16**, 238–242 (2009)
45. Mnichowska-Polanowska M., Kaczała M., Giedrys-Kalemba S.: Charakterystyka biofilmu *Candida*. *Mikol. Lek.* **16**, 159–164 (2009)
46. Mnichowska-Polanowska M., Kaczała M., Giedrys-Kalemba S.: Lekooporność oraz zwalczanie biofilmu *Candida*. *Mikol. Lek.* **16**, 165–169 (2009)
47. Monod M., Borg-von Zepelin M.: Secreted Aspartic Proteases as Virulence Factors of *Candida* Species. *Biol. Chem.* **383**, 1087–1093 (2002)
48. Mukherjee P.K., Chandra J., Kuhn D.M., Ghannoum M.A.: Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (*PLB1*) under various environmental and physiological conditions. *Microbiology*, **149**, 261–267 (2003)
49. Mukherjee P.K., Chandra J.: *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist. Updat.* **7**, 301–309 (2004)
50. Naglik R.J., Albrecht A., Bader O., Hube B.: *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interaction. *Cell. Microbiol.* **6**, 915–926 (2004)
51. Naglik R.J., Challacombe S.J., Hube B.: *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **3**, 400–428 (2003)
52. Naglik R.J., Rodgers C.A., Shirlaw P.L., Dobbie J.L.: Differential Expression of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase and Phospholipase B Genes in Humans Correlates with Active Oral and Vaginal Infections. *J. Infect. Dis.* **188**, 469–479 (2003)
53. Nobile C.J., Schneider H.A., Nett J.E., Sheppard D.C.: Complementary adhesion function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr. Biol.* **18**, 1017–1102 (2008)
54. Nucci M., Silveira M.I., Spector N., Silveira F., Velasco E., Martins C.A., Derossi A., Colombo A.L., Pulcheri W.: Fungemia in cancer patients in Brazil: predominance of non-albicans species. *Mycopathologia*, **141**, 65–68 (1998)
55. Pärnänen P., Meurman J.H., Samaranyake L., Virtanen I.: Human oral keratinocyte E-cadherin by *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *J. Oral Pathol. Med.* **39**, 275–278 (2010)
56. Parra-Ortega B., Cruz-Torres H., Villa-Tanaca L., Hernández-Rodríguez C.: Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **104**, 505–512 (2009)
57. Pfaller M.A., Diekema D.J.: Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 133–163 (2007)
58. Pichova I., Pavličková L., Dostal J., Dolejší E.: Secreted aspartyl proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2669–2677 (2001)
59. Ramage G., Saville S.P., Thomas D.P., López-Ribot J.L.: *Candida* Biofilms: an Update. *Eukaryot. Cell*, **4**, 633–638 (2005)
60. Ramage G., VandeWalle K., López-Ribot J.L., Wickes B.L.: The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **214**, 95–100 (2002)
61. Ramsook C.B., Tan C., Garcia M.C., Fung R.: Yeast Cell Adhesion Molecules Have Functional Amyloid-Forming Sequences. *Eukaryot. Cell*, **9**, 393–404 (2010)
62. Rüping M., Vehrechild J.J., Cornely O.A.: Patients at High Risk of Invasive Fungal Infection. *Drugs*, **68**, 1941–1962 (2008)
63. Salvino R.M., Dechicco R.S., Seidner D.L.: Perioperative nutrition support: Who and how. *Cleve. Clin. J. Med.* **71**, 345–351 (2004)
64. Samaranyake Y.H., Dassanayake R.S., Cheung B.P., Jayatilake J.A.: Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *AMPIS*, **114**, 857–866 (2006)
65. Segal E.: *Candida*, still number one—what do we know and where are we going from there. *Mikol. Lek.* **11**, 133–138 (2004)
66. Senevirante C.J., Jin L.J., Samaranyake Y.H., Samaranyake L.P.: Cell Density and Aging as Factors Modulating Antifungal Resistance of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3259–3266 (2008)
67. Shin J.H., Kee S., Shin M.G., Kim S.H.: Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 1244–1248 (2002)
68. Silva S., Henriques M., Oliveira R., Azeredo J.: Characterization of *Candida parapsilosis* infection of an in vitro reconstructed human oral epithelium. *Eur. J. Oral Sci.* **117**, 669–675 (2009)
69. Ślōdkowski M., Cebulski W., Deptała A., Krasnodębski I.W.: Zakażenia grzybicze u chorych żywionych poza- i dojelitowo. *Zakażenia*, **4**, 45–49 (2004)
70. Srikantha T., Tsai L.K., Daniels K., Soll D.R.: *EFG1* Null Mutants of *Candida albicans* Switch but Cannot Express the Complete Phenotype of White-Phase Budding Cells. *J. Bacteriol.* **182**, 1580–1591 (2000)
71. Sudbery P., Gow N., Berman J.: The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **12**, 317–324 (2004)
72. Swindell K., Lattif A.A., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A.: Parenteral Lipid Emulsion Induces Germination of *Candida albicans* and Increases Biofilm Formation on Medical Catheter Surfaces. *J. Infect. Dis.* **200**, 473–480 (2009)
73. Tavanti A., Pardini G., Campa D., Davini P., Lupetti A., Senesi S.: Differential Expression of Secretory Aspartyl Proteinase Genes (*SAP-10*) in Oral *Candida albicans* Isolates with Distinct Karyotypes. *J. Clin. Microb.* **10**, 4726–4734 (2004)

74. Thewes S., Moran G.P., Magee B.B., Shaller M.: Phenotypic screening, transcriptional profiling and comparative genomic analysis of an invasive and non-invasive strain of *Candida albicans*. *BMC Microbiol.* **8**, 187–203 (2008)
75. Trofa D., Gacser A., Nosanchuk J.D.: *Candida parapsilosis* an Emerging Fungal Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 606–625 (2008)
76. Vidotto V., Ponton J., Aoki S., Quindos G.: Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. *Rev. Iberoam. Micol.* **21**, 70–74 (2004)
77. Wang Y.: CDKs and the yeast-hyphal decision *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 644–649 (2009)
78. Weig M., Jänsch L., Groß U., De Koster C.G., Klis F.M.: Systemic identification in silico of covalently bound cell wall proteins and analysis of protein-polysaccharide linkages of the human pathogen *Candida glabrata*. *Microbiology*, **150**, 3129–3144 (2004)
79. Whiteway M., Bachewich C.: Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 529–553 (2007)
80. Yang Y.L.: Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **36**, 223–228 (2003)
81. Zaugg C., Borg-von Zepelin M., Reichard U., Sanglard D., Monod M.: Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. *Infect. Immun.* **69**, 405–412 (2001)
82. Zhao V.M., Griffith D.P., Blumberg H.M., Dave N.J., Battey C.H., McNally T.A., Easley K.A., Galloway J.R., Ziegler T.R.: Characterization of post-hospital infections in adults requiring home parenteral nutrition. *Nutrition*, **29**, 52–59 (2013)
83. Zhu W., Filler S.G.: Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell. Microbiol.* **12**, 273–282 (2010)

Krzysztof Skowron<sup>1\*</sup>, Justyna Bauza-Kaszewska<sup>2</sup>, Agnieszka Kaczmarek<sup>1</sup>,  
Anna Budzyńska<sup>1</sup>, Eugenia Gospodarek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

<sup>2</sup>Katedra Mikrobiologii i Technologii Żywności,  
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy

Wpłynęło w marcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Mikroflora gnojowicy. 3. Możliwości mikrobiologicznej kontaminacji środowiska. 4. Problem antybiotykooporności wśród szczepów z produkcji zwierzęcej. 5. Metody higienizacji gnojowicy na cele rolnicze. 6. Podsumowanie

### Microbiological aspects of slurry management

**Abstract:** The animal manure may be a source of many pathogenic microorganisms, including *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* or *Campylobacter* spp. The agricultural utilization of slurry poses a serious threat related to the transfer of pathogens to the environment. Some of the bacterial strains are antibiotic-resistant and their resistance genes can be transferred horizontally to the soil microflora. In order to avoid the pathogens' transmission into the environment, different methods of slurry disinfection are necessary. Biological treatment seems to be the most common technique of slurry hygienization. Storage, anaerobic digestion, aeration or composting may result in effective reduction of pathogen level and guarantee biosafety of slurry application as soil fertilizer. Physical and chemical methods are not commonly used due to their reduced effectiveness in slurry decontamination and relatively high costs.

1. Introduction. 2. Microflora of slurry 3. The possibility of microbial contamination of the environment. 4. The problem of antibiotic resistance of strains from animal production. 5. Methods of slurry hygienization for agricultural purposes. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** gnojowica, metody higienizacji, mikroflora gnojowicy, przeżywalność drobnoustrojów

**Key words:** slurry, hygienization methods, microflora of slurry, survival of microorganisms

## 1. Wstęp

Gnojowica to mieszanina kału i moczu zwierząt gospodarskich z wodą, wykorzystywana w rolnictwie jako nawóz naturalny pod rośliny uprawne [86, 96]. Zawiera od 8 do 10 % suchej masy, a jej skład chemiczny zależy od wielu czynników – przede wszystkim gatunku zwierząt, od których jest pozyskiwana, ale również ich wieku czy sposobu żywienia. Średnia zawartość azotu w gnojowicy wynosi – 0,2–0,35%, potasu 0,2–0,3%, natomiast fosforu tylko 0,05 – 0,1%. Dostępność składników zawartych w gnojowicy dla roślin jest wyższa niż w przypadku obornika. Duża zawartość azotu rozpuszczalnego w wodzie (około 50%) powoduje, że gnojowica uważana jest za nawóz szybko działający [29, 50].

Rolnicze wykorzystanie płynnych odchodów zwierzęcych do celów nawozowych jest najczęstszą formą ich zagospodarowania. W przypadku niedoboru gruntów, na których możliwe jest rozlewanie gnojowicy, należy ją transportować i stosować na innych, często odległych polach lub użytkach zielonych. Najczęściej jednak w takiej sytuacji rolnicy decydują się na przekraczanie dopuszczalnych dawek nawozowych i rozlewają całą wytworzoną gnojowicę we własnym gospodarstwie, bez względu na jego areał [101]. Jest to sytuacja bardzo niebezpieczna, zarówno z sanitarnego,

jak i ekologicznego punktu widzenia. Gnojowica jest bogata w pierwiastki biogenne, które trafiając do wód powierzchniowych i gruntowych, powodują ich przeżyźnienie i prowadzą do eutrofizacji zbiorników wodnych [99, 101]. Rozlewanie gnojowicy wiąże się także ze znaczną uciążliwością zapachową wynikającą z obecności w niej kwasów organicznych, amoniaku, fenoli, amin i innych związków lotnych [18].

Zagospodarowanie gnojowicy do celów rolniczych jest również limitowane przez szereg przepisów prawnych. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 16 kwietnia 2008 r. w sprawie szczegółowego sposobu stosowania nawozów oraz prowadzenia szkoleń z zakresu ich stosowania (Dz.U. 2008 nr 80 poz. 479) [83] i Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 czerwca 2008 r. w sprawie wykonania niektórych przepisów ustawy o nawozach i nawożeniu (Dz.U. 2008 nr 119 poz. 765) [84] gnojowicę można stosować w okresie od 1 marca do 30 listopada. Wyjątek stanowi nawożenie roślin uprawianych w szklarniach, inspektach i namiotach foliowych. Gnojowicę rozlaną na pola należy wymieszać z glebą najpóźniej następnego dnia po jej zastosowaniu, oprócz jej wykorzystania w lasach i na użytkach zielonych. Gnojowicy nie wolno stosować na terenach położonych bliżej niż 20 m od strefy ochrony źródeł

\* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz; e-mail: krzysztof.skowron@cm.umk.pl

wody, ujęć wody, brzegu zbiorników i cieków wodnych, kąpielisk oraz obszarów morskiego pasa nadbrzeżnego. Nawóz ten można stosować na glebę, gdy poziom wody podziemnej znajduje się poniżej 1,2 m oraz na terenach poza obszarami płytkiego występowania skał szczelinowych [82]. Ustawa o nawozach i nawożeniu [97] zabrania stosowania gnojowicy na glebach zalanych wodą, przykrytych śniegiem, zamrzniętych do głębokości 30 cm, a także podczas opadów deszczu. W myśl Ustawy [97] niedopuszczalne jest nawożenie gnojowicą gleb pozbawionych okrywy roślinnej, położonych na stokach o nachyleniu większym niż 10% oraz stosowanie tego nawozu podczas wegetacji roślin przeznaczonych do bezpośredniej konsumpcji przez ludzi. Przepisy ustalają maksymalną roczną dawkę gnojowicy na poziomie, który gwarantuje wprowadzenie do gleby nie więcej niż 170 kg azotu w czystym składniku na hektar [22, 43, 82, 97]. Według KDPR [43] dawki gnojowicy powinny być ściśle dostosowane do rzeczywistego zapotrzebowania roślin na składniki pokarmowe. Roczna dawka gnojowicy nie powinna przekraczać 45 m<sup>3</sup>/ha. W przypadku gruntów ornych jej wielkość ustala się w oparciu o zawartość azotu w glebie, natomiast na użytkach zielonych pierwiastkiem determinującym jest potas [37, 51, 54, 55].

## 2. Mikroflora gnojowicy

W skład mikroflory gnojowicy wchodzi wirusy, bakterie, grzyby oraz pasożyty.

Wirusy, stanowiące jej składnik o szczególnym znaczeniu epidemiologicznym i epizootycznym, dostają się do gnojowicy przede wszystkim wraz z kałem zwierząt [71, 91]. W gnojowicy bydłowej dominują enterowirusy, parwowirusy, adenowirusy, reowirusy i rinowirusy [91]. Stwierdzenie obecności i przeżywalności wirusów w gnojowicy jest zagadnieniem bardzo złożonym. Enterowirus bydła jest bardzo wrażliwy na temperaturę magazynowania gnojowicy. W próbach tego nawozu przechowywanych w temperaturze 4°C wirus ten przeżywa nawet do 167 tygodni, a jego tygodniowe tempo eliminacji wynosi 0,03 log. Wzrost temperatury, w której składowana jest gnojowica do 20°C powoduje, że czas przeżycia enterowirusa bydła maleje do 8 tygodni, a jego tygodniowe tempo eliminacji wzrasta do wartości 0,65 log [68]. W gnojowicy stwierdza się także wirusy choroby Aujeszky, przeżywające 3–15 tygodni, wirusy choroby Borna – około 22 dni, wirusy choroby Mareka – około 7 dni, wirusy choroby cieszyńskiej – 3–25 dni, wirusy afrykańskiego pomoru świń – 6–160 dni oraz wirusy pryszczycy – 21–103 dni [91].

Bakterie są dominującym składnikiem w zespole organizmów zasiedlających gnojowicę. Obecne są tu zarówno bakterie saprofityczne, jak i chorobotwór-

cze [68]. Ogólna liczba bakterii tlenowych i względnie beztlenowych wynosi 10<sup>9</sup>–10<sup>10</sup> jednostek tworzących kolonie (j.t.k.) w 1 cm<sup>3</sup> gnojowicy [71]. W gnojowicy pochodzącej od zdrowego stada dominuje naturalna mikroflora jelitowa, cechująca się umiarkowaną lub znikomą zjadliwością [76]. W jej skład wchodzi zarówno drobnoustroje typowe dla gnojówki, jak i dla obornika [93]. Drobnoustroje typowe dla gnojówki są reprezentowane przez bakterie mocznikowe, spełniające funkcję amonifikatorów oraz inne bakterie wytwarzające ureazę, takie jak: *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris* czy *Azotobacter* spp. [93]. Obecne są także drobnoustroje mineralizujące kwas benzoowy, fenol i benzen (np. *Brevibacterium helvolum*) oraz rozkładające kwas moczowy (np. *Pseudomonas aeruginosa*) [93]. Dominującą rolę odgrywają jednak drobnoustroje wnoszone do gnojowicy wraz z kałem. Bakteriami najczęściej izolowanymi z gnojowicy są pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz enterokoki [71]. Dominującą rolę ma gatunek *Escherichia coli* występujący w liczbie 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> j.t.k. × cm<sup>-3</sup> oraz pałeczki z rodzaju *Salmonella*, obecne w liczbie 10<sup>2</sup> j.t.k. × cm<sup>-3</sup> [68, 71]. W gnojowicy może występować każdy drobnoustrój, który wraz z odchodami został wydalony z organizmu zwierzęcia. Z tego względu w nawozie tym stwierdza się sporadycznie *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* oraz bakterie z rodzaju *Campylobacter*. Czas przeżycia tych drobnoustrojów w gnojowicy jest zbliżony do ich przeżywalności w wodzie gnojowej i w nieznacznym stopniu zależy od temperatury. Pałeczki *Y. enterocolitica* są izolowane z gnojowicy przez około 10 dni, a bakterie z rodzaju *Campylobacter* przez 3 dni [27].

Gnojowica pochodząca od stad, w których występują zwierzęta chore lub nosiciele jest istotnym źródłem szerzenia się zoonoz i epizootii [91]. Lista bakterii, których pojawienie się w gnojowicy może stanowić poważne zagrożenie dla ludzi i zwierząt w warunkach europejskich, obejmuje: *Brucella* spp., *Chlamydia* spp., *E. coli* (enteropatogenne szczepy odporne na antybiotyki), *Leptospira* spp., *Rickettsia* spp., *Salmonella* spp., *Treponema hyodysenteriae*, *Bacillus anthracis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycobacterium* spp. (m.in. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* complex). Ich obecność i liczba uzależniona jest od czynników środowiskowych, gatunku zwierząt, od których pochodzi gnojowica oraz jej fizyko-chemicznych właściwości i składu [91].

Wśród grzybów zasiedlających gnojowicę dominują drożdżopodobne, natomiast grzyby pleśniowe są mniej liczne i reprezentowane głównie przez rodzaje: *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botryotrichum*. Stosunkowo rzadko w gnojowicy stwierdza się grzyby patogenne [91].

Negatywną rolę odgrywa również obecność w gnojowicy pasożytów w oraz ich jaj i oocyst [71]. Organizmy te są przyczyną rozprzestrzeniania się chorób inwazyjnych [68]. W gnojowicy pochodzącej od bydła



stwierdza się najczęściej znaczną ilość oocyst pierwotniaków z rodzaju *Trichostrongylus*, których larwy charakteryzują się najdłuższą przeżywalnością wśród pasożytów, dochodzącą nawet do 92 dni. Jaja pierwotniaków *Trichostrongylus colubriformis* oraz *Cooperia punctata* przeżywają w gnojowicy magazynowanej w temperaturze 8°C przez 64 dni, natomiast w temperaturze 18°C – 26 dni. Larwy tych pierwotniaków, w zależności od stadium rozwoju, przeżywają w gnojowicy przechowywanej w temperaturze 8°C od 4 do 76 dni, a w temperaturze 18°C od 4 do 37 dni [91]. Dość powszechnie występują w gnojowicy jaja bardzo odpornej na czynniki środowiskowe motylicy wątrobowej (*Fasciola hepatica*). W nawozie tym spotyka się także jaja i larwy robaków z rodzaju *Strongyloides* oraz larwy z rodzaju *Dictyocaulus*, które charakteryzują się wysoką wrażliwością na czynniki środowiskowe. W gnojowicy odnotowuje się również obecność robaków z rodzaju *Dicrocoelium* i *Moniezia*, które w rozwoju osobniczym wymagają żywicieli pośrednich. Bardzo rzadko wykazywana jest niezwykle odporna na niesprzyjające warunki środowiska *Toxocara vitulorum*. W gnojowicy świńskiej występują pierwotniaki z rodzaju *Eimeria* i *Balantidium* oraz robaki z rodzaju *Ascaris* i ich jaja, a także robaki *Oesophagostomum* spp. Jaja glist w gnojowicy składowanej w temperaturze 8°C zachowują inwazyjność przez 75–85 dni, natomiast w temperaturze 18–26°C przeżywają przez około 28 dni. Z kolei dojrzałe człony tasiemca uzbrojonego przeżywają w gnojowicy świńskiej w temperaturze 8°C przez 76 dni [54, 55, 91].

Spśród stawonogów w gnojowicy bydłowej występują przedstawiciele rodzajów: *Psoroptes*, *Chorioptes* i *Sarcoptes* [91]. Znaczącą rolę odgrywają także pierwotniaki z rodzaju *Giardia* oraz *Cryptosporidium*, wykazujące częściową odporność na procesy higienizacji gnojowicy [68].

### 3. Możliwość mikrobiologicznej kontaminacji środowiska

Ogromne ilości odchodów produkowane przez zwierzęta gospodarskie, po wprowadzeniu do gleby stwarzają potencjalne ryzyko szerzenia się licznych chorób wirusowych, bakteryjnych i pasożytniczych [14]. Obligatoryjne i fakultatywne patogeny obecne w gnojowicy mogą rozprzestrzeniać się w środowisku glebowym i wodnym [68, 91] oraz przez długi czas zachowywać zakaźność [92]. Spośród znanych bakterii patogennych, aż 39,4% stanowią drobnoustroje zdolne do przenoszenia się zarówno pomiędzy zwierzętami, jak i ze zwierząt na ludzi [17]. Patogeny te znacznie częściej rozprzestrzeniają się drogami pośrednimi (np. wraz z gnojowicą) niż na skutek bezpośredniego kontaktu. Nawozowe wykorzystanie niehigienizowanej

gnojowicy jest głównym źródłem szerzenia się zakażeń na fermach i przenikania patogenów do łańcucha pokarmowego ludzi, szczególnie w przypadku, gdy na nawożonych gruntach uprawiane są rośliny przeznaczone do bezpośredniej konsumpcji lub na pastwiskach bezpośrednio przed wypasem [27, 38].

Zagrożenie stwarza również wykorzystanie do nawadniania upraw wody, do której trafiły patogeny z gnojowicy [27]. Skażeniu ulegają najczęściej warzywa korzeniowe lub te, których części jadalne mają kontakt z glebą, np. sałata. Znane są przypadki zachorowań po spożyciu sałaty kontaminowanej pałeczkami *E. coli* O157:H7 [65]. Ryzyko takie dotyczy także owoców, które spadają na ziemię, a następnie są zbierane i spożywane lub przetwarzane bez obróbki cieplnej [8]. Rolnicze zagospodarowanie gnojowicy zawierającej patogeny, stwarza nie tylko ryzyko zachorowań wśród ludzi, ale może też prowadzić do wymiernych strat ekonomicznych na skutek chorób i upadków inwentarza [5].

### 4. Problem antybiotykooporności wśród szczepów pochodzących z produkcji zwierzęcej

Ryzyko związane z nawozowym wykorzystaniem nieodpowiednio przetworzonej gnojowicy dotyczy nie tylko skażenia środowiska przez drobnoustroje chorobotwórcze. Istotnym zagrożeniem jest również wprowadzenie do tego środowiska antybiotyków i ich metabolitów oraz drobnoustrojów antybiotykoodpornych, których obecność w gnojowicy jest wysoce prawdopodobna.

Antybiotyki stosowane są w hodowli zwierząt na bardzo szeroką skalę. Dla celów terapeutycznych, powinny być one aplikowane wyłącznie tym osobnikom, u których potwierdzono wystąpienie zakażenia. Ogólnie przyjętą praktyką jest jednak podawanie antybiotyku całemu stadu (cel metafilaktyczny). W wyjątkowych sytuacjach (szczepienia, odsadzanie młodych, mieszanie osobników z różnych stad) profilaktycznie otrzymują go zwierzęta, u których nie stwierdzono zakażenia, ale wobec których istnieje podwyższone ryzyko jego wystąpienia [9, 99, 102]. Używanie antybiotyków jako stymulatorów wzrostu (ASW – antybiotykowe stymulatory wzrostu) w krajach Unii Europejskiej jest od kilku lat zakazane.

Sprzedaż przeciwbakteryjnych produktów leczniczych weterynaryjnych w 2012 roku w Polsce wyniosła 519 ton, z czego 211 ton stanowiły tetracykliny, 130 ton penicyliny a 50 ton sulfonamidy. Łącznie, produkty z tych trzech grup stanowiły 76% całkowitej sprzedaży [62].

Ilość substancji przeciwbakteryjnych dodawanych do paszy zależna jest od gatunku zwierzęcia, sposobu prowadzenia chowu oraz rodzaju antybiotyku

i wynosi od 3 do 220 g · Mg<sup>-1</sup> paszy [99]. Wśród zwierząt gospodarskich najwięcej podaje się ich świniom, ze względu na duże zagęszczenie zwierząt na jednostce powierzchni. W rezultacie, w odchodach świńskich znajduje się też najwięcej antybiotyków i ich pozostałości [10]. Ponieważ stopień przyswajania i wchłaniania substancji przeciwbakteryjnych w jelitach zwierząt jest relatywnie niski, większość z tych substancji, jak również ich bioaktywne metabolity, wydalana jest w ciągu kilkudziesięciu godzin od momentu aplikacji. Szacuje się, że do środowiska wraz z odchodami może trafiać nawet 90% podanej dawki antybiotyku [32, 42, 56, 79].

Dowiedziano, że niektóre antybiotyki zawarte w gnojowicy mogą wpływać hamująco na efektywność procesów jej higienizacji, np. fermentacji metanowej. Karbadoks, kwas lasalowy i monensin hamują bioaktywność bakterii metanogennych i produkcję biogazu, w przeciwieństwie do, np. awoparcyny, tylosyny i erytromycyny [52]. W badaniach Panseri i wsp. [73] wydajność produkcji biogazu pod wpływem niektórych antybiotyków (danofloksacyna, linkomycyna/spektomycyna) obniżała się nawet o 25%. Ci sami autorzy podają, że fermentacja metanowa powodowała spadek ilości antybiotyków w gnojowicy w stopniu wyższym niż podanie jej działaniu wysokiej temperatury. Inaktywację niektórych antybiotyków notowano również w trakcie kompostowania odchodów zwierzęcych oraz w procesie fotodegradacji będącej skutkiem promieniowania słonecznego lub UV [42, 95, 107].

Największą grupę antybiotyków weterynaryjnych stanowią tetracykliny, sulfonamidy i makrolidy [42]. Wysoki, w przypadku izolatów wyisobnionych od zwierząt, odsetek szczepów opornych na tetracykliny jest modelowym przykładem potwierdzającym bezpośredni związek między podawaniem zwierzętom substancji przeciwbakteryjnych a wykształceniem mechanizmów oporności u bakterii. O ile w latach 40. XX wieku ludzkie i odzwierzęce izolaty *Salmonella* Typhimurium były wrażliwe na działanie tetracykliny, aktualnie ich oporność na te antybiotyki kształtuje się na poziomie 90–100%. Dotyczy to również innych gatunków i rodzajów bakterii, głównie pochodzenia jelitowego [9, 45, 101]. Stosowanie awoparcyny, podawanej zwierzętom w krajach Unii Europejskiej jako ASW, przyczyniło się do wzrostu liczebności wankomycynoopornych enterokoków (VRE – Vancomycin-Resistant *Enterococcus*) izolowanych od ludzi i zwierząt. Zjawisko takie nie notowano w USA, gdzie zwierzęta nie otrzymywały awoparcyny [9].

Powszechne używanie antybiotyków w produkcji zwierzęcej jest również jednym z czynników odpowiedzialnych za pojawienie się szczepu LA MRSA (Livestock Associated Methicillin Resistant *S. aureus*), izolowanego głównie od świń i cieląt [35], wykazującego oporność na antybiotyki beta-laktamowe oraz na

tetracykliny, makrolidy, linkozamidy, aminoglikozydy, trimetoprim oraz, w niewielkim odsetku, na fluorochinolony [28]. Szczepy LA MRSA, należące głównie do kompleksu klonalnego CC398, stwarzają duże zagrożenie dla hodowców zwierząt, osób mających z nimi bezpośredni kontakt oraz członków ich rodzin. Wykazano niższą liczbę tych gronkowców u pracowników gospodarstw, których kontakt ze zwierzętami został czasowo ograniczony [28]. Badania potwierdzają częstą obecność LA MRSA również w kurzu zanieczyszczającym powietrze na terenie ferm hodowlanych, w którym przeżyć mogą wiele miesięcy [24]. Dotychczas przypadki nosicielstwa szczepów z kompleksu CC398 były znacznie częstsze niż liczba powodowanych przez nie zakażeń. Nie można jednak lekceważyć informacji o zapaleniu wsierdza, zapaleniu płuc oraz podwyższonym ryzyku zakażenia ran, których drobnoustrój ten był potwierdzoną przyczyną [46, 98].

Pojawienie się szczepów antybiotykoopornych zachodzi na drodze selekcji naturalnej eliminującej ze środowiska drobnoustroje nie wykazujące cech oporności i jest efektem powtarzalnego kontaktu bakterii z antybiotykami oraz możliwością nabywania przez nie genów oporności [99]. Zjawisko to dotyczy najczęściej bakterii enteropatogennych, przede wszystkim pałeczek *Salmonella* spp., *E. coli* i *Campylobacter* spp. W związku z tym, że geny kodujące antybiotykooporność zlokalizowane są najczęściej w obrębie ruchomych elementów genetycznych, oporność nabywana i przekazywana jest na drodze horyzontalnego transferu tych genów poprzez transpozony, plazmidy i integrony [9, 80]. Plazmidy zawierające geny warunkujące oporność na antybiotyki mogą być przenoszone za pośrednictwem środowiska płynnego (woda, gnojowica) lub przy udziale bakteriofagów [6]. Oprócz wyżej wymienionych szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę, z odchodów zwierzęcych izoluje się bakterie także z innymi mechanizmami oporności. Przykładem mogą być szczepy wytwarzające beta-laktamazy o rozszerzonym zakresie substratowym (ESBL – Extended Spectrum Beta-Lactamase), hydrolizujące penicyliny, cefalosporyny oraz monobaktamy. Ich obecność wykryto u *Salmonella* Enterica, *E. coli* oraz *Klebsiella pneumoniae* izolowanych z kału świń, bydła i koni [86, 103]. Obecnie jednym z najistotniejszych problemów w zakresie antybiotykooporności jest pojawienie się Gram-ujemnych pałeczek jelitowych wykazujących oporność także wobec karbapenemów [16, 23].

Niepokojące są wyniki badań potwierdzające wysoką częstotliwość pojawiania się w odchodach zwierząt szczepów charakteryzujących się opornością na dwa lub więcej antybiotyków [35, 100]. W jednym z doświadczeń odsetek szczepów *Salmonella* spp. wyizolowanych z gnojowicy świńskiej wykazujących oporność na dwa antybiotyki wyniósł około 58%, prawie 35% było

opornych na trzy, a niespełna 8% na cztery leki [101]. Wyniki kolejnych badań dowiodły, że oporność w stosunku do czterech lub więcej antybiotyków stwierdzona u 13,4% pałeczek *E. coli*, 19,6% *Enterococcus faecalis* i 25,3% *Enterococcus faecium* izolowanych ze świńskich odchodów [34].

Wprowadzenie do środowiska glebowego wraz z gnojowicą bakterii opornych na antybiotyki powodować może czasowy wzrost ich liczebności i, co ważniejsze, przyczynić się może do przekazania tej cechy bakteriom glebowym, takim jak: *Proteus* spp. i *Pseudomonas* spp. [4, 66, 102]. Zwiększa się również prawdopodobieństwo pojawienia się szczepów antybiotykoopornych w zlokalizowanych w pobliżu ferm hodowlanych środowiskach wodnych, jak też u dzikich zwierząt (myszy, nornice, ryjówki) żyjących na ich terenie [45].

Prawdopodobieństwo pojawienia się bakterii opornych na antybiotyki pochodzenia zwierzęcego u ludzi dotyczy przede wszystkim osób mających bezpośredni kontakt ze zwierzętami, ich otoczeniem lub odchodami. Jednak wprowadzanie do gleby nawozów zawierających lekooporne drobnoustroje stwarza dodatkowe ryzyko ich rozprzestrzeniania się na osoby nie mające kontaktu ze zwierzętami wraz z cząstkami kurzu lub przez żywność uprawianą na nawożonych polach [32].

Ograniczeniu zjawiska antybiotykooporności bakterii w produkcji zwierzęcej służyć ma przede wszystkim wprowadzanie ograniczeń w ilościach stosowanych leków, przy równoczesnej optymalizacji metod hodowli w warunkach intensywnej produkcji zwierząt. Ponadto, podejmowane są próby wprowadzania do pasz probiotyków, jako alternatywy dla zakazanych oficjalnie ASW [10].

## 5. Metody higienizacji gnojowicy na cele rolnicze

Świadomość zagrożeń związanych z wprowadzeniem do gleby wraz z gnojowicą zasiedlających ją drobnoustrojów patogennych i możliwością ich dalszego rozprzestrzeniania drogą wodną, powietrzną lub pokarmową obliuguje do wcześniejszego poddania tego nawozu zabiegom ograniczającym obecność w nim drobnoustrojów, zwłaszcza tych potencjalnie szkodliwych.

Ocena wpływu wybranej metody higienizacji gnojowicy na przeżywalność zasiedlających ją patogenów jest podstawowym kryterium pozwalającym na wiarygodne oszacowanie stopnia jej skuteczności.

Przeżywalność badanych drobnoustrojów w gnojowicy uzależniona jest od szeregu czynników, często silnie ze sobą powiązanych. Do najważniejszych z nich należą [11]:

- temperatura,
- gatunek zwierząt, od których pochodzi gnojowica (typ gnojowicy),

- zawartość suchej masy i suchej masy organicznej,
- odczyn,
- obecność antagonistycznej mikroflory naturalnej,
- wyjściowa liczebność badanych drobnoustrojów,
- właściwości danego serotypu i szczepu,
- zasobność gnojowicy w składniki odżywcze,
- rozpuszczone substancje gazowe oraz potencjał REDOX.

Jednoznaczną interpretację wyników dotyczących czasów przeżycia patogenów w odchodach zwierzęcych utrudnia fakt, że skład ekskrementów jest bardzo zróżnicowany [74]. Ponadto, istnieją wyraźne różnice przeżywalności środowiskowych szczepów bakterii patogennych w warunkach polowych oraz analogicznych szczepów hodowlanych wykorzystywanych do badań laboratoryjnych [47]. Poważne utrudnienie dla uzyskania jednoznacznych i porównywalnych wyników stanowi także zdolność niektórych drobnoustrojów do sporulacji, przejścia w stan „żywe, lecz nie dające się hodować” (viable but nonculturable, VBNC) oraz do wzajemnej agregacji lub przylegania do cząstek stałych, co ogranicza możliwość ustalenia rzeczywistej liczby patogenów metodami hodowlanymi [99].

Uzyskane w różnych badaniach różnice dotyczące czasu przeżycia patogenów w gnojowicy mogą wynikać także z sezonu poboru prób, z odmiennych fizyko-chemicznych właściwości gnojowicy oraz z innych sposobów żywienia poszczególnych stad zwierząt. Nie bez znaczenia pozostaje też zróżnicowany wiekowo i gatunkowo skład inwentarza oraz wykorzystanie do badań różnych szczepów bakterii testowych. Nawet działania mające na celu ujednoczenie parametrów fizycznych próbek gnojowicy nie zapewniają możliwości dokonywania bezpośrednich porównań [36, 64, 74].

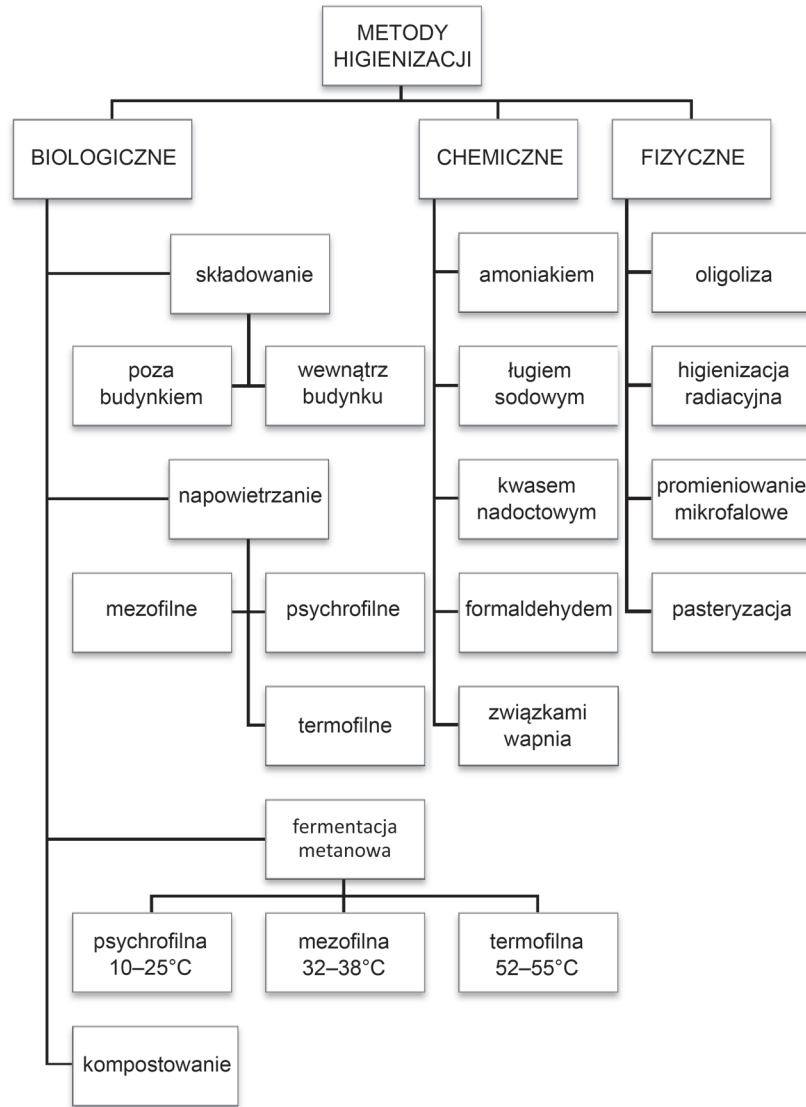
Metody stosowane w celu higienizacji gnojowicy można podzielić na fizyczne, chemiczne i biologiczne (Rys. 1).

### 5.1. Metody biologiczne higienizacji

#### Składowanie

Składowanie gnojowicy jest najprostszą oraz najtańszą metodą obróbki tego nawozu. Z tego względu cieszy się bardzo dużą popularnością i stosowane jest znacznie częściej niż inne metody uzdatniania gnojowicy na cele rolnicze. Głównymi czynnikami ograniczającymi skuteczność tej metody są temperatura oraz czas składowania.

Właściwości fizyko-chemiczne gnojowicy powodują, że w trakcie składowania nie ulega ona samoza-grzaniu, i charakteryzuje się stabilną temperaturą, która wynosi ok. 6°C zimą i 18°C latem. Brak zdolności gnojowicy do generowania ilości ciepła niezbędnej do biotermicznego samoodkażania wyraźnie ogranicza intensywność higienizacyjną procesu składowania [68, 80].



Rys. 1. Metody higienizacji gnojowicy

Składowanie jest metodą obróbki gnojowicy, w czasie której nie są podejmowane żadne aktywne metody stabilizacji tego nawozu, z wyjątkiem stosowanego niekiedy mieszania płynnych odchodów. Metoda ta wykorzystuje brak zdolności większości bakterii patogennych i pasożytów do namnażania się poza organizmem gospodarza [14]. Ponadto, drobnoustroje podlegają naturalnej stopniowej eliminacji w czasie składowania. Przeżywalność ich podczas tego procesu jest dość zróżnicowana i może być liczona w tygodniach lub miesiącach [14]. Eliminacja bakterii fekalnych podczas składowania zachodzi szybciej w porównaniu do pozostałych drobnoustrojów wchodzących w skład mikroflory gnojowicy, jednak czas przeżycia większości bakterii patogennych może wynosić nawet 20 tygodni [54]. Inaktywacja drobnoustrojów w czasie składowania jest możliwa pod warunkiem, że w czasie procesu nie są wprowadzane nowe porcje gnojowicy, stanowiące źródło składników odżywczych oraz kolejnych drobnoustrojów.

W metodzie składowania drobnoustroje najdłużej przeżywają w niskiej temperaturze. Jej wzrost, wiążący się z uwalnianiem większych ilości amoniaku w gnojowicy, skraca czas przeżycia drobnoustrojów [33]. Olszewska i Skowron [70] wykazali, że przeżywalność pałeczek z rodzaju *Salmonella* uzależniona jest zarówno od temperatury składowania, jak i od typu gnojowicy oraz serotypu bakterii. W przypadku *S. Typhimurium* wahała się od 30,27 do 101,10 dnia, a dla *S. Senftenberg* wynosiła od 32,50 do 114,24 dnia. Dane z piśmiennictwa wskazują także na wpływ temperatury składowania gnojowicy na przeżywalność pałeczek *E. coli* (10°C/30 dni, 4°C/40 dni) i enterokoków [47, 69]. *Brucella abortus* w gnojowicy bydłowej składowanej w temperaturze 10°C przeżywa przez okres 47–70 dni, podczas gdy w temperaturze 20°C w tej samej gnojowicy jej przeżywalność skraca się do 20 dni [14, 44].

Podczas pierwszych 2–4 tygodni składowania gnojowicy dochodzi do powstawania lotnych kwasów

tłuszczowych, co prowadzi do przejściowego obniżenia się pH tego nawozu [46]. Przemiany te powodują, że większość patogenów obecnych w gnojowicy ulega w 90% eliminacji w wyżej wymienionym przedziale czasowym [44]. Potwierdzają to badania Kearney i wsp. [40], którzy wykazali, że czas potrzebny do 90% redukcji *Y. enterocolitica* w gnojowicy składowanej w temperaturze 4°C wynosi 20,8 dnia, a w 17°C skraca się do 12,8 dnia.

Wielu autorów [14, 36, 91, 92] wykazało wpływ na przeżywalność bakterii również gatunku zwierząt, od których pochodzi gnojowica. Według nich, pałeczki z rodzaju *Salmonella* mogą przeżywać w składowanych odchodach świńskich ponad 110 dni [36], a w bydłęcych nawet 286 dni [92]. Udział suchej masy w składowanej gnojowicy również wyraźnie wpływa na przeżywalność wybranych bakterii wskaźnikowych. Przeważająca większość wyników wskazuje na dłuższy czas przeżycia drobnoustrojów w odchodach zwierzęcych wraz ze wzrostem zawartości suchej masy [60, 89]. Wyższy udział substancji stałych prawdopodobnie wpływa ochronnie na patogeny, poprzez umożliwienie ich agregacji lub adsorpcji na powierzchni cząstek stałych zawartych w gnojowicy [39].

Pomimo problemów z rozwarstwianiem się gnojowicy, emisją gazów w trakcie jej magazynowania oraz dość długim czasem przeżycia drobnoustrojów, składowanie stanowi skuteczną metodę pozyskiwania nawozu o zmniejszonej uciążliwości zapachowej i znikomym negatywnym wpływie na środowisko.

### Fermentacja metanowa

Skład gnojowicy, zapewniający obecność wszystkich substancji niezbędnych dla rozwoju drobnoustrojów, przyczynia się, z jednej strony, do podwyższenia ryzyka sanitarnego, z drugiej pozwala na wykorzystanie jej w kontrolowanym procesie biodegradacji w czasie fermentacji metanowej.

Proces fermentacji metanowej opiera się na współdziałaniu licznych grup drobnoustrojów. Pierwszą grupę stanowią bakterie hydrolizujące, uczestniczące w procesie hydrolizy i powodujące rozkład polimerycznych związków organicznych (białka, tłuszcze i węglowodany) do substancji prostszych (aminokwasy, peptydy i cukry proste). Do drugiej grupy należą bakterie hydrolizujące acidogenne, które uczestniczą w kwasogenezie i powodują hydrolityczny rozkład aminokwasów, peptydów i cukrów prostych do kwasów tłuszczowych, kwasów organicznych, alkoholi, aldehydów i ketonów [1]. Zaliczamy tuaj głównie drobnoustroje z rodzajów: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* i *Enterobacterium* [19]. Trzecią grupą są bakterie octanogenne wytwarzające octany z wykorzystaniem węgla i energii z produktów kwasogenezy (syntrofy bakterii metanogennych) lub

z CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub> (bakterie homoocetanogenne) [1]. Należą tu m.in. rodzaje: *Syntrophomonas* i *Syntrophobacter* [19]. Czwartą grupę stanowią metanogenne *Archaeobacterie* wiążące CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub> z wytworzeniem CH<sub>4</sub> i H<sub>2</sub>O lub rozkładające octany do CH<sub>4</sub> i CO<sub>2</sub> [1]. Do tej grupy zaliczamy rodzaje: *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium* i *Methanothrix* [104].

Fermentacja metanowa gnojowicy może być prowadzona w warunkach mezofilnych lub termofilnych oraz sporadycznie w psychofilnych [14].

Na przeżywalność bakterii w czasie fermentacji wpływa szereg czynników, do których należą: czas hydraulicznej retencji, koncentracja lotnych kwasów tłuszczowych, pH, temperatura oraz typ gnojowicy, zawartość suchej masy i typ procesu fermentacji [40].

Fermentacja metanowa prowadzona w warunkach mezofilnych jest najczęściej stosowanym typem procesu anaerobowego. Charakteryzuje się on dużą stabilnością warunków i niższymi nakładami energetycznymi [14]. W naturalnej mikroflorze gnojowicy większość bakterii beztlenowych i względnie beztlenowych stanowią mezofile rozwijające się optymalnie w temperaturze 30–40°C [53]. Proces mezofilny jest jednak mniej efektywny i wymaga dłuższego czasu retencji gnojowicy w reaktorze. Eliminacja drobnoustrojów patogennych obecnych w gnojowicy zachodzi znacznie wolniej i mniej wydajnie w warunkach mezofilnych [14]. W celach higienizacyjnych zaleca się poprzedzać właściwą fermentację metanową w warunkach mezofilnych procesem pasteryzacji prowadzonym w temperaturze 70°C przez 20 minut [87].

Proces termofilny jest najbardziej wydajnym typem fermentacji metanowej. Wszystkie reakcje składające się na proces produkcji metanu z gnojowicy zachodzą znacznie szybciej i efektywniej, przez co możliwe jest stosowanie reaktorów o mniejszej objętości [31]. Proces termofilny wymaga jednak znacznie większych nakładów energetycznych. Problem stanowi także fakt, że mikroflora termofilna jest stosunkowo nieliczna w gnojowicy i musi namnożyć się do odpowiedniego poziomu, aby fermentacja mogła przebiegać prawidłowo. W związku z tym niezbędne jest zapewnienie warunków termofilnych już przy rozruchu reaktora [1, 2]. Fermentacja prowadzona w warunkach termofilnych przyczynia się do praktycznie całkowitej eliminacji patogenów z gnojowicy, dzięki czemu otrzymywany nawóz jest znacznie bardziej bezpieczny pod względem sanitarno-higienicznym [58].

Inaktywacja wirusów w trakcie fermentacji metanowej również uzależniona jest w znacznym stopniu od parametrów termicznych procesu. Prowadzona w przedziale temperatury 50–55°C powoduje utratę zakaźności wirusa pryszczycy (FMDV – Foot-and-Mouth Disease Virus) w ciągu godziny. Obniżenie

temperatury do 35°C przedłuża ten okres do 24 godzin. Szczególnie wysoką oporność wykazał się parwowirus świń (PPV – Porcine Parvovirus), którego inaktywacja w temperaturze 55°C trwała ponad tydzień [12]. Enterowirus bydłocy wprowadzony do gnojowicy poddanej fermentacji metanowej w 55°C eliminowany jest już po 30 minutach, podczas gdy w warunkach mezofilnych przeżywał 13 dni [96].

Tappouni [92] stwierdził, że wzrost stężenia lotnych kwasów tłuszczowych w gnojowicy powoduje spadek odczynu i przyczynia się do redukcji liczby bakterii w tym nawozie. Rozwój znacznej populacji bakterii metanowych posiadających zdolność do produkcji antybiotyków w gnojowicy poddanej fermentacji również powoduje wyraźne skrócenie czasu przeżycia patogenów [44].

Badania Kumara i wsp. [49] wykazały z kolei, że przeżywalność *Salmonella* Typhi w procesie fermentacji psychrofilnej była zależna od zawartości suchej masy w gnojowicy. W nawozie zawierającym 5–10% suchej masy bakterie te przeżywały w temperaturze pokojowej przez 20 dni, podczas gdy, w tych samych warunkach termicznych, przy udziale suchej masy równym 15%, przeżywalność wzrastała do 25 dni [49].

Liczne badania potwierdzają także wpływ typu procesu fermentacji na przeżywalność wybranych drobnoustrojów. Badania Kearney i wsp. [39] dowodzą różnic w przeżywalności bakterii patogennych w procesie mezofilnej fermentacji metanowej w zależności od sposobu jej realizacji. Czas dziesiątej eliminacji pałeczek *S. Typhimurium* wyniósł 0,9 dnia w systemie zamkniętym oraz 1,1 dnia w systemie półciąglym [39]. Z kolei w trakcie ciągłej fermentacji mezofilnej czas ten obejmował okres 2–4 dni [67]. Inne doświadczenia wykazały spadek liczby wyżej wymienionych bakterii w gnojowicy do poziomu  $10^3$  j.t.k./ml w ciągu 60 dni składowania oraz 8 i 10 dni mezofilnej fermentacji prowadzonej odpowiednio w systemie zamkniętym i półciąglym [39]. Szybsze tempo eliminacji bakterii patogennych w systemie zamkniętym może wynikać z niedoboru substancji odżywczych, spowodowanego brakiem dostaw świeżej gnojowicy do reaktora oraz wyższej koncentracji lotnych kwasów tłuszczowych, związanej z nieodprowadzaniem porcji przefermentowanej gnojowicy w trakcie procesu [94]. W przypadku pałeczek *E. coli* Kearney i wsp. [39] wykazali, że czas dziesiątej eliminacji był równy 0,8 dnia w systemie zamkniętym oraz 1,5 dnia w półciąglym. Z kolei podczas ciągłej fermentacji mezofilnej czas ten wynosił 1–2 dni [67].

### Napowietrzanie

Proces napowietrzania polega na wprowadzaniu do gnojowicy drobnych pęcherzyków powietrza w celu przyspieszenia procesu jej stabilizacji poprzez mikro-

biologiczne utlenianie zawartych w tym nawozie substancji organicznych [14]. Wprowadzony tlen pozostaje w formie wolnej lub rozpuszcza się w gnojowicy i zostaje wykorzystany przez drobnoustroje tlenowe prowadzące reakcje rozkładu materii organicznej. Tlenowa stabilizacja gnojowicy stosowana jest w celu zmniejszenia jej uciążliwości zapachowej, mineralizacji i higienizacji tego nawozu, co umożliwia jego bezpieczne składowanie i zagospodarowanie [14].

Mineralizacja związków organicznych zawartych w gnojowicy, zachodząca podczas napowietrzania, pozwala uzyskać stabilny nawóz naturalny. Występujące w gnojowicy w formie mineralnej związki odżywcze są łatwiej przyswajalne dla roślin, dzięki czemu obciąża ona w mniejszym stopniu środowisko glebowe i wodne [81].

Proces napowietrzania gnojowicy może być realizowany w systemie ciągłym, półciąglym i zamkniętym. Sposób ciągły charakteryzuje się nieprzerwanym napływem gnojowicy do reaktora. Gwarantuje on utrzymanie stałych warunków procesu, dzięki czemu wszystkie przemiany biologiczne są na względnie stałym poziomie [44, 63]. System zamknięty polega na napowietrzaniu jednorazowo napełnionego reaktora, który po zakończeniu procesu jest całkowicie opróżniany. Ten typ napowietrzania charakteryzuje się znaczną fluktuacją warunków, rozwarstwieniem gnojowicy oraz zróżnicowanym zapotrzebowaniem na tlen [44, 63].

Gnojowica może być napowietrzana naturalnie w lagunach powierzchniowo, ciśnieniowo lub podciśnieniowo. W zależności od sposobu napowietrzania, powietrze wprowadzane może być za pomocą aeratorów mechanicznych (mieszadła rozbryzgowo, rotory szybkoobrotowe) lub urządzeń wtlaczających sprężone powietrze w formie drobnych pęcherzyków [44, 63].

Procesy mikrobiologiczne, zachodzące podczas napowietrzania prowadzą do utleniania związków węgla z wytworzeniem energii. Jej część wykorzystywana jest w procesie namnażania bakterii, natomiast około 45–50% jest wydzielane w postaci ciepła [44]. W wyniku metabolizmu związków organicznych, prowadzonego przez drobnoustroje tlenowe, zostają wyprodukowane nawet około 4 kWh energii cieplnej z każdego kilograma tlenu wprowadzanego do gnojowicy. Może to prowadzić do samozagrzewania się tego nawozu do temperatury w granicach 55–70°C, umożliwiającej rozwój drobnoustrojów termofilnych [26, 44]. Mniej podatna na zagrzewanie w czasie napowietrzania jest gnojowica bydłoca, co wiąże się z mniejszą zawartością substancji odżywczych dla bakterii termofilnych [44].

Duża różnorodność związków organicznych zawartych w gnojowicy wymaga obecności, na poszczególnych etapach procesu, zróżnicowanej gatunkowo populacji bakterii zdolnych do ich rozkładu [44].

Stabilizacja tlenowa może być realizowana w różnych zakresach temperatury jako napowietrzanie [44, 63]:

- zimne (psychrofilne) przebiegające w temperaturze do 20°C i charakteryzujące się nieznacznym ubytkiem węgla oraz brakiem procesu nityfikacji,
- ciepłe (mezofilne) prowadzone w temperaturze 20–40°C i przyczyniające się do wyraźnej redukcji liczby drobnoustrojów patogennych w gnojowicy [14],
- gorące (termofilne) przebiegające w temperaturze 55–70°C, która osiągana jest na drodze reakcji egzotermicznych bez zewnętrznego źródła ciepła; reakcje te prowadzone są przez tlenowe termofilne drobnoustroje, których rozwój stymuluje intensywne napowietrzanie drobnopęcherzykowe; wchodzi one w skład naturalnej mikroflory gnojowicy, a ich intensywne namnażanie następuje w momencie osiągnięcia temperatury termofilnej.

Skuteczność higienizacyjna procesu napowietrzania zależy w znacznym stopniu od aktywności mikroflory tlenowej obecnej w gnojowicy [20]. Pod względem skuteczności higienizacji najważniejsza jest termofilna stabilizacja tlenowa. W gnojowicy poddanej napowietrzaniu gorącemu Martens i wsp. [58] po upływie kilku godzin nie izolowali pałeczek *Salmonella* spp. i enterowirusów, a po około jednym dniu – enterokoków i parwowirusów. Mniej efektywną eliminację patogenów z gnojowicy powoduje proces napowietrzania ciepłego. W czasie 3–4 tygodni prowadzenia takiej stabilizacji następuje 90,0–99,9% redukcja drobnoustrojów takich, jak *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* i bakterii grupy *coli* [30]. Odsetek inwazyjnych jaj *Ascaris suum* w trakcie napowietrzania mezofilnego obniżył się do 37%, podczas gdy w procesie termofilnym zredukował się do 0% [78]. Skuteczność higienizacyjna procesu napowietrzania wynika z działania wysokiej temperatury, obecności w gnojowicy wolnego tlenu i amoniaku, niskiej zawartości substancji odżywczych i aktywacji antagonistycznej mikroflory [13]. Spośród wad procesu należy wymienić koszty energii niezbędnej do napowietrzania, dużą produkcję osadu zawierającego znaczną ilość masy bakteryjnej, ryzyko emisji amoniaku i tlenku azotu oraz potrzebę filtracji powietrza odprowadzonego z reaktora [14, 63].

### Kompostowanie

Skuteczną metodą higienizacji i stabilizacji gnojowicy jest poddanie jej frakcji stałej kompostowaniu. Ponieważ istotą tego procesu jest biologiczny rozkład materii organicznej przeprowadzany przez drobnoustroje tlenowe, kluczowe znaczenie dla jego efektywności ma odpowiednie napowietrzenie materiału. Wśród innych czynników decydujących o jego powodzeniu znaczenie mają także temperatura, wilgotność i stosunek węgla do azotu. Niezbędną porowatość

kompostowanej biomasy zapewnia dodatek substancji strukturalnych, np. słomy, trocin lub torfu [81].

Eliminację zasiedlających gnojowicę patogenów zapewnia wysoka temperatura generowana w termofilnej fazie kompostowania. Wyniki wielu doświadczeń potwierdzają, że jej optymalne wartości, gwarantujące higienizację biomasy, powinny oscylować w granicach 55–65°C [57]. Ich uzyskanie, przy zapewnieniu prawidłowych warunków procesu, zwłaszcza odpowiedniej ilości tlenu, nie jest trudne do osiągnięcia. Dowiedziono, że rodzaj kompostowanych odchodów zwierzęcych ma większy wpływ na wysokość temperatury biomasy, niż dodany do niej materiał strukturalny [59, 81].

Odpowiednio przeprowadzone kompostowanie prowadzi do szybkiej inaktywacji większości drobnoustrojów patogennych. W badaniach Ross i wsp. [81] liczba *E. coli* i enterokoków podczas 60 dni kompostowania ulegała spadkowi rzędu  $10^2$ – $10^3$  log. Podobne wyniki badań uzyskali Mac Carthy i wsp. [59], w których liczebność *E. coli* i enterokoków została ograniczona do wartości obowiązujących norm, podczas gdy liczba bakterii tworzących spory nie uległa zmianie (tab. I).

### 5.2. Metody fizyczne

Metody biologiczne są najczęściej wykorzystywane w celu higienizacji gnojowicy. Istnieje jednak szereg technik, klasyfikowanych jako fizyczne i chemiczne, dla których skuteczność higienizacyjna została również dowiedziona (tab. II).

#### Pasteryzacja

Ze względu na wysokie koszty i konieczność korzystania ze specjalistycznej aparatury, proces pasteryzacji wykorzystywany jest wyłącznie w sytuacji podwyższonego zagrożenia epidemiologicznego. Pasteryzacja jest klasyczną metodą termiczną, wykorzystującą bakteriobójcze działanie wysokiej temperatury na struktury komórkowe drobnoustrojów. Utrzymanie w gnojowicy temperatury 70°C przez godzinę zapewnia inaktywację większości zasiedlających ją wirusów, bakterii i pierwotniaków o umiarkowanej termooporności [57]. Wirus choroby pęcherzykowej świń (SVDV – Swine Vesicular Disease Virus) ulega inaktywacji w 64°C już po 2 minutach, jednak w przypadku niektórych parwowirusów bydłych nieskuteczna okazywała się temperatura nawet 70°C. Wyniki wielu badań dowodzą, że już 30-minutowe działanie temperaturą 70°C zapewnia likwidację pałeczek *Salmonella* spp., enterowirusów, jaj *Ascaris suum* i *Taenia saginata* [96].

#### Higienizacja radiacyjna

Wykorzystanie różnych rodzajów promieniowania pozwala na szybką i bardzo skuteczną inaktywację potencjalnych patogenów zasiedlających odchody

Tabela I  
Wpływ wybranych biologicznych metod higienizacji na przeżywalność drobnoustrojów patogennych w gnojowicy

| Metoda higienizacji           | Mikroorganizm                        | Przeżywalność     | Źródło |
|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------|--------|
| <b>Składowanie</b>            | Aujeszky's Disease Virus (ADV)       | 15 tyg./5°C       | [63]   |
|                               |                                      | 3–15 tyg.         | [91]   |
|                               | Foot and Mouth Disease (FMD)         | 3–15 tyg.         | [91]   |
|                               | <i>E. coli</i> O157:H7               | 15–18 dni/16°C    | [88]   |
|                               | S. Dublin                            | 33 tyg./zima      | [14]   |
|                               |                                      | 19 tyg./lato      |        |
|                               |                                      | 2–9 tyg.          | [91]   |
|                               | S. Typhimurium                       | 4–26 tyg.         | [91]   |
|                               | <i>Salmonella</i> spp.               | 1–30 tyg.         | [14]   |
|                               | <i>Yersinia enterocolitica</i>       | 6 tyg./8°C        |        |
| <i>Cryptosporidium parvum</i> | >90 dni/4°C                          |                   |        |
|                               | 20 dni/20°C                          |                   |        |
| <b>Napowietrzanie</b>         | Aujeszky's Disease Virus (ADV)       | 5 godz./40°C      | [96]   |
|                               |                                      | 10 min./55°C      | [63]   |
|                               | Foot and Mouth Disease (FMD)         | 48 godz./50°C     | [63]   |
|                               | Swine Vesicular Disease Virus (SVDV) | 48 godz./40°C     | [96]   |
|                               |                                      | 2 min./64°C       | [63]   |
|                               | S. Enteritidis                       | 40 godz./42°C     | [63]   |
|                               | S. Typhimurium                       | 48 godz.          |        |
|                               | <i>Ascaris suum</i>                  | 20 min/70°C       | [14]   |
| <i>Taenia saginata</i>        | 5–15 min/60–70°C                     |                   |        |
| <b>Fermentacja metanowa</b>   | Aujeszky's Disease Virus (ADV)       | 1dzień/31°C       | [58]   |
|                               | Bovine enterovirus                   | 30 min./55°C      | [96]   |
|                               | ECBO                                 | 9 dni/31°C        | [58]   |
|                               |                                      | 6 godz./55°C      |        |
|                               | ERV                                  | 9 dni/31°C        |        |
|                               |                                      | 6 godz./55°C      |        |
|                               | parvovirus                           | 30 min./55°C      | [96]   |
|                               | enterokoki                           | 35–40 dni/18–25°C | [58]   |
|                               |                                      | 12 dni/31°C       | [49]   |
|                               |                                      | 15–20 dni/35°C    | [58]   |
|                               |                                      | 27 godz./55°C     | [49]   |
|                               | <i>E. coli</i>                       | 20–25 dni/18–25°C | [49]   |
|                               |                                      | 10–15 dni/35°C    |        |
|                               | S. Senftenberg                       | 8 dni/31°C        | [58]   |
|                               |                                      | 6 godz./55°C      |        |
|                               | S. Typhi                             | 20–25 dni/18–25°C | [49]   |
|                               |                                      | 10–15 dni/35°C    |        |
|                               | <i>Shigella dysenteriae</i>          | 10–15 dni/18–25°C |        |
| 5–10 dni/35°C                 |                                      |                   |        |

zwierzęce. Promieniowanie gamma, emitowane, m.in., przez izotopy  $^{60}\text{Co}$  lub  $^{137}\text{Cs}$ , charakteryzuje wysoka zdolność penetracji różnych środowisk, a ich letalny wpływ na drobnoustroje oparty jest głównie na uszkodzeniu materiału genetycznego i hamowaniu podziału komórki [15]. Działanie biobójcze wiązki szybkich

elektronów polega na tym, że elektrony przyspieszane w akceleratorach przenikają w głąb sterylizowanego obiektu zapoczątkowując tysiące aktów jonizacji i wzbudzeń elektronowych atomów oraz cząsteczek. Proces ten przyczynia się do powstania nowych generacji rojów wtórnych szybkich elektronów o działaniu



Tabela II

Wpływ wybranych fizycznych i chemicznych metod higienizacji na przeżywalność drobnoustrojów patogennych w gnojowicy

| Metoda higienizacji                  | Mikroorganizm                             | Parametry procesu                              | Źródło |
|--------------------------------------|---|--|--------|
| <b>Promieniowanie beta lub gamma</b> | SVDV (Swine Vesicular Disease Virus)      | 40 kGy   | [96]   |
|                                      | Poliovirus 1                              | 6,5 kGy  |        |
|                                      | <i>Enterococcus</i> spp.                  | 6,45–8,84 kGy                                  | [90]   |
|                                      | <i>E. coli</i>                            | 5,10–6,06 kGy                                  |        |
|                                      | <i>Salmonella</i> spp.                    | 3,63–5,51 kGy                                  |        |
|                                      | <i>Ascaris suum</i>                       | 4–5,8 kGy                                      |        |
| <b>Promieniowanie mikrofalowe</b>    | HCC (Hepatitis Contagiosa Canis)          | 1 kW/1 s/2450 MHz<br>(efekt cieplny – 63–70°C) | [96]   |
|                                      | ECBO (Enteric Cytopathogen Bovine Orphan) | 1 kW/1 s/2450 MHz<br>(efekt cieplny – 58–62°C) |        |
|                                      | Poliovirus 1                              | 10s/2450 MHz                                   |        |
|                                      | <i>E. coli</i>                            | 60 kW s  | [106]  |
| <b>Wapnowanie</b>                    | Enterowirus bydłocy                       | 1 godz./pH 11,5                                | [96]   |
|                                      | <i>Salmonella</i> spp.                    | 1–3 godz.                                      | [78]   |
|                                      | <i>E. coli</i> O157:H7                    | 2 godz.  | [21]   |
| <b>Ług sodowy (50% r-r. NaOH)</b>    | Wirusy otoczkowe                          | 4 dni – 20 kg/m <sup>3</sup>                   | [57]   |
|                                      | Wirusy bezotoczkowe                       | 4 dni – 30 kg/m <sup>3</sup>                   |        |
|                                      | Formy wegetatywne bakterii                | 4 dni – 30 kg/m <sup>3</sup>                   |        |
| <b>Formalina</b>                     | Wirusy otoczkowe                          | 4 dni – 10 kg/m <sup>3</sup>                   | [57]   |
|                                      | Wirusy bezotoczkowe                       | 4 dni – 15 kg/m <sup>3</sup>                   |        |
|                                      | Formy wegetatywne bakterii                | 4 dni – 15 kg/m <sup>3</sup>                   |        |
|                                      | Prątki                                    | 14 dni – 25 kg/m <sup>3</sup>                  |        |
| <b>Kwas nadoctowy (15%)</b>          | Wirusy otoczkowe                          | 4 dni – 40 kg/m <sup>3</sup>                   | [57]   |
|                                      | Wirusy bezotoczkowe                       | 4 dni – 25 kg/m <sup>3</sup>                   |        |
|                                      | Formy wegetatywne bakterii                | 1 godz. – 25 kg/m <sup>3</sup>                 |        |

letalnym dla komórek, co prowadzi do uszkodzenia kwasów nukleinowych oraz białek i błon komórkowych drobnoustrojów. Uszkodzenia indukowane są w wyniku bezpośredniego oddziaływania wiązki elektronów na mikroorganizm lub pośredniego wpływu produktów radiolizy wody (rodnik hydroksylowy, jony i zjonizowane grupy atomów) [61].

Produkty sterylizowane metodą radiacyjną są całkowicie bezpieczne i nie wykazują radioaktywności. Eliminacja drobnoustrojów uzależniona jest od ich stanu fizjologicznego, koncentracji w środowisku, składu chemicznego obiektu poddawanego sterylizacji oraz obecności wody i innych związków chemicznych [7].

Obecnie higienizacja radiacyjna znajduje zastosowanie głównie do sterylizacji wyrobów medycznych i kosmetycznych. Podejmowane są jednak prace badawcze mające na celu wykorzystanie tej techniki do dezynfekcji wody pitnej, ścieków i odpadów komunalnych [7].

Powyższa metoda higienizacji wymaga niestety dość dużych nakładów inwestycyjnych. Szacuje się, że koszt budowy i uruchomienia akceleratora elektronów generującego wiązkę o następujących parametrach: 2 kGy, 1 MeV, 400 kW wynosi około 4 miliony dolarów. Koszt

eksploatacyjny natomiast kształtują się na poziomie 0,3 dolara za każdy m<sup>3</sup> higienizowanej gnojowicy [48]. Innymi mankamentami opisanej metody są także: konieczność frakcjonowania gnojowicy oraz skomplikowane procedury zapewnienia bezpieczeństwa procesu. Z kolei jej zaletą jest bardzo wysoka skuteczność higienizacyjna.

Wyniki wielu doświadczeń dowiodły, że promieniowanie gamma w dawce 5 kGy powoduje 10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup>-krotny spadek liczby drobnoustrojów w naświetlanej gnojowicy. Wyższą oporność na promieniowanie wykazują wirusy. Do najmniej wrażliwych należy SVDV, do którego inaktywacji wymagana była dawka nawet 40 kGy [14].

Dawka 10 kGy całkowicie eliminuje bakterie i parazyty. W osadach ściekowych o wilgotności powyżej 40% stwierdzano inaktywację *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. i *E. coli* już przy dawce promieniowania gamma o wartości 1 kGy [3].

Badania Skowrona i wsp. [90] wykazały wysoką efektywność wiązki wysokoenergetycznych elektronów w stosunku do pałeczek *Salmonella* spp., *E. coli*, enterokoków oraz jaj pasożytów żołądkowo-jelitowych. W większości przypadków dawka o mocy 7 kGy

wystarczyła do pełnej higienizacji gnojowicy, przy czym satysfakcjonujące efekty uzyskiwano już przy dawce 3 kGy. Z kolei przy dawkach poniżej 1 kGy udawało się osiągnąć nawet 90% redukcję populacji badanych drobnoustrojów.

### 5.3. Metody chemiczne

Higienizacja chemiczna polega na zastosowaniu substancji, które w skuteczny sposób spowodują zniszczenie pasożytów, drobnoustrojów chorobotwórczych oraz ich form przetrwalnych. Skuteczność tych metod zależy od rodzaju drobnoustrojów, stężenia roztworu, a także czasu działania i warunków przeprowadzania całego procesu. Efektywność użytych środków uwarunkowana jest również czynnikami zewnętrznymi, do których zaliczyć można wilgotność, temperaturę, pH i obecność substancji organicznych [14].

Metody chemiczne higienizacji gnojowicy są najczęściej stosowane tylko w sytuacjach zagrożenia dla środowiska lub zdrowia ludzi i zwierząt. Wymagają one dodawania bardzo dużych objętości reagentów i są przeważnie nieopłacalne ekonomicznie.

Związkami najczęściej wykorzystywanymi w procesie dezynfekcji odchodów zwierzęcych jest tlenek i wodorotlenek wapnia. Osiągnięcie efektu higienizacji poprzez wapnowanie nie wymaga dużych nakładów finansowych ani skomplikowanej aparatury. W wyniku tego procesu możliwa jest eliminacja 95–100% zasiedlających odchody patogenów [14]. CaO charakteryzuje się dwukierunkowym działaniem. Powoduje silną reakcję egzotermiczną poprzez hydratację tlenku wapna z wodą, co skutkuje wzrostem temperatury do 55–60°C. Ponadto, wywołuje również gwałtowne podwyższenie odczynu osadu. Alkalinizacja odczynu środowiska, w połączeniu ze wzrostem temperatury, wynikającym z gwałtownej reakcji egzotermicznej związków wapna z wodą, stanowią doskonałą kompilację czynników hamujących rozwój zasiedlających to środowisko drobnoustrojów [31, 104]. Uzyskany w ten sposób produkt może być wykorzystany w rolnictwie do celów nawozowych, co wpływa szczególnie korzystnie na stan gleb kwaśnych [77].

Szereg badań dotyczących wpływu wapnowania na drobnoustroje w różnego typu odpadach wskazuje, że przy zoptymalizowanych parametrach tego procesu, gwarantuje on ich eliminację sięgającą nawet 95–100%. Enterowirusy wprowadzone do gnojowicy poddanej wapnowaniu ulegały inaktywacji w czasie od jednej godziny (enterowirus bydlęcy) do 24 godzin (enterowirus świński typu 3) [41, 96]. Szybką inaktywację *Salmonella* spp. i *E. coli* zapewnia już jednogodzinne działanie związków wapna [14, 72]. Ich dodanie do osadów ściekowych skutkowało niemal całkowitą eli-

minacją pałeczek *E. coli* i wysoką, sięgającą nawet 6 log, redukcją liczebności enterokoków [25].

W procesach higienizacji gnojowicy używa się również innych substancji chemicznych, przy czym z reguły podwyższeniu dawki towarzyszy wzrost skuteczności danego środka. Ług sodowy efektywnie eliminuje, m.in., wirusy pryszczycy, bakterie z rodzaju *Salmonella*, *Clostridium* i *Pasteurella*. Proces eliminacji herpeswirusów z wykorzystaniem kwasu nadoctowego o stężeniu 0,6%, trwa kilka dni. Wyższą wrażliwość na jego działanie wykazywały pałeczki *Salmonella* – przy końcowym stężeniu kwasu 0,5% powodował ich zabicie pałeczek w ciągu jednej godziny. Znacznie lepsze efekty uzyskiwano przy podwyższeniu stężenia do 1%, jednak zabieg taki dyskwalifikował tę metodę z powodów ekonomicznych [14, 96].

### 6. Podsumowanie

Rolnicze wykorzystanie odchodów powstających podczas produkcji zwierzęcej stanowi uzasadniony pod wieloma względami sposób ich zagospodarowania. Bogactwo łatwo przyswajanych składników odżywczych zawartych w gnojowicy i ich wysoka przyswajalność, czynią z niej doskonały nawóz naturalny. Wprowadzenie gnojowicy do gleby wiąże się jednak z problemami natury ekologicznej i higieniczno-sanitarnej. Możliwość pojawienia się w gnojowicy drobnoustrojów patogennych dla ludzi i zwierząt wymaga podjęcia kroków w kierunku realnego zmniejszenia ryzyka wynikającego z potencjalnej kontaminacji za jej pośrednictwem gleby, wody i roślin.

Coraz większego znaczenia nabiera również zjawisko rozprzestrzeniania za pomocą gnojowicy antybiotyków oraz opornych na nie drobnoustrojów. Wprowadzenie do gleby antybiotyków i ich aktywnych metabolitów sprzyjać może selekcji szczepów antybioopornych. Z kolei pojawienie się w tym środowisku drobnoustrojów z już wykształconym mechanizmem lekooporności prowadzi do przekazywania go innym drobnoustrojom na drodze transferu horyzontalnego. Szczególnemu monitorowaniu powinny podlegać coraz częstsze w środowisku ferm hodowlanych szczepy LA MRSA oraz Gram-ujemne pałeczki wytwarzające ESBL.

Biorąc pod uwagę ryzyko towarzyszące rolniczemu wykorzystaniu gnojowicy, wszystkie zabiegi, jakim poddawana jest gnojowica przed jej rolniczym zagospodarowaniem, powinny służyć, poza poprawą jej właściwości fizyko-chemicznych, przede wszystkim ograniczeniu stopnia jej aktywności mikrobiologicznej. Wśród znanych metod higienizacji gnojowicy, najszersze wykorzystanie znajdują metody biologiczne – składowanie, fermentacje metanowa i napowietrza-

nie. Prawidłowe postępowanie z gnojowicą opiera się na wiedzy o obecności i przeżywalności drobnoustrojów patogennych w niej zawartych oraz na poznaniu i zrozumieniu czynników wpływających na ich żywotność i infekcyjność. Przy zachowaniu odpowiednich standardów, ich działanie gwarantuje skuteczną eliminację drobnoustrojów patogennych z gnojowicy i umożliwia jej bezpieczne stosowanie w rolnictwie.

## Piśmiennictwo

- Ahring B.K.: Perspectives for Anaerobic Digestion., *Adv. Biochem. Eng./Biotech.* **81**, 1–30 (2003)
- Ahring B.K., Mladenovska Z., Iranpour R., Westermann P.: State of the art and future perspectives of thermophilic anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* **45**, 293–298 (2002)
- Al-Bachir M., Al-Adawi M.A., Shamma M.: Synergetic effect of gamma irradiation and moisture content on decontamination of sewage sludge. *Bioresour. Technol.* **90**, 139–43 (2003)
- Bager F., Madsen M., Christensen J., Aarestrup F.M.: Avoparacin used as a growth promoter in associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev. Vet. Med.* **31**, 95–112 (1997)
- Baloda S.B., Christensen I., Trajcevska S.: Persistence of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT12 clone in a piggery and in agricultural soil amended with *Salmonella*-contaminated slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2859–2862 (2001)
- Bass L., Lichert C.A., Lee M.D., Summers A.O., White D.G., Thayer S.G., Maurer J.J.: Incidence and characterization of integrons, genetic elements, mediating, multiple drug resistance in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agent. Chem.* **43**, 2925–2929 (1999)
- Bazeli M.: Higieniczna i sanitarna ocena osadów pościekowych uzdatnianych przy użyciu wybranych metod fizycznych i chemicznych. Rozprawa doktorska. Akademia Techniczno-Rolnicza. Bydgoszcz, 2005
- Besser R.E., Lett S.M., Weber J.T., Doyle M.P., Barret T.J., Wells J.G., Griffin P.M.: An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in freshpressed apple cider. *J. Am. Assoc.* **269**, 2217–2220 (1993)
- Biernasiak J., Śliżewska K., Libudzisz Z.: Negatywne skutki stosowania antybiotyków. *Post. Nauk Rol.* **3**, 105–117 (2010)
- Biernasiak J., Śliżewska K., Libudzisz Z.: Probiotyki w żywieniu zwierząt. *Post. Nauk Rol.* **3**, 119–132 (2010)
- Böhm R.: Epidemiological risks related to chicken manure and strategies for the validation of treatment methods under the aspect of hygienic safety. Universität Hohenheim, Stuttgart, 2005
- Botner A., Belsham G.J.: Virus survival in slurry: analysis of the stability of foot-and-mouth disease, classical swine fever, bovine viral diarrhoea and swine influenza viruses. *Vet. Microbiol.* **157**, 41–49 (2012)
- Burton C.H., Sneth R.W., Misselbrook T.H., Pain B.F.: The effect of farms scale aerobic treatment of piggery slurry on odour concentration, intensity and offensiveness. *J. Agric. Eng. Res.* **71**, 203–211 (1998)
- Burton C.H., Turner C.: Manure Management: Treatment Strategies for Sustainable Agriculture. Silsoe Research Institute, Bedford, 2003
- Cadet J., Bellon S., Douki T., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Pouget J.P., Ravanat J.L., Romieu A., Sauvaigo S.: Radiation-induced DNA damage: formation, measurement, and biochemical features. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **23**, 33–43 (2004)
- Carlet J., Jarlier V., Harbarth S., Voss A., Goossens H., Pittet D.: Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, **1**, 11 (2012)
- Cleaveland S., Laurenson M.K., Taylor L.H.: Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and their risk of emergence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **356**, 991–999 (2001)
- Cotta M.A., Whitehead T.R., Zeltwanger R.L.: Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. *Environ. Microbiol.* **9**, 737–745 (2003)
- Czerwińska E., Kalinowska K.: Warunki prowadzenia procesu fermentacji metanowej w biogazowni. *Technika Rolnicza Ogrodnicza Leśna.* **2**, 12–14 (2014)
- Derbyshire J.B., Brown E.G.: The inactivation of viruses in cattle and pig slurry by aeration or treatment with calcium hydroxide. *J. Hyg. Camb.* **82**, 293–299 (1979)
- Duffy G.: Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manures and slurries. *J. Appl. Microbiol.* **94**, Supplement s1, 94–103 (2003)
- Dyrektywa 91/676/EWG z dnia 12 grudnia 1991 r. dotycząca ochrony wód przed zanieczyszczeniami powodowanymi przez azotany pochodzenia rolniczego [Dz.Urz. WE L375 z 31.12.1991]
- van Duijn P.J., Dautzenberg M.J., Oostdijk E.A.: Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs. *Curr. Opin. Crit. Care.* **17**, 658–665 (2011)
- Friesea A., Schulz J., Hoehle L., Fetsch A., Tenhagen B.-A., Hartung J., Roesler U.: Occurrence of MRSA in air and housing environment of pig barns. *Vet. Microbiol.* **158**, 129–135 (2012)
- Gantzer C., Gaspard P., Galvez L., Huyard A., Dumouthier N., Schwartzbrod J.: Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. *Water Res.* **35**, 3763–3770 (2001)
- Graczyk M.: Kryteria stabilizacji stężonych ścieków i osadów ściekowych. Instytut Inżynierii Sanitarnej. WSIInż, Zielona Góra, 1986
- Guan T.Y., Holley R.A.: Pathogen survival in swine manure environments and transmission of human enteric illness – a review. *J. Environ. Qual.* **32**, 383–392 (2003)
- Graveland H., Duim B., van Duijkeren E., Heederik D., Wagenaar J.A.: Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals and humans. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 630–634 (2011)
- Hatch D.J., Chadwick D.R., Jarvis S.C., Roker J.A.: Controlling nitrogen flows and losses. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2004
- Heinonen-Tanski H., Niskanen E.M., Mielonen M.M., Räsänen H., Valta T., Leinonen P., Rinne K., Joki-Tokola E.: Aeration improves the hygiene of cattle slurry and the hygiene of grass forage and silage. *Acta Agric. Scand., B Soil Plant.* **48**, 212–221 (1998)
- Heinonen-Tanski H., Mohaibes M., Karinen P., Koivunen J.: Methods to reduce pathogen microorganisms in manure. *Livestock Sci.* **102**, 248–255 (2006)
- Heuer H., Schmitt H., Small K.: Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 236–243 (2011)
- Himathongkham S., Riemann H., Bahari S., Nuanualsuwan S., Kass P., Cliver D.O.: Survival of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7 in poultry manure and manure slurry at sublethal temperatures. *Avian Dis.* **44**, 853–860 (2000)
- Hölzel C.S., Schwaiger K., Harms K., Küchenhoff H., Kunz A., Meyer K., Müller C., Bauer J.: Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. *Environ. Res.* **110**, 318–326 (2010)

35. Hunter P, Piddock L.J. i wsp.: Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, Supl. 1, i3–i17 (2010)
36. Hutchison M.L., Walters L.D., Moore A., Avery S.M.: Declines of zoonotic agents in liquid livestock wastes stored in batches on-farm. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 58–65 (2005)
37. Jankowska-Huflejt H.: Stosowanie gnojowicy na użytkach zielonych (w) *Poradnik Gospodarski* 12, 2004, s. 22–24
38. Jones D.L.: Potential health risks associated with the persistence of *Escherichia coli* O157 in agricultural environments. *Soil Use Manage.* **15**, 76–83 (1999)
39. Kearney T.E., Larkin M.J., Levet P.N.: The effect of slurry storage and anaerobic digestion on survival of pathogenic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 86–93 (1993)
40. Kearney T.E., Larkin M.J., Frost J.P., Levett P.N.: Survival of pathogenic bacteria during mesophilic anaerobic digestion of animal waste. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 215–219 (1993)
41. Kim H.B., Lyoo K.S., Joo H.S.: Efficacy of different disinfectants in vitro against porcine circovirus type 2. *Vet. Record.* **164**, 599–600 (2009)
42. Kim K.R., Owens G.R., Kwon S.I., So K.H., Lee D.B., Ok Y.S.: Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment. *Water Air Soil Pollut.* **214**, 163–174 (2011)
43. Kodeks Dobrej Praktyki Rolniczej. Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Ministerstwo Środowiska, 2002
44. Kołacz R., Dobrzański Z. Higiena i dobrostan zwierząt gospodarskich. Akademia Rolnicza we Wrocławiu, Wrocław, 2006
45. Kozak G.K., Boerlin P., Janecko N., Reid-Smith R.J., Jardine I.C.: Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 559–566 (2009)
46. Köck, R., Mellmann F.A., Koksall M., Jurke A., Becker K. i wsp.: Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. *PLoS One*, **8**, e55040 (2013)
47. Kudva I.T., Blanch K., Hovde C.J.: Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3166–3174 (1998)
48. Kuk S-H., S-M. Kim, W-G. Kang, B. Han: High-power accelerator for environmental applications. *J. Korean Phys. Soc.* **59**, 3485–3488 (2011)
49. Kumar R., Gupta M.K., Kanwar S.S.: Fate of bacterial pathogens in cattle dung slurry subjected to anaerobic digestion. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 335–338 (1999)
50. Kumar D., Shivay Y.S.: Definitional Glossary of Agricultural Terms ,Vol. II., I.K. International Publishing House Pvt. Ltd, New Delhi, 2008
51. Kuś J., Jończyk K.: Dobra Praktyka Rolnicza w gospodarstwie rolnym. Materiały szkoleniowe projektu: „Upowszechnianie Kodeksu Dobrej Praktyki Rolniczej wśród rolników”, Radom, 2005
52. Lallai A., Mura G., Onnis N.: The effects of certain antibiotics on biogas production in the anaerobic digestion of pig waste slurry. *Bioresour. Technol.* **82**, 205–208 (2002)
53. Ledakowicz S., Krzystek L.: Wykorzystanie fermentacji metabolicznej w utylizacji odpadów przemysłu rolno-spożywczego. *Biotechnologia* **3**, 165–183 (2005)
54. Maćkowiak C.: Zasady stosowania gnojowicy. Zalecenia nawozowe cz. IV. Wydawnictwo IUNG, Puławy, 1994
55. Maćkowiak C.: Gnojowica, jej właściwości i zasady stosowania z uwzględnieniem ochrony środowiska. Materiały szkoleniowe 75/99, Wydawnictwo IUNG, Puławy, 1999
56. Marshall B.M., Levy S.B.: Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 718–733 (2011)
57. Martens W., Böhm R.: Overview of the ability of different treatment methods for liquid and solid manure to inactivate pathogens. *Bioresour. Technol.* **100**, 5374–5378 (2009)
58. Martens W., Fink A., Phillip W., Weber W., Winter D., Böhm R.: Inactivation of viral and bacterial pathogens in large scale slurry treatment plants (w) Proceedings from RAMIRAN 98 8th Int. Conf. on Management Strategies for Organic Waste Use in Agriculture, red. J. Martinez i M.N. Maudet, Cemagref, Rennes, 1998, s. 529–539
59. Mc Carthy G., Lawlor P.G., Coffey L., Nolan T., Gutierrez M., Gardiner G.E.: An assessment of pathogen removal during composting of the separated solid fraction of pig manure. *Bioresour. Technol.* **102**, 9059–9067 (2011)
60. McGee P., Bolton D.J., Sheridan J.J., Earley B., Leonard N.: The survival of *Escherichia coli* O 157:H7 in slurry from cattle fed different diets. *Lett. Appl. Microbiol.* **32**, s. 152–155 (2001)
61. Michalik J.: Sterylizacja radiacyjna przeszczepów tkankowych. Wyd. Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa, 2009
62. Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi Departament Bezpieczeństwa Żywności i Weterynarii Przeciwbakteryjne produkty lecznicze weterynaryjne w 2012 roku w Polsce, [http://www.wetgiw.gov.pl/index.php?action=art&a\\_id=4417](http://www.wetgiw.gov.pl/index.php?action=art&a_id=4417) (16 kwietnia 2015 roku)
63. Mohaibes M., Heinonen-Tanski H.: Aerobic thermophilic treatment of farm slurry and food wastes. *Bioresour. Technol.* **95**, 245–254 (2004)
64. Nahm K.H.: Influences of fermentable carbohydrates on shifting nitrogen excretion and reducing ammonia emission of pigs. *Crit. Rev. Environm. Sci. Technol.* **33**, 165–186 (2003)
65. Nelson H.: The contamination of organic produce by human pathogens in animal manures. Ecological Agriculture Projects Faculty of Agricultural and Environmental Sci., McGill Univ. (Macdonald Campus), Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada, 1997
66. Nijsten R., London N., Van de Bogaard A., Stobberingh E.: Antibiotic resistance among *Escherichia coli* isolated from fecal samples of pig farmers and pigs. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**, 1131–1140 (1996)
67. Olsen J.E., Larsen H.E.: Bacterial decimation times in anaerobic digestions of animal slurries. *Biol. Wastes.* **21**, 153–168 (1987)
68. Olszewska H., Paluszak Z., Szejniuk B.: Badania przeżywalności drobnoustrojów *Salmonella* Enteritidis w gnojowicy, ścieku bytowym i wodzie w warunkach laboratoryjnych., Materiały na sympozjum: Problemy higieny w ekologicznej rolnictwa. SGGW, Warszawa, 1997, s. 208–213
69. Olszewska H., Skowron K., Skowron K.J., Gryń G., Świąder A., Rostankowska Z., Dębicka E.: Przeżywalność wybranych bakterii wskaźnikowych w składowanej gnojowicy świńskiej. *Ekologia i Technika*, **111**, 62–68 (2011)
70. Olszewska H., Skowron K.: Effect of storage temperature and type of slurry on survivability of *Salmonella*. *J. Cent. Eur. Agric.* **14**, 369–375 (2013)
71. Paluszak Z.: Badania nad zachowaniem i przeżywalnością wybranych drobnoustrojów fekalnych w glebie nawozonej gnojowicą. Rozprawy nr 85. Wydawnictwo Uczelniane ATR, Bydgoszcz, 1998
72. Paluszak Z., Bazeli M., Hermann J., Bauza-Kaszewska J.: Mikrobiologiczne badania osadów pościekowych higienizowanych tlenkiem wapnia. *Med. Wet.* **62**, 1427–1430 (2006)
73. Panseri S., D’Imporzano G., Pognani M., Cavalli M., Chiesa L., Adani F.: Effect of veterinary antibiotics on biogas and bio-methane production. *Int. Biodeter. Biodegr.* **85**, 205–209 (2013)
74. Park G.W., Diez-Gonzalez F.: Utilization of carbonate and ammonia-based treatments to eliminate *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium DT104 from cattle manure. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 675–685 (2003)

75. Pell A.N.: Manure and microbes: Public and animal health problem. *J. Dairy Sci.* **80**, 2673–2861 (1997)
76. Pesaro F, Sorg I., Metzler A.: In situ inactivation of animal viruses and a coliphage in nonaerated liquids and semiliquid animal wastes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 92–97 (1995)
77. Placha I., Venglovsky J., Makova Z., Martinez J.: The elimination of *Salmonella* Typhimurium in sewage sludge by aerobic mesophilic stabilization and lime hydrated stabilization. *Bioresour. Technol.* **99**, 4269–4274 (2008)
78. Plachy P., Placha I., Vargova M.: Effects of physico-chemical parameters of sludge aerobic exothermic stabilisation on the viability of *Ascaris suum* eggs. *Helminthologia* **32**, 233–237 (1995)
79. Rho H., Bongjin S., Okbok L., Choi Y.-H., Rho J., Lee J.: Antibiotic resistance profile of bacterial isolates from animal farming aquatic environments and meats in a peri-urban community in Daejeon, Korea. *J. Environ. Monit.* **14**, 1616–1621 (2012)
80. Romaniuk W.: Gospodarka gnojowicą i obornikiem. Wydawnictwo NFOŚiGW EKO-efekt, Warszawa, 1995
81. Ros M., García C., Hernández T.: A full-scale study of treatment of pig slurry by composting: Kinetic changes in chemical and microbial properties. *Waste Manage.* **26**, 1108–1118 (2006)
82. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 23 grudnia 2002 r. w sprawie szczegółowych wymagań, jakim powinny odpowiadać programy działań mających na celu ograniczenie odpływu azotu ze źródeł rolniczych [Dz.U. 2003 nr 4 poz. 44]
83. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 16 kwietnia 2008 r. w sprawie szczegółowego sposobu stosowania nawozów oraz prowadzenia szkoleń z zakresu ich stosowania [Dz.U. 2008 nr 80 poz. 479]
84. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 czerwca 2008 r. w sprawie wykonania niektórych przepisów Ustawy o nawozach i nawożeniu [Dz.U. 2008 nr 119 poz. 765]
85. Rzewuska M.: Antybiotykooporność Gram-ujemnych pałeczek wytwarzających beta-laktamazy. *Życie wet.* **84**, 200 (2009)
86. Sánchez M., González J.L.: The fertilizer value of pig slurry. I. Values depending on the type of operation. *Bioresour. Technol.* **96**, 1117–1123 (2005)
87. Sahlstrom L.: A Review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresour. Technol.* **87**, 161–166 (2003)
88. Semenov A.V., Overbeek L., Termorshuizen A.J. i van Bruggen A.H.C.: Influence of aerobic and anaerobic conditions on survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Luria Bertani broth, farm-yard manure and slurry. *J. Environ. Manage.* **92**, 780–787 (2011)
89. Skowron K., Olszewska H., Paluszak P., Skowron K.J. i Bauza-Kaszewska J.: Use of the Filter-Sandwich carriers in continuous effectiveness monitoring of slurry treatment methods as an element improving biosafety in agriculture. *Ann. Agric. Environ. Med.* **20**, 252–258 (2013)
90. Skowron K., Olszewska H., Paluszak Z., Zimek Z., Kałuska I., Skowron K.J.: Radiation hygienization of cattle and swine slurry with high energy electron beam. *Radiat. Phys. Chem.* **87**, 88–96 (2013)
91. Strauch D.: Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **10**, 813–846 (1991)
92. Strauch D., Ballarini G.: Hygienic aspects of the production and agricultural use of animal wastes. *J. Vet. Med. B.* **41**, 176–228 (1994)
93. Szember A.: Zarys mikrobiologii rolniczej. Wydawnictwo Akademii Rolniczej WAR, Lublin, 1997
94. Tappouni Y.A.: The fate of *Salmonella* in anaerobic digestion. PhD Thesis, University College, Cardiff, 1984
95. Thiele-Bruhn S. i Peters D.: Photodegradation of pharmaceutical antibiotics on slurry and soil surfaces. *Landbauforschung Völknerode*, **1**, 13–23 (2007)
96. Turner C., Burton C.H.: The inactivation of viruses in pig slurries: A review. *Bioresour. Technol.* **61**, 9–20 (1997)
97. Ustawa z dnia 10 lipca 2007 r. o nawozach i nawożeniu [Dz.U. 2007 nr 147 poz. 1033]
98. Vanderhaeghen W., Hermans K., Haesebrouck F. i Butaye P.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. *Epidemiol. Infect.* **138**, 606–625 (2010)
99. Venglovsky J., Sasakova N. i Placha I.: Pathogens and antibiotic residues in animal manures and hygienic and ecological risks related to subsequent land application. *Bioresour. Technol.* **100**, 5386–5391 (2009)
100. Vignaroli C., Zandri G., Aquilanti L., Pasquaroli S., Biavasco F.: Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Curr. Microbiol.* **62**, 1438–1447 (2011)
101. Watabe M., Rao J.R., Stewart T.A., Xu J., Millar B.C., Xiao L., Lowery C.J., Dooley J.S. i Moore J.E.: Prevalence of bacterial faecal pathogens in separated and unseparated stored pig slurry. *Letts. Appl. Microbiol.* **36**, 208–212 (2003)
102. Wegener H.C.: Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**, 439–445 (2003)
103. Wellington E.M.H., Boxall A.B.A., Cross P., Feil E.J., Gaze W.H.: The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *The Lancet Infectious Diseases* **13**, 155–165 (2013)
104. Wong J.W.C., Selvam A.: Reduction of indicator and pathogenic microorganisms in pig manure through fly ash and lime addition during alkaline stabilization. *J. Hazard. Mater.* **169**, 882–889 (2009)
105. Worwąg M., Bień J., Zawieja I.: Zespoły mikroorganizmów w procesach beztlenowej stabilizacji osadów. *Proceedings of EC Opole*, **4**, 515–522 (2010)
106. Yu Y., Chan W.I., Liao P.H., Lo K.V.: Disinfection and solubilization of sewage sludge using the microwave enhanced advanced oxidation process. *J. Hazard. Mater.* **181**, 1143–1147 (2010)
107. Yuan F., Hu C., Hu X., Wei D., Chen Y. i Qu J.: Photodegradation and toxicity changes of antibiotics in UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process. *J. Hazard. Mater.* **185**, 1256–1263 (2011)

Jolanta Karakulska<sup>1</sup>, Paweł Nawrotek<sup>1</sup>, Karol Fijałkowski<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wpłynęło w maju 2014 r.

1. Wstęp. 2. Struktura toksyny PVL. 3. Geny PVL i regulacja ich ekspresji. 4. Mechanizm działania toksyny PVL. 5. Znaczenie kliniczne szczepów produkujących toksynę PVL. 6. Badania na modelach zwierzęcych. 7. Metody detekcji toksyny PVL. 8. Podsumowanie

#### Panton-Valentine leukocidin – known and unknown aspects

**Abstract:** Panton-Valentine leukocidin (PVL) is a two component pore-forming cytotoxin composed of LukS-PV and LukF-PV subunits, which mainly acts on mammalian neutrophils, monocytes and macrophages. The mechanism of action of PVL and its role in the pathogenesis of staphylococcal infections are still poorly understood. *In vitro* studies showed a concentration-dependent cytotoxic effect of PVL (formation of pores in the cell membrane), leading to apoptosis or necrosis of phagocytes. Nevertheless, it should be emphasized that, to date, it has not been proven that causing damage to phagocytes is the main function of PVL *in vivo*. It is known, however, that the concentration of PVL *in vivo* is not sufficient to induce cytolysis. Furthermore, it has been shown that sublethal concentration of PVL *in vivo* can activate and intensify bactericidal properties of phagocytes. Nowadays, PVL is epidemiologically linked mainly to community-associated methicillin-resistant *S. aureus* infections. There are also available, though very limited, data concerning the isolation of *pvl*-positive MRSA and MSCNS strains from domestic and farm animals.

1. Introduction. 2. The structure of the PVL toxin. 3. PVL genes and the regulation of their expression. 4. The mechanism of action of PVL toxin. 5. The clinical significance of strains producing PVL toxin. 6. Studies on animal models. 7. PVL toxin detection methods. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** CA-MRSA, cytotoksyny, geny *pvl*, leukocydyna Panton-Valentine, *S. aureus*

**Key words:** CA-MRSA, cytotoxins, *pvl* genes, Panton-Valentine leukocidin, *S. aureus*

## 1. Wstęp

Właściwości biologiczne *Staphylococcus aureus*, w dużej mierze uwarunkowane przez proces horyzontalnego transferu genów (HGT – horizontal gene transfer), czynią go niezwykle groźnym patogenem dla ludzi, zwierząt, a także roślin [22, 30]. Wiele szczepów tego gatunku charakteryzuje obecność czynników wirulencji o znaczeniu klinicznym i epidemiologicznym, a także znaczna zdolność adaptacyjna, pozwalająca na przetrwanie niesprzyjających warunków oraz kolonizowanie nowych środowisk. Gronkowiec złocisty wytwarza wiele cząsteczek, które mogą przyczyniać się do unikania mechanizmów wrodzonej odporności. Wśród nich istotną rolę odgrywają toksyny tworzące pory w błonie cytoplazmatycznej leukocytów (pore-forming toxins) [1, 55, 68]. Cytotoksyny te zwiększają przeżywalność bakterii w zakażonym organizmie, powodując śmierć komórek docelowych układu immunologicznego, a przez to osłabienie gospodarza w pierwszych etapach zakażenia.

Panton-Valentine leukocydyna (PVL – Panton-Valentine leukocidin) jest dwuskładnikową cytotoksyną należącą do rodziny białek tworzących pory w błonach komórek docelowych [46, 47]. Po raz pierwszy została opisana przez van de Velde w 1894 roku jako

substancja leukocydynowa („substance leukocide”), ze względu na jej zdolność do lizy leukocytów [43, 65]. Nazwę toksyny wprowadzili Panton i Valentine [6, 51].

Toksyna Panton-Valentine jest uważana za jeden z ważniejszych czynników gronkowcowej wirulencji [30]. Mogą ją wytwarzać zarówno metycylinooporne, jak również metycylinowrażliwe szczepy *S. aureus*. PVL-pozytywne szczepy *S. aureus* są zazwyczaj związane ze zmianami martwiczo-ropnymi skóry i tkanki podskórnej. Ponadto, mogą powodować ciężkie zakażenia, jak septyczne zapalenie stawów, bakteriemie, płamicę piorunującą, czy też pozaszpitalne martwicze zapalenie płuc.

## 2. Struktura toksyny PVL

Panton-Valentine leukocydyna (PVL) jest dwuskładnikową toksyną należącą do rodziny białek o strukturze  $\beta$ -baryłki ( $\beta$ -barrel), tworzących pory w błonach komórek docelowych. Oprócz PVL, do dwuskładnikowych leukotoksyn wytwarzanych przez *S. aureus* należą również  $\gamma$ -hemolizyna oraz Luke-LukD leukocydyna. Aktywność tych toksyn wymaga połączenia dwóch odrębnych i niezależnych białek wydzielniczych, określonych jako białka klasy S i F. Obecnie znanych jest sześć białek klasy S i pięć białek klasy F [46, 47].

\* Autor korespondencyjny: Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, al. Piastów 45, 70-311 Szczecin; tel. 91 449 6714, e-mail: karol.fijalkowski@zut.edu.pl

Toksyna PVL w formie natywnej jest białkiem heterooligomerycznym, którego podstawowymi elementami struktury są podjednostka LukF-PV o masie około 34 kDa oraz podjednostka LukS-PV o masie około 32 kDa [12]. Każda podjednostka jest wydzielana jako rozpuszczalny w wodzie monomer [1]. Znana jest struktura i wielkość monomerycznych form LukF-PV i LukS-PV [29, 52], jednakże trójwymiarowa struktura oligomerycznej PVL nie została jak dotąd określona [1].

Podjednostki LukF-PV i LukS-PV mają eliptyczne kształty i wymiary około  $70 \text{ \AA} \times 35 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA}$ . Obie podjednostki należą do klasy strukturalnej białek „all-beta” i są bogate w strukturę  $\beta$ -harmonijki ( $\beta$ -sheet). Każdy z monomerów wchodzących w skład funkcjonalnej poriny zawiera w swojej strukturze domenę  $\beta$ -kanapki ( $\beta$ -sandwich) oraz domenę „rim” (ang.). Pierwsza z domen występuje w górnej części struktury monomeru i składa się z dwóch  $\beta$ -harmonijek, tworzonych z ułożonych antyrównolegle  $\beta$ -pasm. Również w górnej części występuje region „pre-stem” zawierający  $\beta$ -spinkę ( $\beta$ -hairpin), która jest wbudowywana w poprzek struktury błony komórkowej podczas tworzenia pory. Z kolei, w dolnej części monomerów toksyny znajduje się mniejsza domena „rim”, która ma strukturę otwartej  $\beta$ -kanapki (open-face-sandwich) i jest tworzona z czterech antyrównoległych  $\beta$ -pasm. Domena ta jest odpowiedzialna za wiązanie toksyny do powierzchni błony i charakteryzuje się resztami hydrofobowymi, które zakotwiczą ją w hydrofobowej warstwie podwójnej błony lipidowej [1]. Między dwiema podjednostkami PVL występują duże różnice konformacji w domenie „rim”, co prawdopodobnie determinuje ich funkcjonalne zróżnicowanie [29].

### 3. Geny PVL i regulacja ich ekspresji

Zdolność do wytwarzania toksyny Panton-Valentine jest determinowana obecnością operonu *luk-PV* (zawierającego geny *lukF-PV* i *lukS-PV*), zlokalizowanego w obrębie genomów zróżnicowanych morfologicznie profagów PVL *S. aureus*. Należy podkreślić, że większość czynników wirulencji rozprzestrzenia się w obrębie rodzaju *Staphylococcus* na drodze specyficznej transdukcji bakteriofagowej, a od 1961 roku wiadomo, że produkcja niektórych toksyn przez *S. aureus* powiązana jest ze zjawiskiem lizogenii (konwersji lizogennej) [7, 30]. Niesione przez niektóre fagi lizogeniczne dodatkowe geny ulegają ekspresji po integracji z chromosomem bakteryjnym zmieniając fenotyp gospodarza, a w konsekwencji warunkują wystąpienie określonych objawów klinicznych obserwowanych podczas przebiegu zakażenia [30].

Organizacja genomu fagowego jest konserwatywna wśród profagów kodujących PVL, zwłaszcza w regionach zawierających geny kodujące białka odpowie-

dzialne za lizę komórki bakteryjnej oraz geny determinujące wytwarzanie toksyny. Zaczynając od jednego końca (*cos*-site), liniowy genom profagów jest podzielony na pięć regionów zawierających geny: 1. kodujące białka strukturalne faga (wykorzystywane podczas morfogenezy profagów PVL), 2. kontrolujące cykl lityczny fagów, 3. kodujące dwie podjednostki toksyny PVL (*lukF-PV* i *lukS-PV*), 4. kontrolujące cykl lizogeniczny fagów oraz 5. odpowiedzialne za replikację i transkrypcję. Od czasu odkrycia toksyny PVL scharakteryzowano dotychczas osiem niosących geny *pvl* fagów należących do rodziny *Siphoviridae* ( $\Phi$ PVL,  $\Phi$ SLT,  $\Phi$ Sa2mw,  $\Phi$ Sa2USA300,  $\Phi$ SLT-USA300\_TCH1516,  $\Phi$ 108PVL,  $\Phi$ tp310-1 i  $\Phi$ 2985PVL) [22, 73]. Można je podzielić na trzy grupy, w zależności od różnic w sekwencji nukleotydowej regionów odpowiedzialnych za replikację/transkrypcję i morfogenezę, a także ze względu na zakres ich gospodarzy. Obecność tych samych genów kodujących toksynę PVL w odmiennych morfologicznie fagach dowodzi, że mogą one być łatwo wymieniane, prawdopodobnie podczas koinfekcji [22]. Zwykle fagi te są zintegrowane z genomem *S. aureus* w miejscu *attB* (29 pz) C-terminalnego regionu otwartej ramki odczytu (ORF – open reading frame) kodującej nieznane białko [73]. Zdolność do wytwarzania PVL wynika zatem z koewolucji gronkowców i infekujących je łagodnych bakteriofagów, które tym samym uczestniczą w etiopatogenezie infekcji bakteryjnej.

Geny kodujące toksynę PVL mogą występować również w obrębie niektórych gronkowcowych wysp patogenności (SaPIs – staphylococcal pathogenicity islands), których horyzontalny transfer również zachodzi na drodze transdukcji bakteriofagowej. Ruchome SaPIs, niosące obok genów *lukF* i *lukS* także inne determinanty gronkowcowej wirulencji, takie jak toksyna-1 zespołu wstrząsu toksycznego (TSST-1 – toxic shock syndrome toxin-1), mogą w istotny sposób przyczyniać się do powstania wysoce zjadliwych szczepów *S. aureus* o znaczącym potencjale klinicznym i epidemiologicznym [30, 40]. Transmisja genów kodujących toksynę PVL pozostaje w ścisłym związku z procesem uwolnienia profaga ze stanu utajenia, analogicznym do wycięcia kasety SaPIs z chromosomu bakteryjnego drogą specyficznej rekombinacji. Wycięty fragment jest następnie replikowany z bardzo wysoką wydajnością, przy wykorzystaniu aparatu molekularnego faga. Dochodzi tym samym do amplifikacji znajdujących się na nim genów, w tym genów konwersji lizogennej [30].

Geny operonu *luk-PV* są zlokalizowane w jednym z najbardziej mobilnych regionów genomowego DNA *S. aureus* opornych na metycylinę. Z tego też powodu region ten może być uważany za marker specyficzny dla tych szczepów [18, 49, 63, 66, 71]. Pomimo, iż geny *pvl* są obecne u 2–5% *S. aureus*, szczepy produkujące toksynę PVL są odpowiedzialne za jedne z najpoważniejszych zakażeń na tle gronkowcowym, zwłaszcza

CA-MRSA (CA-MRSA – community-associated MRSA) na całym świecie [15, 45].

Synteza i wydzielanie toksyny PVL, podobnie jak innych egzoprotein, następuje w późnej fazie wzrostu wykładniczego oraz w fazie stacjonarnej. W tym samym czasie produkcja białek niezbędnych do wzrostu jest obniżana, zahamowaniu ulega też synteza adhezyn [13, 62]. Wskazuje to na istnienie jednocześnie kilku globalnych systemów regulacyjnych, w których pojedynczy czynnik środowiskowy kontroluje ekspresję wielu genów docelowych [6]. W regulacji ekspresji genów *lukF-PV* i *lukS-PV* u *S. aureus* uczestniczy dwuskładnikowy system regulacyjny zależny od czynników środowiska – *agr* (accessory gene regulator). Dowiedziono, że występowanie szczepów gronkowcowych produkujących toksynę PVL jest powiązane z fenotypem *agr*-I i/lub *agr*-III grupy. Dodatkowo, w regulacji ekspresji genów kodujących PVL mogą uczestniczyć inne niż wykorzystywane w systemie *agr* czynniki, w tym zwłaszcza alternatywny czynnik transkrypcyjny MgrA. Posiada on, podobnie jak inne czynniki transkrypcyjne, takie jak: RNA III, białka z rodziny SarA (staphylococcal accessory regulator A) oraz Rot i Sigma<sub>B</sub>, zdolność wiązania DNA w miejscach promotorowych genów, aktywując bądź hamując ich transkrypcję. W przypadku operonu *luk-PV* *S. aureus* białko MgrA wyłącznie aktywuje ekspresję genów *lukF-PV* i *lukS-PV* [62].

Ze względu na fakt, iż geny kodujące PVL są zlokalizowane w obrębie genomu profagów *S. aureus*, może istnieć ścisły związek pomiędzy wytwarzaniem tej toksyny a indukcją fagową, w odpowiedzi na różne czynniki zewnętrzne, w tym np. niektóre antybiotyki. Wykazano, że podprogowe stężenia antybiotyków β-laktamowych, zaburzających syntezę ściany komórkowej poprzez oddziaływanie na transmembranowe białka wiążące penicylinę (PBPs – penicillin binding proteins), powodują wzrost produkcji PVL *in vitro* poprzez aktywację transkrypcji. Świadczy to o tym, że antybiotyki wiążące się z PBP mogą zwiększać ekspresję PVL, poprzez modulowanie systemów regulacyjnych gospodarza (w tym zwłaszcza *agr* lub SarA i Rot), a dodatkowo także w odpowiedzi na indukcję fagów PVL, inicjowaną przez (uruchamiany wówczas) bakteryjny system naprawczy SOS. Może to implikować skutki kliniczne stosowania niektórych antybiotyków w terapii ciężkich zakażeń na tle CA-MRSA [21, 30, 73].

#### 4. Mechanizm działania toksyny PVL

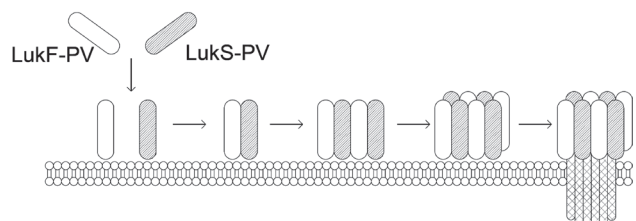
Toksyna PVL wykazuje aktywność cytotoksyczną wobec ssaczy neutrofilów oraz monocytów i makrofagów. Jednakże mechanizm działania tej toksyny w przebiegu infekcji gronkowcowych oraz jej udział w patogenezie są ciągle słabo poznane, a w wielu przy-

padkach opisywane bardzo nieprecyzyjnie lub oparte tylko na przypuszczeniach [60].

Podjednostki LukF-PV i LukS-PV toksyny PVL, są wydzielane przez bakterie w formie rozpuszczalnych w wodzie monomerów, które ostatecznie formują się w cząsteczki tworzące pory w błonie komórkowej [6]. Utworzenie transbłonowej pory możliwe jest dzięki synergistycznemu oddziaływaniu podjednostek PVL i określonej sekwencji zdarzeń, zachodzących na powierzchni błony komórki docelowej [34]. Miejsca wiązania dla toksyny PVL przez długi czas były nieznanne. Niemniej jednak, wyniki badań przeprowadzonych przez Spaan i wsp. [60] wykazały, że ludzkie receptory dla cząsteczek dopełniacza, C5aR i C5L2, mogą również pełnić rolę miejsc wiążących toksynę PVL. Ustalono, że receptory te pośredniczą zarówno w wiązaniu toksyny, jak i determinują jej cytotoksyczność. Zostało również potwierdzone, że ekspresja i międzygatunkowe różnice w budowie receptora C5aR warunkują komórkową i gatunkową specyficzność toksyny PVL [60].

Tworzenie porów w błonie komórkowej, jako następstwo aktywności toksyny PVL, jest procesem kilkustopniowym (Rys. 1). W pierwszym etapie, rozpuszczalne w wodzie monomery LukS-PV, a następnie LukF-PV wiążą się do powierzchni błony komórkowej formując heterodimery [24, 29, 45]. W kolejnym etapie, heterodimery ulegają dalszej oligomeryzacji do heterotetramerów, które charakteryzują się naprzemiennym ułożeniem cząsteczek LukF-PV i LukS-PV. Następnie heterotetramery formują dyskowate, oktameryczne struktury składające się z podjednostek LukS-PV i LukF-PV również ułożonych naprzemiennie w stosunku stechiometrycznym 1:1 [29]. Na tym etapie toksyna PVL jest już oktamerem o konformacji wstępnie uformowanego pora, który jednak nie jest w pełni funkcjonalny i nie może ulec wbudowaniu w poprzek błony komórkowej. W następnych etapach region macierzysty podjednostek LukS-PV i LukF-PV ulega wydłużeniu w poprzek błony komórkowej, co w efekcie końcowym prowadzi do uformowania w pełni funkcjonalnego pora transbłonowego (Rys. 1) [1, 29].

Z molekularnego punktu widzenia, por jest oktamerycznym kompleksem o konformacji β-baryłki i średnicy od 10 Å do 20 Å, który jest zlokalizowany prostopadle do błony komórkowej i funkcjonuje jako integralna



Rys. 1. Mechanizm tworzenia pora przez toksynę PVL  
[wg 1 – zmienione]



transbłonowa struktura, pozwalająca na przechodzenie jonów i małych cząsteczek (o masie molekularnej do 1000 Da) do wnętrza komórki, w konsekwencji prowadząc do jej śmierci [6].

Badania *in vitro* wykazały, że aktywność toksyny PVL jest zróżnicowana i zależy od jej stężenia w miejscu oddziaływania [27, 35]. Zostało udowodnione, że sublityczne stężenie PVL aktywuje wewnątrzkomórkowy szlak mitochondrialny prowadzący do apoptozy. Natomiast wyższe stężenia PVL indukują zmiany związane z nekrozą. Obecnie wiadomo, że zależna od stężenia aktywność PVL jest związana z molekularnymi właściwościami tej toksyny [25].

Przy mniejszych stężeniach toksyny PVL (~5 nM) zmiany morfologiczne neutrofilów mają charakter apoptotyczny i są widoczne po około 6 godzinach [25]. W niskiej koncentracji, toksyna wiąże się do receptorów na błonie komórkowej, co wywołuje powstawanie małej ilości oktamerycznych porów [24]. Uważa się, że PVL może oddziaływać również na poziomie mitochondrialnym poprzez tworzenie porów w zewnętrznej błonie mitochondriów. Jak donoszą Genestier i wsp. [25], apoptoza indukowana przez PVL jest związana z szybkim zaburzeniem homeostazy mitochondrialnej i aktywacją kaspazy-3 i kaspazy-9, co sugeruje, że proces ten jest zależny od szlaków mitochondrialnych.

Z kolei, przy dużym stężeniu PVL (~200 nM) obserwowane są zmiany morfologiczne komórek fagocytów charakterystyczne dla nekrozy, które są widoczne już po 1 godzinie [25]. Przy dużych stężeniach, toksyna ta może niespecyficznie adsorbować do podwójnej błony lipidowej komórki, tworząc większe pory przepuszczalne dla  $Ca^{2+}$ , formując większą ilość oktamerycznych porów lub prowadząc do otwierania kanałów  $Ca^{2+}$  [2]. Podjednostki toksyny PVL, po połączeniu z receptorem związanym z kanałami wapniowymi lub bezpośrednio z kanałami wapniowymi, mogą również indukować wpływanie do komórki dwuwartościowych kationów ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) przez zależne od jonów wapnia kanały komórkowe, a następnie po sformowaniu pora umożliwiają napływ jonów jednowartościowych (etydyny<sup>+</sup>,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ ). Konsekwencją tego procesu jest nekroza fagocytów [25, 61]. Ponadto tworzenie dużych porów może również prowadzić do utraty ATP, co jest niezbędne do zapoczątkowania większości procesów apoptotycznych [25, 39].

Należy również podkreślić, że oprócz zdolności do formowania porów w błonie komórkowej fagocytów, toksyna PVL jest również czynnikiem aktywującym polimorfonuklearne neutrofile (PMNs – polymorphonuclear neutrophils) [27, 35, 43]. Wykazano, że stężenie PVL poniżej wartości niezbędnej do utworzenia porów może stymulować PMN do intensywnej produkcji bójczych form tlenu i sekrecji prozapalnych cząsteczek, takich jak interleukina-8 (IL-8), interleukina-6 (IL-6)

i leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). Może również indukować egzo-cytozę ziarnistości, powodując tym samym uwolnienie mieloperoksydazy, lizozymu i  $\beta$ -glukuronidazy do przestrzeni międzykomórkowych, co z kolei może pozytywnie usposabiać odporność gospodarza do obrony przed postępującą infekcją. Ponadto, zostało udowodnione, że sublityczne stężenia PVL indukują uwalnianie histaminy przez ludzkie bazofile [6, 27, 36].-

Należy podkreślić, że analizy cytolitycznych właściwości PVL dotyczą badań wykonywanych w warunkach *in vitro*, natomiast jak dotąd brakuje danych świadczących, że zasadniczą funkcją PVL *in vivo* jest cytoliza leukocytów [27]. Zostało natomiast udowodnione, że stężenie PVL *in vivo* jest niewystarczające do wywołania lizy PMN [3]. Dlatego przypuszcza się, że sublityczne stężenia PVL mogą stymulować wrodzoną odpowiedź immunologiczną i tym samym intensyfikować mechanizmy obronne uruchamiane przez organizm w celu zwalczania infekcji [28]. Tak więc, na podstawie dotychczasowych badań należy stwierdzić, że sublityczne stężenie PVL *in vivo* odgrywa głównie rolę aktywatora PMN, intensyfikując bakteriobójcze właściwości tych komórek.

## 5. Znaczenie kliniczne szczepów produkujących toksynę PVL

Zakażenia wywoływane przez szczepy *S. aureus* wytwarzające toksynę PVL były dokumentowane już od 1930 roku [6, 43, 50, 51]. Jednakże, w 1932 roku, Panton i Valentine jako pierwsi skojarzyli toksynę PVL z zakażeniami skóry i tkanek miękkich oraz wykazali korelację między obecnością tej toksyny i ciężkimi infekcjami na tle *S. aureus*, zwłaszcza czyrakiem gromadnym [50].

Szczepy *S. aureus* produkujące toksynę PVL są zazwyczaj związane z ropnymi chorobami skóry i martwicą tkanki podskórnej. Mogą również powodować septyczne zapalenie stawów, bakteriemie, płamicę piorunującą i pozaszpitalne martwicze zapalenie płuc [41, 51].

Toksynę PVL mogą syntetyzować różne szczepy *S. aureus*, zarówno MRSA, jak i MSSA [3, 51]. Jednakże, z klinicznego punktu widzenia, najważniejszymi producentami toksyny PVL są szczepy CA-MRSA, których wyraźny wzrost rozpowszechnienia jest obecnie odnotowywany na całym świecie [16, 21, 28]. Pojawienie i szybkie rozprzestrzenianie się CA-MRSA przypisuje się przede wszystkim zdolności tych szczepów do produkcji PVL [23, 24, 45]. Dane kliniczne wskazują szczególnie na korelację między PVL-pozytywnymi szczepami *S. aureus* a ciężkimi, w tym śmiertelnymi, przypadkami martwiczego zapalenia płuc o etiologii CA-MRSA [26]. Ponadto, wykazano związek pozaszpitalnego zapalenia płuc na tle *S. aureus* (MRSA lub MSSA) z wcześniej przebytą grypą lub wystąpieniem objawów grypopodobnych [26, 32, 33, 72].

Przebieg kliniczny i powikłania zakażeń na tle *pvl*-pozytywnych szczepów *S. aureus* są opisywane jako poważniejsze, niż zakażeń powodowanych przez szczepy nie posiadające genetycznie uwarunkowanej zdolności do produkcji PVL [26, 42]. Jednak, co ciekawe, odnotowywana jest większa podatność na leczenie pacjentów zakażonych PVL-pozytywnymi szczepami *S. aureus*, w porównaniu z pacjentami zakażonymi szczepami nie wykazującymi zdolności do syntezy toksyny PVL [4].

Prowadzone obecnie badania koncentrują się na poznaniu funkcji PVL w zakażeniach powodowanych przez CA-MRSA [43]. Jednakże podłoże molekularne chorób wywoływanych przez te szczepy, w tym ciężkiego zapalenia płuc na tle *S. aureus* w następstwie grypy, jak również rola toksyny PVL w etiopatogenezie zakażeń gronkowcowych nie zostały dotychczas ostatecznie wyjaśnione [26, 41, 43, 66]. Z jednej strony istnieją badania kwestionujące obecność toksyny PVL, jako podstawowego wyznacznika klinicznego przebiegu zakażeń na tle *S. aureus* [4, 11, 31, 38]. Z drugiej jednak strony uważa się, że wysoki potencjał zjadliwości CA-MRSA jest związany z produkcją PVL, a odnotowywane powiązanie tej toksyny z głównymi klonami CA-MRSA sugeruje, że może ona zwiększać wirulencję i/lub promować wzmożoną transmisję szczepów [20, 26, 66]. Co więcej, wykrycie podjednostki LukS-PV toksyny PVL w pobranych od pacjentów wycinkach płuc objętych martwiczym zapaleniem, wraz z pofragmentowanym DNA, wskazuje na bezpośrednie zaangażowanie PVL w patomechanizm choroby poprzez indukcję *in vivo* apoptozy [25].

Z epidemiologicznego punktu widzenia istotne znaczenie ma fakt, że nie tylko ludzkie szczepy *S. aureus* są genetycznie determinowane do produkcji PVL, chociaż o PVL-pozytywnych szczepach gronkowców izolowanych od zwierząt niewiele wiadomo. Do tej pory, PVL-pozytywne szczepy MRSA zostały wyizolowane z przypadków ciężkich zakażeń u zwierząt domowych, takich jak psy, kot, królik czy papuga [58]. Poza tym, wyizolowano także *pvl*-pozytywne wrażliwe na metycylinę koagulazoujemne gronkowce (MSCNS – methicillin-sensitive coagulase-negative staphylococci), w tym *S. haemolyticus*, *S. simulans* i *S. warneri*, od krów i owiec z podkliniczną postacią *mastitis* [64]. Brak jest natomiast danych literaturowych odnośnie izolacji PVL-pozytywnych szczepów *S. aureus* z zapalenia gruczołu mlekowego u przeżuwaczy. Jednakże, w kontekście *mastitis* podkreślane jest znaczenie podjednostki LukF-PV toksyny PVL. Podjednostka LukF-PV wraz z podjednostką LukM leukocydyny stanowią elementy strukturalne toksyny LukM/LukF<sup>2</sup>-PV [5]. Leukotoksyna ta jest uważana za najbardziej aktywną cytotoksynę wobec bydłowych neutrofilów, mogącą odgrywać kluczową rolę w patogenezie *mastitis* u krów, a także owiec i kóz [5, 34, 57].

Reasumując, dotychczasowe dane epidemiologiczne i kliniczne nie są wystarczające, aby udowodnić bezpośrednią rolę PVL w zakażeniach o etiologii *S. aureus*, ani też bezpośredni udział tej toksyny przyczyniającej się do szerokiego rozpowszechniania CA-MRSA [12, 43]. Jednakże uważa się, iż wyjaśnienie roli PVL w patogenezie zakażeń na tle *S. aureus* może mieć ważne znaczenie dla poznania celów leczniczych i opracowania skuteczniejszych metod terapeutycznych w zakażeniach CA-MRSA [16, 28, 43]. Ponadto, ze względu na możliwość dwukierunkowej transmisji gronkowców pomiędzy ludźmi i zwierzętami, dalsze badania dotyczące aspektów klinicznych, czynników ryzyka i epidemiologii chorób na tle PVL-pozytywnych szczepów stanowią ważny problem zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej [58].

## 6. Badania na modelach zwierzęcych

Udział toksyny PVL w wirulencji szczepów *S. aureus* jest tematem dużego zainteresowania i intensywnych badań. Jednakże, odnotowywane są sprzeczne dane epidemiologiczne i kliniczne dotyczące potencjalnej roli PVL w zakażeniach o etiologii CA-MRSA z użyciem różnych zwierzęcych modeli chorób [9, 10, 43, 54, 69].

Większość badań przeprowadzonych na myszach, dotyczących patogenezy CA-MRSA wykazuje, że toksyna PVL nie odgrywa żadnej lub ograniczoną czasowo rolę w rozwoju choroby [19]. Voyich i wsp. [70] porównali działanie dzikich szczepów USA300 i USA400 oraz szczepów izogenicznych z delecją genu *pvl* na mysich modelach zakażenia skóry oraz sepsy, odnotowując praktycznie identyczny przebieg zakażenia niezależnie od testowanych szczepów. Natomiast Varshney i wsp. [67], prowadząc badania na mysim modelu zakażenia skóry wykazali, że szczepy MSSA i MRSA produkujące duże ilości PVL powodują bardziej rozległe ropnie skórne i silniejsze zapalenie tkanek, niż szczepy cechujące się niską zdolnością do produkcji tej toksyny. Z kolei Labandeira-Rey i wsp. [37], na podstawie wyników uzyskanych na mysim modelu gronkowcowego zapalenia płuc, przy zastosowaniu laboratoryjnych szczepów *S. aureus* transdukowanych do ekspresji toksyny PVL, zaproponowali model infekcji, w którym PVL pełni funkcję regulatora ekspresji genów. Jednakże badania innych autorów z zastosowaniem mikromacierzy i proteomiki wykazały, że PVL nie ma wpływu *in vitro* ani *in vivo* na ekspresję genów czy wytwarzanie białek w testowanych szczepach *S. aureus* USA300 i USA400 [19, 43].

Powód rozbieżności wyników badań dotyczących roli PVL w etiopatogenezie zakażeń *S. aureus* długo pozostawał niejasny. Dopiero Kobayashi i DeLeo [35], na podstawie przeprowadzonych badań wysunęli hipotezę, że rola PVL w przebiegu chorób wywoływanych

przez CA-MRSA może być determinowana specyficznym uwarunkowaniem genetycznym gospodarza lub czynnikiem podatności/wrażliwości (np. przebiegiem grypy). Ponadto, autorzy ci zwrócili także uwagę, że wpływ toksyny PVL może być zbyt słaby, aby można go było wykryć w stosowanych dotychczas modelach patogenezы lub, że stosowane modele nie są właściwe i nie odzwierciedlają precyzyjnie przebiegu choroby u ludzi. Ostatecznie, badania Löffler i wsp. [45] dostarczyły wyjaśnienia powodu uzyskiwania sprzecznych wyników badań, dotyczących roli PVL w zakażeniach *S. aureus* z użyciem różnych modeli zwierzęcych. Autorzy ci wykazali, że PVL powoduje szybką aktywację i śmierć neutrofilów ludzkich i króliczych, ale nie mysich i małpich. W związku z tym zakwestionowali oni wartość stosowanych mysich i naczelnych (poza człowiekiem) modeli infekcyjnych do badania roli PVL w patogenezы zakażeń CA-MRSA. Aktywność toksyny PVL wobec ludzkich neutrofilów została udowodniona przez Loughman i wsp. [44], poprzez wykazanie wysokiego poziomu ekspresji genu *pvl* bezpośrednio w ludzkiej tkance.

## 7. Metody detekcji toksyny PVL

Wykrywanie zdolności do wytwarzania PVL przez gronkowce oraz detekcja obecności toksyny mogą być przeprowadzone różnymi metodami, zarówno na poziomie samego białka, jak i na poziomie DNA i RNA.

Standardowe techniki służące do detekcji genów *pvl* opierają się o amplifikację kwasów nukleinowych w reakcji PCR, z wykorzystaniem specyficznych starterów DNA komplementarnych do sekwencji podjednostek LukF-PV i LukS-PV [3, 59]. Wśród najczęściej stosowanych metod wykrywania toksyn cytolitycznych, w tym toksyny PVL, wymienić można metody bezpośrednio, takie jak: test ELISA [3, 56], techniki immunofluorescencyjne [25] i testy immunochromatograficzne [3]. Na poziomie RNA, toksyna PVL wykrywana jest przy użyciu techniki RT-PCR [8, 26] oraz real time PCR [17]. Do najpowszechniej stosowanych technik pośrednich należą z kolei: testy cytotoksyczności, na przykład test inkorporacji czerwieni obojętnej [57], testy oparte o redukcję soli tetrazolowych [14], cytometria przepływowa [24, 48], oznaczanie fragmentacji DNA leukocytów (metoda TUNEL – terminal transferase dUTP nick end labeling), obserwacja morfologicznych zmian w komórkach barwionych metodami May-Grünwald, Giemsa, Wright, Hoechst 33342 oraz immunofluorescencyjnie – zmiany obserwowane są w mikroskopie świetlnym, fluorescencyjnym, konfokalnym lub transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM – transmission electron microscope) [5, 25]. Ponadto, obecnie opracowywane są nowe techniki, które w przy-

szłości umożliwią wykrycie najmniejszych ilości toksyny w ciągu kilku minut. Oparte są one przede wszystkim o spektroskopię masową typu MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) [59].

## 8. Podsumowanie

Leukocydyna Panton-Valentine (PVL) jest dwuskładnikową cytotoksyną składającą się z ułożonych naprzemiennie podjednostek LukS-PV i LukF-PV, należąca do rodziny białek tworzących pory w błonie komórkowej neutrofilów, monocytów i makrofagów. Jednakże mechanizm działania PVL oraz jej udział w patogenezы zakażeń gronkowcowych są wciąż słabo poznane. W badaniach *in vitro* wykazano zależne od stężenia działanie cytotoksyczne PVL, prowadzące do apoptozy albo do nekrozy fagocytów. Nie ma jednak danych potwierdzających, że zasadniczą funkcją PVL *in vivo* jest liza fagocytów. Zostało natomiast udowodnione, że stężenie PVL *in vivo* nie jest wystarczające do wywołania cytolizy. Co więcej wykazano, że subletyczne stężenie PVL *in vivo* odgrywa głównie rolę aktywatora fagocytów, intensyfikując bakteriobójcze właściwości tych komórek. Najważniejszymi producentami toksyny PVL są izolowane od ludzi szczepy CA-MRSA. Należy jednak podkreślić, iż istnieją, choć nieliczne, dane dotyczące izolacji *pvl*-pozytywnych szczepów MRSA, jak i MSCNS od zwierząt domowych i hodowlanych.

## Piśmiennictwo

1. Aman M.J., Karauzum H., Bowden M.G., Nguyen T.L.: Structural model of the pre-pore ring-like structure of Pantone-Valentine leukocidin: providing dimensionality to biophysical and mutational data. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **28**, 1–12 (2010)
2. Baba Moussa L., Werner S., Colin D.A., Mourey L., Pédelacq J.D., Samama J.P., Sanni A., Monteil H., Prévost G.: Decoupling the Ca(2+)-activation from the pore-forming function of the bi-component Pantone-Valentine leukocidin in human PMNs. *FEBS Lett.* **461**, 280–286 (1999)
3. Badiou C., G. Lina i wsp.: Rapid detection of *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin in clinical specimens by enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic tests. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1384–1390 (2010)
4. Bae I.G., Tonthat G.T., Stryjewski M.E., Rude T.H., Reilly L.F., Barriere S.L., Genter F.C., Corey G.R., Fowler Jr. V.G.: Presence of genes encoding the Pantone-Valentine leukocidin exotoxin is not the primary determinant of outcome in patients with complicated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: results of a multinational trial. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 3952–3957 (2009)
5. Barrio M.B., Rainard P., Prévost G.: LukM/LukF<sup>7</sup>-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. *Microbes Infect.* **8**, 2068–2074 (2006)
6. Bien J., Sokolova O., Bozko P.: Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence

- factors that are implicated in activation of airway epithelial pro-inflammatory response. *J. Pathog.* doi:10.4061/2011/601905 (2011)
7. Blair J.E., Carr M.: Lysogeny in staphylococci. *J. Bacteriol.* **82**, 984–993 (1961)
  8. Bronner S., Stoessel P., Gravet A., Monteil H., Prévost G.: Variable expressions of *Staphylococcus aureus* bicomponent leukotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3931–3938 (2000)
  9. Brown E.L., M.G. Bowden i wsp.: The Pantone-Valentine leukocidin vaccine protects mice against lung and skin infections caused by *Staphylococcus aureus* USA300. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 156–164 (2009)
  10. Bubeck Wardenburg J., Palazzolo-Ballance A.M., Otto M., Schneewind O., DeLeo F.R.: Pantone-Valentine leukocidin is not a virulence determinant in murine models of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease. *J. Infect. Dis.* **198**, 1166–1170 (2008)
  11. Campbell S.J., V.G. Fowler Jr. i wsp.: Genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from a multinational trial of complicated skin and skin structure infections. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 678–684 (2008)
  12. Chambers H.F.: Community-associated MRSA-resistance and virulence coverage. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1485–1487 (2005)
  13. Cheung A.L., Koomey J.M., Butler C.A., Projan S.J., Fischetti V.A.: Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6462–6466 (1992)
  14. Chung W.B., Backstrom L.R., McDonald J., Collins M.T.: The (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) colorimetric assay for the quantitation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* cytotoxin. *Can. J. Vet. Res.* **57**, 159–165 (1993)
  15. DeLeo F.R., Chambers H.F.: Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J. Clin. Invest.* **119**, 2464–2474 (2009)
  16. DeLeo F.R., Otto M., Kreiswirth B.N., Chambers H.F.: Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **375**, 1557–1568 (2010)
  17. Deurenberg R.H., Vink C., Driessen C., Bes M., London N., Etienne J., Stobberingh E.E.: Rapid detection of Pantone-Valentine leukocidin from clinical isolates of *Staphylococcus aureus* strains by real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* **240**, 225–228 (2004)
  18. Diep B.A., Carleton H.A., Chang R.F., Sensabaugh G.F., Perdreau-Remington E.: Roles of 34 virulence genes in the evolution of hospital- and community-associated strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **193**, 1495–1503 (2006)
  19. Diep B.A., H.F. Chambers i wsp.: Contribution of Pantone-Valentine leukocidin in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *PLoS One*, **3**, e3198 (2008)
  20. Dufour P., Gillet Y., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Floret D., Etienne J., Richet H.: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine leukocidin. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 819–824 (2002)
  21. Dumitrescu O., G. Lina i wsp.:  $\beta$ -lactams interfering with PBP1 induce Pantone-Valentine leukocidin expression by triggering *sarA* and *rot* global regulators of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3261–3271 (2011)
  22. El Haddad L., Moineau S.: Characterization of a novel Pantone-Valentine leukocidin-encoding staphylococcal phage and its natural PVL-lacking variant. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 2828–2832 (2013)
  23. Finck-Barbanchon V., Duportail G., Meunier O., Colin D.A.: Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1182**, 275–282 (1993)
  24. Gauduchon V., Werner S., Prévost G., Monteil H., Colin D.A.: Flow cytometric determination of Pantone-Valentine leukocidin S component binding. *Infect. Immunol.* **69**, 2390–2395 (2001)
  25. Genestier A.L., L. Genestier i wsp.: *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **115**, 3117–3127 (2005)
  26. Gillet Y., J. Etienne i wsp.: Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Pantone-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*, **359**, 753–759 (2002)
  27. Graves S.F., Kobayashi S.D., Braughton K.R., Whitney A.R., Sturdevant D.E., Rasmussen D.L., Kirpotina L.N., Quinn M.T., DeLeo F.R.: Sublytic concentrations of *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin alter human PMN gene expression and enhance bactericidal capacity. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 361–374 (2012)
  28. Graves S.F., Kobayashi S.D., DeLeo F.R.: Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* immune evasion and virulence. *J. Mol. Med.* **88**, 109–114 (2010)
  29. Guillet V., Roblin P., Werner S., Coraiola M., Menestrina G., Monteil H., Prévost G., Mourey L.: Crystal structure of leukotoxin S component: new insight into the Staphylococcal beta-barrel pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* **279**, 41028–41037 (2004)
  30. Helbin W.M., Polakowska K., Międzobrodzki J.: Phage-related virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *Post. Mikrobiol.* **51**, 291–298 (2012)
  31. Hermos C.R., Yoong P., Pier G.B.: High levels of antibody to Pantone-Valentine leukocidin are not associated with resistance to *Staphylococcus aureus*-associated skin and soft-tissue infection. *Clin. Infect. Dis.* **51**, 1138–1146 (2010)
  32. Hidron A.I., Low C.E., Honig E.G., Blumberg H.M.: Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 as a cause of necrotising community-onset pneumonia. *Lancet Infect. Dis.* **9**, 384–392 (2009)
  33. Kallen A.J., J. Hageman i wsp.: *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia during the 2006 to 2007 influenza season. *Ann. Emerg. Med.* **53**, 358–365 (2009)
  34. Kaneko J., Kamio Y.: Bacterial two-component and heteroheptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 981–1003 (2004)
  35. Kobayashi S.D., DeLeo F.R.: An update on community-associated MRSA virulence. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 545–551 (2009)
  36. König B., Prévost G., Piémont Y., König W.: Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. *J. Infect. Dis.* **171**, 607–613 (1995)
  37. Labandeira-Rey M., M.G. Bowden i wsp.: *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin causes necrotising pneumonia. *Science*, **315**, 1130–1133 (2007)
  38. Lalani T., V.G. Fowler i wsp.: Associations between the genotypes of *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates and clinical characteristics and outcomes of bacteremic patients. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 2890–2896 (2008)
  39. Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kühnle S., Nicotera P.: Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* **185**, 1481–1486 (1997)
  40. Li Z., Stevens D.L., Hamilton S.M., Parimon T., Ma Y., Kearns A.M., Ellis R.W., Bryant A.E.: Fatal *S. aureus* hemorrhagic pneumonia: genetic analysis of a unique clinical isolate producing both PVL and TSST-1. *PLoS ONE*, **6**, e27246 (2011)
  41. Lina G., Piémont Y., Godail-Gamot F., Bes M., Peter M.O., Gauduchon V., Vandenesch F., Etienne J.: Involvement of Pan-

- ton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **29**, 1128–1132 (1999)
42. Lo W.T., Tang C.S., Chen S.J., Huang C.F., Tseng M.H., Wang C.C.: Pantone-Valentine leukocidin is associated with exacerbated skin manifestations and inflammatory response in children with community-associated staphylococcal scarlet fever. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 69–75 (2009)
  43. Lo W.T., Wang C.C.: Pantone-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr. Neonatol.* **52**, 59–65 (2011)
  44. Loughman J.A., Fritz S.A., Storch G.A., Hunstad D.A.: Virulence gene expression in human community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *J. Infect. Dis.* **199**, 294–301 (2009)
  45. Löffler B., Hussain M., Grundmeier M., Brück M., Holzinger D., Varga G., Roth J., Kahl B.C., Proctor R.A., Peters G.: *Staphylococcus aureus* Pantone-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog.* **6**, e1000715 (2010)
  46. Menestrina G., Serra M.D., Comai M., Coraiola M., Viero G., Werner S., Colin D.A., Monteil H., Prévost G.: Ion channels and bacterial infection: the case of  $\beta$ -barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* **552**, 54–60 (2003)
  47. Menestrina G., Serra M.D., Prévost G.: Mode of action of  $\beta$ -barrel pore-forming toxins of the staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin family. *Toxicon*, **39**, 1661–1672 (2001)
  48. Meunier O., Falkenrodt A., Monteil H., Colin D.A.: Application of flow cytometry in toxinology: pathophysiology of human polymorphonuclear leukocytes damaged by a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*. *Cytometry*, **21**, 241–247 (1995)
  49. Miller L.G., Perdreau-Remington F., Rieg G., Mehdi S., Perloth J., Bayer A.S., Tang A.W., Phung T.O., Spellberg B.: Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1445–1453 (2005)
  50. Pantone P.N., Valentine F.C.O.: Staphylococcal toxin. *Lancet*, **219**, 506–508 (1932)
  51. Pathirage H.: Pantone Valentine Leucocidin (PVL) positive staphylococcal infection: an emerging infection across the world. *Sri Lanka J., Child Health*, **37**, 109–111 (2008)
  52. Pedelacq J.D., Maveyraud L., Prévost G., Baba-Moussa L., Gonzalez A., Courcelle E., Shepard W., Monteil H., Samama J.P., Mourey L.: The structure of a *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins. *Structure*, **7**, 277–287 (1999)
  53. Prévost G., Bouakham T., Piémont Y., Monteil H.: Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*. *FEBS Lett.* **376**, 135–140 (1995)
  54. Queck S.Y., Jameson-Lee M., Villaruz A.E., Bach T.H., Khan B.A., Sturdevant D.E., Ricklefs S.M., Li M., Otto M.: RNA-III-independent target gene control by the *agr* quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Cell*, **32**, 150–158 (2008)
  55. Queck S.Y., Khan B.A., Wang R., Bach T.H., Kretschmer D., Chen L., Kreiswirth B.N., Peschel A., DeLeo F.R., Otto M.: Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. *PLoS Pathog.* **5**, e1000533 (2009)
  56. Rainard P.: *Staphylococcus aureus* leucotoxin LukM/F<sup>+</sup> is secreted and stimulates neutralising antibody response in the course of intramammary infection. *Vet. Res.* **38**, 685–696 (2007)
  57. Rainard P., Corrales J.C., Barrio M.B., Cochard T., Poutrel B.: Leucotoxic activities of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows, ewes, and goats with mastitis: importance of LukM/LukF<sup>+</sup>-PV leucotoxin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 272–277 (2003)
  58. Rankin S., Roberts S., O’Shea K., Maloney D., Lorenzo M., Benson C.E.: Pantone valentine leukocidin (PVL) toxin positive MRSA strains isolated from companion animals. *Vet. Microbiol.* **108**, 145–148 (2005)
  59. Ritz N., Curtis N.: The role of Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* musculoskeletal infections in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **31**, 514–518 (2012)
  60. Spaan A.N., J.A. van Strijp i wsp.: The staphylococcal toxin Pantone-Valentine leukocidin targets human C5a receptors. *Cell Host Microbe*, **13**, 584–594 (2013)
  61. Staali L., Monteil H., Colin D.A.: The staphylococcal pore-forming leukotoxins open Ca<sup>2+</sup> channels in the membrane of human polymorphonuclear neutrophils. *J. Membr. Biol.* **162**, 209–216 (1998)
  62. Szymanek K., Młynarczyk A., Młynarczyk G.: Regulatory systems of gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Post. Mikrobiol.* **48**, 7–22 (2009)
  63. Tristan A., Bes M., Meugnier H., Lina G., Bozdogan B., Courvalin P., Reverdy M.E., Enright M.C., Vandenesch F., Etienne J.: Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 594–600 (2007)
  64. Ünal N., Çinar O.D.: Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Pantone-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Trop. Anim. Health Prod.* **44**, 369–375 (2012)
  65. van de Velde H.: Etude sur le mécanisme de la virulence du *Staphylocoque pyogène*. *La Cellule*, **10**, 401–460 (1894)
  66. Vandenesch F., J. Etienne i wsp.: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantone-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 978–984 (2003)
  67. Varshney A.K., Martinez L.R., Hamilton S.M., Bryant A.E., Levi M.H., Gialanella P., Stevens D.L., Fries B.C.: Augmented production of Pantone-Valentine leukocidin toxin in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is associated with worse outcome in a murine skin infection model. *J. Infect. Dis.* **201**, 92–96 (2010)
  68. Ventura C.L., Malachowa N., Hammer C.H., Nardone G.A., Robinson M.A., Kobayashi S.D., DeLeo F.R.: Identification of a novel *Staphylococcus aureus* two-component leukotoxin using cell surface proteomics. *PLoS ONE*, **5**, e11634 (2010)
  69. Villaruz A.E., Bubeck Wardenburg J., Khan B.A., Whitney A.R., Sturdevant D.E., Gardner D.J., DeLeo F.R., Otto M.: A point mutation in the *agr* locus rather than expression of the Pantone-Valentine leukocidin caused previously reported phenotypes in *Staphylococcus aureus* pneumonia and gene regulation. *J. Infect. Dis.* **200**, 724–734 (2009)
  70. Voyich J.M., F.R. DeLeo i wsp.: Is Pantone-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J. Infect. Dis.* **194**, 1761–1770 (2006)
  71. Wang C.C., Lo W.T., Chu M.L., Siu L.K.: Epidemiological typing of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from children in Taiwan. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 481–487 (2004)
  72. Wiersma P., Tobin D’Angelo M., Daley W.R., Tuttle J., Arnold K.E., Ray S.M., Ladson J.L., Bulens S.N., Drenzek C.L.: Surveillance for severe community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Epidemiol. Infect.* **137**, 1674–1678 (2009)
  73. Wirtz C., Witte W., Wolz C., Goerke C.: Insertion of host DNA into PVL-encoding phages of the *Staphylococcus aureus* lineage ST80 by intra-chromosomal recombination. *Virology*, **406**, 322–327 (2010)

Edyta Abramczuk<sup>1\*</sup>, Katarzyna Pancer<sup>1</sup>, Włodzimierz Gut<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 czerwcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Epidemiologia zakażeń HBoV. 3. Charakterystyka bokawirusów człowieka. 4. Mechanizmy umożliwiające przetrwanie genomu HBoV w zakażonej komórce. 5. Odpowiedź immunologiczna na zakażenie HBoV. 6. Laboratoryjna diagnostyka zakażeń bokawirusami. 7. Bokawirusy a zakażenia mieszane. 8. Podsumowanie

#### Human bocavirus – characteristics, pathogenicity, occurrence

**Abstract:** In this article, the characteristics of *human Bocaviruses* (HBoV) are presented. The viruses were described for the first time in 2005. The symptoms of HBoV infection are: cough, coryza, sore throat, breathing difficulty, but also nausea, vomiting and diarrhea. Four types of *Bocaviruses* are associated with human respiratory and gastrointestinal tract infections. HBoV1 is the main etiologic agent of respiratory tract infections, whereas HBoV2 causes gastrointestinal diseases. *Bocaviruses* can cause mild, asymptomatic infections as well as severe respiratory diseases, like pneumonia and bronchiolitis. HBoV2 is the third agent, after *Rotaviruses* and *Astroviruses*, which causes acute gastroenteritis in children. The treatment of HBoV infections is usually symptomatic. The HBoV diagnosis is mainly based on molecular techniques, such as quantitative PCR, serological tests are only used for epidemiological purposes. Infections due to HBoV occur during the whole human life, but they are most frequent in children from 6 month- to 3 year-old. HBoV infections are common all over the world and, when detected, in Poland too. Infections occur throughout the year, but are most common in the winter season.

The high rate of co-detection of HBoV with other viruses has been reported (82% samples). HBoV2 is the most frequently identified virus in co-infections with *Noroviruses*, *Rotaviruses* and *Astroviruses*, while HBoV1 – with RSV and HMPV.

1. Introduction. 2. Epidemiology of HBoV infections. 3. Characteristics of human bocavirus. 4. Mechanisms allowing survival of the genome HBoV in the infected cell. 5. The immune response to infection of HBoV. 6. Laboratory diagnostic HBoV infections. 7. Bocaviruses and co-infections. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** bokawirusy, koinfekcje, zakażenie przetrwałe

**Key words:** *Bocaviruses*, co-infections, persistent infection

## 1. Wstęp

W ostatnich latach opisano szereg nowych czynników wirusowych zakażeń dróg oddechowych. Jednym spośród nich jest bokawirus człowieka (*Human Bocavirus*, HBoV). Został on odkryty w 2005 r. w ramach projektu poszukiwania nowych czynników wywołujących zakażenia dróg oddechowych u dzieci. Narzędziem umożliwiającym jego wykrycie było zastosowanie metody nieswoistych starterów, tzw. Random PCR. Sekwencje uzyskanych produktów amplifikacji porównywano do znanych sekwencji bakteryjnych i wirusowych patogenów stwierdzając wysoki stopień ich podobieństwa do sekwencji genomu dwóch wirusów: *Bovine Parvovirus* (wirus bydła, BPV) i *Canine Minute Virus* (wirus psów, MVC) należących do rodziny *Parvoviridae* [5]. Ze względu na podobieństwa genetyczne oraz strukturalne, nazwę nowo odkrytego wirusa wyprowadzono od pierwszych członów obu wirusów [2]. Obecnie HBoV uznawany jest za jeden z ważniejszych

czynników wirusowych zakażeń układu oddechowego u dzieci poniżej 5 roku życia. Obecnie opisano 4 typy HBoV: 1, 2, 3 i 4 [9].

## 2. Epidemiologia zakażeń HBoV

### Występowanie zakażeń HBoV

Począwszy od 2005 r. na całym świecie poszukuje się zakażeń bokawirusami. Wykryto je m.in. w Australii, Północnej Ameryce, Europie (w tym w Polsce), Azji i Afryce [42, 35]. Sezonowość występowania HBoV różni się w zależności od regionu geograficznego. We Francji, Niemczech, Szwecji, USA oraz Polsce [29] zakażenia HBoV najczęściej stwierdza się w miesiącach zimowych oraz wczesną wiosną [9]. Natomiast w Japonii i Korei – późną wiosną i początkiem lata (Tab. I). Rozpowszechnienie poszczególnych genotypów HBoV na świecie jest podobne, a ze względu na częste rekombinacje pomiędzy nimi, możliwe jest pojawienie się kolejnego typu [25, 35].

\* 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

Zakażenia bokawirusami stanowią do 33% wirusowych zakażeń układu oddechowego [16, 25]. Różnice w obserwowanej częstości zakażeń mogą wynikać z charakterystyki badanych grup pacjentów: wieku oraz ciężkości zakażenia. Większość przedstawianych badań dotyczy dzieci poniżej 5 r.ż. Informacje odnośnie zakażeń HBoV w innych grupach wiekowych są nieliczne a ponadto zakażenia te najczęściej wykrywano u osób hospitalizowanych. Obecnie zakażeń tych poszukuje się także u chorych leczonych ambulatoryjnie lub w domu [15].

Niektórzy autorzy wskazują, że częstość zakażeń dróg oddechowych wywołanych przez HBoV wśród chorych nie wymagających hospitalizacji jest wyższa niż wśród pacjentów hospitalizowanych [15, 28]. Najwyższy (dotychczas) odsetek chorych z zakażeniem HBoV1 stwierdzono w USA wśród najmłodszych dzieci (0–2 lata) uczęszczających do żłobka (33%). Wyniki naszego zespołu zdają się potwierdzać tezę o udziale HBoV1 przede wszystkim w zakażeniach o lżejszym przebiegu – stwierdzono bowiem znamieny związek HBoV1 z zapaleniem oskrzeli lub zachorowaniem grypopodobnym, a nie z zapaleniem płuc lub oskrzelików [29]. Jednak wśród dzieci hospitalizowanych, szczególnie z powodu ostrego zakażenia dolnych dróg oddechowych (bronchiolitis, zapalenie płuc), częstość zakażeń HBoV1 może być wysoka. W Arabii Saudyjskiej w okresie I–IV 2012 r. udział HBoV1 w tych zakażeniach sięgał 22,5% a w Argentynie w latach 2007–2009 wyniósł 21,5% [1].

Większość prac badawczych wskazuje na spadek częstości zakażeń HBoV1 wraz z wiekiem pacjentów [4, 26]. Jednakże w Argentynie, w 2010 r. podczas badania osób dorosłych hospitalizowanych z powodu ciężkich zakażeń dolnych dróg oddechowych, aż u 22,7% pacjentów potwierdzono zakażenie bokawirusami, czyli porównywalnie do częstości obserwowanych u dzieci (21,5%).

Analiza rozkładu płci wśród chorujących wskazuje na nieznamienne wyższą częstość zakażeń bokawirusami u chłopców. Może wiązać się to z faktem, że podobnie jak w zakażeniach wywołanych przez RSV, chłopcy częściej wymagają hospitalizacji [6].

Bokawirusy mogą być czynnikiem etiologicznym zarówno zakażeń dróg oddechowych, jak też układu pokarmowego. W zakażeniach układu pokarmowego stwierdza się obecność DNA wszystkich typów HBoV, jednak najczęściej wykrywane jest DNA HBoV2 (21%). Stwierdzona w niektórych badaniach wysoka częstość wykrywania w kale HBoV1 w przypadkach z objawami ze strony układu pokarmowego (nawet 17%) może wynikać z rozszerzenia się zakażenia dróg oddechowych na drogi pokarmowe. Natomiast HBoV typu 3 i 4 wykrywane są wyłącznie w zakażeniach dróg pokarmowych i występują znacznie rzadziej niż HBoV 2 i 1 [18].

## Transmisja

DNA bokawirusów wykrywano w wydzielinach dróg oddechowych, w moczu i w kale. W związku z tym uważa się, że do zakażenia tymi wirusami może dojść przez bezpośredni kontakt z chorą osobą, drogą kropelkową jak również przez styczność ze skażonymi wirusem powierzchniami [15, 37]. W odróżnieniu od spokrewnionych wirusów BPV i MVC powodujących zakażenia ogólnoustrojowe i wewnątrzmaciczne, badania płynu owodniowego zakażonych HBoV kobiet ciężarnych nie potwierdziły obecności w nim wirusa [2].

## Chorobotwórczość

Bokawirus człowieka opisany został po raz pierwszy w 2005 r., i przez wiele lat część badaczy zastanawiała się, czy jest on dla człowieka czynnikiem chorobotwórczym czy tylko przypadkowym „Pasażerem” [37]. Nie stwierdzano istotnych różnic w koncentracji wirusa lub ekspresji białek pomiędzy ciężkimi zakażeniami dolnych i lekkimi zakażeniami górnych dróg oddechowych [37]. Szczególne wątpliwości budził fakt, że w przypadku koinfekcji z innymi wirusami, koncentracja bokawirusa w badanym materiale była wyższa niż w przypadku zakażeń wywołanych jedynie przez HBoV [5]. Wykrycie materiału genetycznego HBoV1 u dzieci z objawami zakażeń dróg oddechowych, u których nie udało się znaleźć innego czynnika zakaźnego potwierdza, że ludzki bokawirus, po parwowirusie B19 oraz parwowirusie 4, może być uznany jako kolejny członek rodziny *Parvoviridae* patogenny dla człowieka [2, 5]. Doniesienia wskazujące na udział białka NP1 HBoV1 w apoptozie komórki sugerują potencjalnie patogenny charakter tego wirusa.

## Objawy

W przypadku zakażeń oddechowych, w zależności od typu HBoV, obserwuje się zróżnicowany przebieg choroby poczynając od bezobjawowego przez łagodne aż do ciężkich objawów ze strony układu oddechowego [15, 25]. Zakażenia układu oddechowego najczęściej wywoływane są przez HBoV1, sporadycznie HBoV2. Objawy zakażenia HBoV1 są podobne do obserwowanych w innych zakażeniach oddechowych zarówno wirusowych jak i bakteryjnych. Najczęściej towarzyszą im: kaszel, katar, gorączka, ból gardła, trudności w oddychaniu, zapalenie spojówek, rumień, wysypka, a także nudności, wymioty lub biegunka. HBoV1 mogą również być przyczyną chorób o znacznie cięższym przebiegu, takich jak: zapalenie płuc, oskrzelików, oskrzeli oraz krupę wirusowego [6, 15, 37]. U dzieci poniżej 2 r.ż. szczególnego znaczenia nabiera różnicowanie zakażeń HBoV i RSV (*Respiratory Syncytial Virus*) z powodu możliwości wystąpienia powikłań po zakażeniach RSV. W naszej części świata, infekcje HBoV i RSV często występują w podobnym sezonie

– jesienno-zimowym (Tab. I). Według niektórych, cechą różniącą może być krótszy okres inkubacji zakażenia wywołanego przez bokawirusy, który wynosi 3–4 vs. 4–5 dni dla RSV. Inni autorzy wskazują, iż jedynym objawem klinicznym odróżniającym te zakażenia jest znacznie częstsze występowanie w czasie infekcji HBoV niedotlenienia oraz neutrofilii [41].

Główną przyczyną zakażeń pokarmowych są bokawirusy typu 2, typu 3 i typu 4 [15, 22, 25]. Za istotny czynnik etiologiczny chorób układu pokarmowego uznawany jest HBoV2 [10, 15, 17, 18], ponieważ jak wskazują niektórzy autorzy, HBoV2 jest trzecim, po rotawirusach i astrowirusach, wirusem wywołujących ostre zapalenie żołądka i jelit u dzieci [3] (Tab. I).

Podobnie jak w przypadku innych patogenów, znacznie częściej zakażenia bokawirusami występują u osób przewlekle chorych, u wcześniaków, dzieci, których matki paliły papierosy w okresie ciąży, osób z predyspozycją do astmy, poddanych leczeniu immunosupresyjnemu (np. osób po przeszczepie), dzieci przebywających w żłobkach, przedszkolach. Mimo, iż zakażenia obserwowane są głównie u małych dzieci, to materiał genetyczny HBoV2 wykrywany był również u osób dorosłych, w tym u pacjentów w wieku powyżej 65 lat [21].

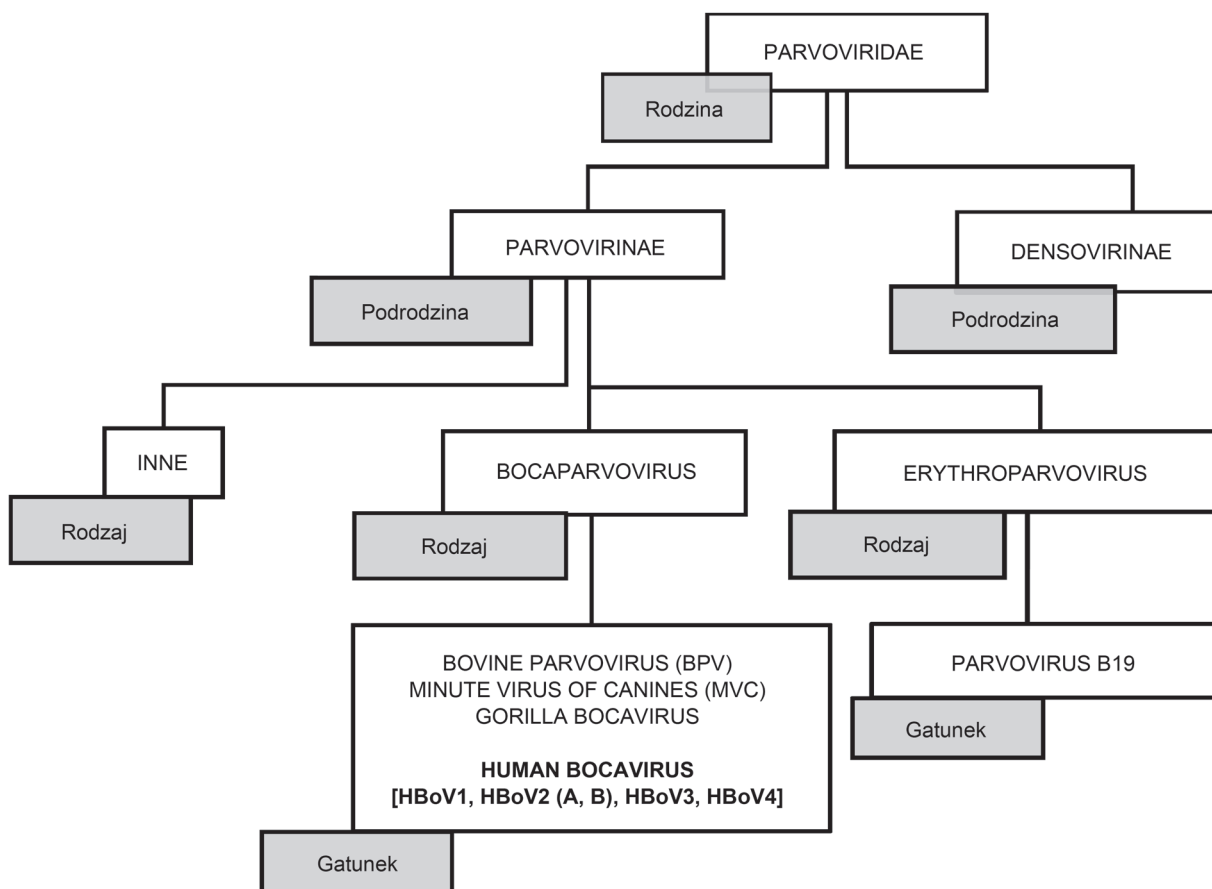
Stwierdzono, że u osób z obniżoną odpornością zakażenia HBoV często przekształcają się w formę przetrwałego zakażenia [25, 35]. Uważa się, że takie

Tabela I  
Wybrane badania występowania HBoV w zakażeniach dróg oddechowych i pokarmowych

| Kraj/lata badań [Ref]         | Liczba badanych/wiek | HBoV N+/% | Koinfekcje %/ z jakimi wirusami | Genotyp HBoV  | Sezon zakażeń            | Objawy   |
|-------------------------------|----------------------|-----------|---------------------------------|---|--------------------------|--|
| Holandia 2005–2006 [27]       | 257/śr. 1,6 lat      | 4/1,5     | 75/AdV, RSV, HMPV               | HBoV  | XI–I                     | gorączka, katar, kaszel, duszność, wysypka                                     |
| Francja 2003–2004 [9]         | 589/śr. 1,3 lat      | 26/4,4    | 35/RSV, HMPV, AdV               | HBoV  | XII–VI                   | duszność, niewydolność krążenia, kaszel, gorączka, zapalenie oskrzelików       |
| Chiny 2005–2006 [32]          | 252/2–36 m-cy        | 21/8,3    | 9,5/HCoV-229E                   | HBoV  | XI–IV                    | kaszel, gorączka, świszczący oddech, wymioty                                   |
| Hiszpania 2006–2008 [28]      | 1189/śr. 2 lata      | 177/12,6  | 81/RSV, IFV, HMPV               | HBoV  | XI–II                    | zakażenie dolnych i górnych dróg oddechowych                                   |
| Japonia 2007–2009 [24]        | 402/śr. 14 m-cy      | 34/8,5    | 41/ PIV, HRV, HMPV, AdV, RSV    | HBoV  | III–IX                   | kaszel, gorączka (>38,9°C), świszczący oddech, biegunka, hipoksja              |
| Polska 2009–2011 [29]         | 257/<5 lat           | 13/6      | 3,1/RSV, CMV, EV                | HBoV  | I–II                     | ostre zakażenia górnych dróg oddechowych, bronchitis, pneumonia, bronchiolitis |
| Arabia Saudyjska I–V.2012 [1] | 80/5 m–10 lat        | 18/22,5   | 94/ RSV, IFV, AdV               | HBoV1   | bd                       | ostre zakażenia górnych dróg oddechowych, grypodobne, biegunka                 |
| Chile 1985–2010 [22]          | 462/<5 lat           | 89/19,3   | bd                              | HBoV1 (14,1%)<br>HBoV2 (3,9%)<br>HBoV3(1,3%)<br>HBoV4 (0) | bd                       | ostre zapalenie żołądka i jelit  |
| USA 2007–2008 [4]             | 151/<18 lat          | 5/3,3     | bd                              | HBoV1–(3,3%)<br>HBoV2–(0,7%)<br>HBoV3–0                   | XII–II                   | biegunka, ból brzucha, kaszel  |
|                               | 328/>18 lat          | 10/3      | bd                              | HBoV1–(1,5%)<br>HBoV2–(1,5%)<br>HBoV3–(0)                 | XII–II                   | biegunka, ból brzucha, kaszel  |
| Niemcy [39]                   | 835/śr. 1,8 lat      | 87/10,3   | 39,1/ RSV, IFV t. A, AdV        | HBoV  | cały rok, najwięcej zimą | ostre zakażenia górnych i dolnych dróg oddechowych                             |
| Szwecja 2003–2004 [2]         | 540/małe dzieci      | 17/3,1    | 82/IFV t. A, RSV                | HBoV  | cały rok, najwięcej zimą | ostre zakażenia dolnych dróg oddechowych                                       |
| Szwajcaria [33]               | 112/<3 m-ce          | 5/4,5     | 80/bd                           | HBoV  | bd                       | zakażenia dróg oddechowych   |
| Wlk. Brytania 2005–2006 [26]  | 574/6–24 m-ce        | 47/8,2    | 43/ RSV, AdV                    | HBoV  | XII–I                    | ostre zakażenia dolnych dróg oddechowych                                       |

N + – liczba pacjentów, u których stwierdzono zakażenie HBoV; bd – brak danych; śr. – średni wiek; AdV – adenowirusy; RSV – Respiratory Syncytial virus; HCoV – koronawirusy; CMV – cytomegalowirus; HMPV – metapneumowirus człowieka; IFV – wirus grypy; EV – enterowirusy





Rys. 1. Schemat taksonomii bokawirusów (opracowanie własne)

przetrwale zakażenie może mieć wpływ na zaostrenie chorób podstawowych.

Leczenie w przypadku zakażeń HBoV jest zwykle objawowe. Nie znana jest skuteczność leków antywirusowych, nie stwierdzono także efektu terapeutycznego w wyniku podawania kortykosteroidów [25, 35].

### 3. Charakterystyka bokawirusów człowieka

#### Systematyka

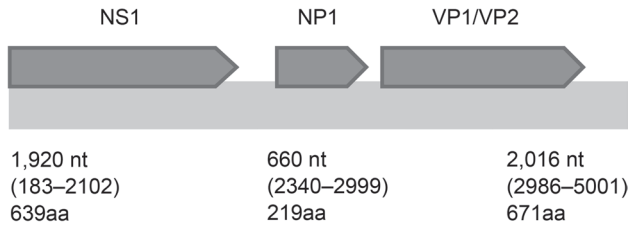
Do rodziny *Parvoviridae* zaliczane są wirusy chorobotwórcze dla bezkręgowców (podrodzina *Densovirinae*) oraz kręgowców (podrodzina *Parvovirinae*). W obrębie podrodziny *Parvovirinae* wyróżniono 8 rodzajów: *Amdoparvovirus*, *Aveparvovirus*, *Copiparvovirus*, *Bocaparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Protoparvovirus*, *Tetraparvovirus* oraz *Erythroparvovirus*. Wykryte do tej pory wirusy chorobotwórcze dla człowieka zakwalifikowane są do dwóch rodzajów: *Erythroparvovirus* – parwovirus B19 oraz *Bocaparvovirus*, które zostały wyodrębnione w latach 2009–2010 – HBoV1, HBoV2, HBoV3 i HBoV4. W obrębie HBoV2 wydzielono również dwa warianty: A i B. Do rodzaju *Bocaparvovirus* należy również wirus zakażający bydło – *Bovin Parvovirus* (BPV), wirusy patogenne

dla psów – *Canine Minute Virus* (MVC) oraz mały – *Gorilla Bocavirus* (Rys. 1) [12, 15]. Wirusy o wysokim stopniu podobieństwa do HBoV wykryto u goryli i świń. Wskazuje to na prawdopodobne odzwiercące pochodzenie wirusów zakażających człowieka. Mimo to, przypuszcza się, że rezerwuarem HBoV może być tylko człowiek [7, 20].

#### Struktura

Parwovirusy są to najmniejsze znane wirusy DNA – *parvus* oznacza mały. Kapsyd tych wirusów jest dwudziestościanem zbudowanym z 12 pentamerycznych kapsomerów czyli łącznie 60 podjednostek zbudowanych z różnych białek (VP1-VP6), ma wielkość 20 nm i jest pozbawiony osłonki. Genom wirusa stanowi jednoniciowe DNA o wielkości 5,217–5,299 nukleotydów zawierające powtórzone sekwencje terminalne o długości 32–52 pz.

Organizacja genomu HBoV przypomina budowę genomu wirusów BPV i MVC (Rys. 2). Podobnie jak u wszystkich wirusów należących do podrodziny *Parvovirinae*, w genomie wyróżnia się 2 otwarte ramki odczytu (Open Reading Frame-ORF) kodujące odpowiednio: niestrukturalne białko NS1 (na końcu 5') oraz białka kapsydu VP1 i VP2 (na końcu 3') [25]. Najmniejszą podjednostką kapsydu jest VP1, które prawdopodobnie



Rys. 2. Schemat organizacji genomu bokawirusów (opracowanie własne)

odgrywa istotną rolę w tropizmie tkankowym oraz w patogenezie [20]. Koniec N<sup>o</sup> białka VP1 zawiera fragment fosfolipazy A2 (PLA2), która jest niezbędna w procesie zakażenia [5, 10]. W przypadku HBoV sekwencja tego regionu jest w 43% identyczna z sekwencją występującą w genomie MVC oraz w 42% z sekwencją BPV. Uważa się, że białko NS-1, które bierze udział w transkrypcji i ulega ekspresji podczas replikacji może stanowić istotny wskaźnik zakażenia bokawirusami. Cechą charakterystyczną dla bokawirusów człowieka jest dodatkowa, trzecia, otwarta ramka odczytu (tzw. mid-ORF). Fragment ten koduje niestrukturalne białko NP-1 o wielkości 26 kDa, wykazujące 47% homologii sekwencji aminokwasowej z białkiem NP-1 wirusów MVC i BPV. Dla wirusów z rodzaju *Bocaparvovirus* region ten jest wyjątkowo konserwatywny [25]. Funkcja białka NP-1 nie została jeszcze w pełni poznana, niektóre badania sugerują udział białka NP-1 HBoV1 w wieloetapowym procesie apoptozy [38].

Wszystkie geny bokawirusów przepisywane są z jednego promotora, zlokalizowanego w pobliżu końca 5' genomu. Sekwencja terminalna, która odgrywa bardzo ważną rolę w procesie inicjacji replikacji, wykazuje istotną homologię do odpowiedników u wirusów MVC i BPV [23]. Spośród wszystkich parwowirusów sekwencje tworzące otwarte ramki odczytu u bokawirusów zajmują największą powierzchnię genomu.

Rozwój metod biologii molekularnej umożliwił poznanie różnic w sekwencji otwartych ramek odczytu poszczególnych typów bokawirusów [21]. Uznaje się, że różnice powyżej 8% w sekwencji białkowej i powyżej 10% w sekwencji nukleotydowej białka VP1 są wystarczające do wyodrębnienia nowego gatunku. Z kolei różnice powyżej 1,5% i 5% odpowiednio w sekwencji białkowej i nukleotydowej tego samego genu mogą pozwolić na wyróżnienie nowego genotypu. W latach 2009–2010 w obrębie HBoV wyodrębniono genotypy: HBoV1, HBoV2 (warianty A i B), HBoV3 i HBoV4 [19]. Uważa się, że pierwotnie występowały enteropatogenne bokawirusy HBoV2 i 4, następnie wyewoluował HBoV1, natomiast najmłodszy HBoV3 powstał na drodze rekombinacji HBoV1 i HBoV4 [25]. Organizacja genomu HBoV2 i HBoV3 jest identyczna jak w przypadku HBoV1, jednak sekwencje kodujące białka NS1, NP1 oraz VP wykazują pewną zmienność

i są one homologiczne odpowiednio w 80%, 90% oraz 70% dla HBoV2 oraz 80%, 80% oraz 80% – dla HBoV3. Analiza sekwencji białka VP2 poszczególnych genotypów HBoV wykazała wysoki stopień podobieństwa pomiędzy nimi [10].

### Replikacja

Uważa się, że replikacja HBoV zachodzi, podobnie jak w przypadku innych parwowirusów, poprzez mechanizm „toczącego się koła” [25]. Pierwszy etap replikacji parwowirusów – wytworzenie pośredniej dwuliniowej nici DNA zachodzi z wykorzystaniem białek gospodarza. Charakterystyczna dla parwowirusów grupa 3'OH na końcu sekwencji palindromowej wykorzystywana jest przez wirusy jako starter w procesie ich replikacji. W wyniku tej reakcji powstaje dwuniciowa forma DNA zakończona strukturą szpilki do włosów. Struktura ta jest konieczna do dalszej transkrypcji, w tym niezbędnego do dalszych etapów replikacji białka NS-1. Białko to, przyłączając się w miejscu „Ori” w genomie parwowirusów przecina nic w miejscu pierwotnie występujących sekwencji palindromowych, odtwarzając strukturę jednoliniową DNA. W efekcie, sekwencja tworząca strukturę spinki do włosów zostaje przeniesiona z nici rodzicielskiej na nic potomną. Razem z 18–26 nukleotydową sekwencją białko NS1 zostaje kowalencyjnie przyłączone do wolnego końca 5' nici [25, 30, 35]. W badaniach wykorzystujących plazmid zawierający genom HBoV wykazano, że podczas zakażenia ekspresji ulegają dwa typy białka NS1. Pierwsze, o długości 639 aa jest znacznie krótsze od białka NS1 występującego u BPV i MVC i nie wykazuje z nimi homologii na końcu C'. Drugie, większe białko NS1 (długość 781aa) jest homologiczne do końca C' białka NS1 występującego u MVC i BPV. Sekwencja C-terminalna białka NS-1 jest fragmentem konserwatywnym, występującym u wszystkich genotypów bokawirusów [34].

### 4. Mechanizmy umożliwiające przetrwanie genomu HBoV w zakażonej komórce

Jednym z rozważanych mechanizmów może być powstawanie episomalnych form genomu. Istnieje sugestia, że forma episomalna może być latentną formą zakażenia, która w momencie koinfekcji innym wirusem ulega reaktywacji [2]. Początkowo formę tę zidentyfikowano jedynie u HBoV1, jednak dalsze badania wykazały, że występuje ona również u pacjentów zakażonych HBoV3 [19]. Istnienie takiej formy genomu wirusa może tłumaczyć fakt wykrywania przez dłuższy okres (od 3 tygodni do 6 miesięcy) materiału genetycznego bokawirusów u osób bez objawów zakażenia, zarówno w materiale z dróg oddechowych

(HBoV1), jak i w próbkach kału (HBoV1-3) [15, 19, 33]. Zarówno forma episomalna, jak i liniowy kwas nukleinowy HBoV zostały wykryte w tkankach nowotworowych, w tym u osób z nowotworem płuc i jelita grubego. Wysłunięto hipotezę, że HBoV, podobnie jak wirus zapalenia wątroby typu B (HBV), może przebywać w formie episomalnej w tkankach organizmu ludzkiego i prowadzić do ich uszkodzenia [36].

Niektórzy autorzy wysuwają tezę, że sposób replikacji HBoV genotypu 1 różni się od mechanizmu replikacji innych parwowirusów [26]. Być może dalsze badania nad cyklem replikacji pozwolą zrozumieć mechanizm patogenności tych wirusów i zróżnicowania miejsca docelowego. Mimo, iż parwowirus B19 oraz bokawirusy są patogenami należącymi do jednej rodziny, występują między nimi istotne różnice. Parwowirus B19 wykazuje tropizm do szpiku kostnego i mięśnia sercowego u ludzi. Natomiast bokawirusy zaliczane do genotypu 1 wykazują tropizm do układu oddechowego człowieka i wykrywano je głównie w nabłonku dróg oddechowych. Podczas zakażenia HBoV1 dochodzi prawdopodobnie do wirerii i możliwe jest wykrycie DNA tego wirusa we krwi. Do tej pory nie wyjaśniono, czy wykrycie w 2012 r. DNA HBoV1 w płynie mózgowo-rdzeniowym u dziecka z zapaleniem mózgu było wynikiem wirerii czy też innych mechanizmów [23]. W badaniach *in vitro* obserwowano namnażanie się HBoV1 poza nabłonkiem dróg oddechowych – w nabłonku jelit oraz w tkankach limfatycznych [5], a obecność tych wirusów stwierdzano (z częstością 1,5–19%) także w próbkach kału pobranego od ludzi, zarówno w Australii, Ameryce Północnej, Azji, Europie jak i w Afryce [21].

Wirusy HBoV należące do genotypów 2,3 i 4 wykrywano przede wszystkim w próbkach kału pobranych od osób chorych z objawami zakażeniem układu pokarmowego, co może wskazywać, że te wirusy mogą replikować się w układzie pokarmowym [10, 17, 15]. W przeciwieństwie do HBoV1, dotychczas nie wykryto materiału genetycznego wirusów HBoV 2–4 w próbkach krwi [35]. W 2009 r. z próbki kału pobranej od dziecka z ostrym porażeniem wiotkim (AFP) wyizolowano wirusa, który wykazywał wysokie podobieństwo do HBoV2 [17]. Częstość występowania HBoV2 u dzieci z porażeniem wiotkim wynosi ok. 5% i jest zbliżona do częstości wykrywania HBoV2 u dzieci zdrowych, co wskazuje na brak związku tego wirusa z AFP [17].

## 5. Odpowiedź immunologiczna na zakażenie HBoV

Zakażenia bokawirusami człowieka obserwowane są głównie u dzieci między 6 miesiącem a 3 rokiem życia. Niewielka liczba tych zakażeń u dzieci <6 mie-

siąca życia tłumaczona jest ochronną rolą przeciwciał biernie otrzymanych od matki. Występujące u noworodków zakażenia bokawirusami najprawdopodobniej są wynikiem infekcji przebytej w czasie życia płodowego, najczęściej w trzecim trymestrze ciąży [10, 16, 37]. Z kolei Jartii i wsp. [15] twierdzą, że matczyne przeciwciała przeciwko HBoV najlepiej chronią dzieci jedynie do 2 miesiąca życia i po tym okresie ich poziom się obniża. Wraz ze spadkiem matczynych przeciwciał rośnie u dzieci liczba zakażeń, co powoduje u nich wzrost poziomu przeciwciał osiągając najwyższe miana ok. 6–7 roku życia. Ogólnie uważa się, że większość dzieci do 5 roku życia, oraz prawie 100% osób dorosłych, posiada przeciwciała przeciwko HBoV.

W badaniach *in vitro* wykazano, że zakażenie HBoV1 wywołuje typową, również dla innych wirusów, odpowiedź immunologiczną. W przypadku HBoV1 wykazano, że większość przeciwciał skierowanych jest przeciwko obu białkom kapsydu (VP1/VP2) [10, 25, 15]. Stwierdzono również, że w przeciwieństwie do parwowirusa B19 u bokawirusów białko VP2 posiada wyższą immunoreaktywność niż VP1, co może wynikać z różnicy w lokalizacji białek VP1 i VP2 w kapsydie obu wirusów [16]. Na podstawie częstości wykrywania u pacjentów przeciwciał dla poszczególnych typów HBoV można stwierdzić, iż najczęściej występują zakażenia HBoV1, a rzadziej HBoV2, HBoV3 i HBoV4 [34]. U osób zakażonych bokawirusami oprócz syntezy swoistych przeciwciał obserwuje się również wzrost poziomu IL-3, interferonu-gamma, IL-10 oraz TNF-alfa [15].

## 6. Laboratoryjna diagnostyka zakażeń bokawirusami

Do 2009 roku diagnostyka zakażeń bokawirusem oparta była przede wszystkim o molekularne badania próbek klinicznych. Udaną próbę namnażania bokawirusa podjęli Dijkman i wsp. tworząc w 2009 r. sztuczną linię komórkową, która morfologicznie i funkcjonalnie odpowiada ludzkiej tkance dróg oddechowych (modyfikacja linii KTEpC) [8].

Potwierdzeniem replikacji wirusów był wzrost liczby kopii DNA HBoV w zawiesinie określony techniką ilościowego PCR. Autorzy wykazali także, że uzyskana hodowla może posłużyć do namnażania i charakteryzowania nowych wirusów zakażających układ oddechowy. W 2012 roku Huang i wsp. [11] wykazali, że konstrukt zawierający DNA HBoV1 namnaża się w ludzkich komórkach embrionalnych nerki (HEK293).

Ze względu na trudności związane z namnażaniem się bokawirusów w hodowlach komórkowych w diagnostyce tych zakażeń nie stosuje się metody izolacji wirusa. Dostyc krótki okres wylegania powoduje, że w momencie wystąpienia objawów chorobowych nie

stwierdza się odpowiedzi humoralnej. Tym samym metodą z wyboru są ilościowe techniki wykrywania genomu HBoV. Dotychczas stosowane techniki molekularne wykorzystywały fragmenty genomu kodujące białka NP1, NS1, VP1 oraz VP2 [42]. Najbardziej konserwatywnym fragmentem w genomie bokawirusów jest fragment kodujący niestrukturalne białko NP-1 i wykrycie tego genu, jak również genu białka NS-1 stanowią podstawową metodę diagnozowania zakażeń HBoV. W związku z możliwością przetrwania w zakażonych komórkach formy episomalnej DNA wirusa uważa się, że należy stosować techniki PCR umożliwiające określenie liczby kopii genomu wirusa. Za graniczne, diagnostyczne dla zakażeń dróg oddechowych wywołanych przez HBoV1, uważa się wykrycie w 1 ml badanej próbki  $> 10^4$  kopii DNA (gc) [15, 16].

Próbki kliniczne najbardziej przydatne w badaniach molekularnych stanowią wymazy z nosogardzieli, ślina, surowica, mocz oraz kał [15, 31, 42].

Potwierdzeniem przebiecia zakażenia bokawirusami może być wykazanie w surowicy obecności przeciwciał w klasie IgM lub znaczącego przyrostu przeciwciał w klasie IgG [32]. Ze względu na obecność przeciwciał matczynych, jak również niedojrzałość układu immunologicznego we wczesnym okresie życia, kiedy najczęściej dochodzi do pierwotnego zakażenia HBoV, badania serologiczne nie są wykorzystywane w diagnostyce tych zakażeń. Ponadto krótki okres wylegania tej choroby powoduje, że wynik oznaczeń serologicznych wskazujących na infekcję HBoV uzyskuje się w okresie dość odległym od momentu zakażenia. Z tej przyczyny badania te przydatne są przede wszystkim dla celów epidemiologii. W czasie wzmacniania odpowiedzi humoralnej należy także uwzględnić fakt występowania reakcji krzyżowych pomiędzy przeciwciałami skierowanymi przeciwko białkom kapsydu różnych typów HBoV. Metodą pozwalającą na odróżnienie wczesnego zakażenia HBoV od reinfekcji jest poszukiwanie przeciwciał przeciwko białkom strukturalnych VP1 i VP2 wirusów techniką Western blot immunofluorescencji lub ELISA.

## 7. Bokawirusy a zakażenia mieszane

Bokawirusy człowieka bardzo często występują w zakażeniach mieszanych z innymi wirusami. Zjawisko to dotyczy do 82% zakażeń oddechowych oraz do 100% zakażeń pokarmowych (Tab. I) [2]. Wykazano również, iż poziom wirerii bokawirusami jest niższy w przypadku zakażeń mieszanych [43]. W zakażeniach pokarmowych często obserwuje się koinfekcje HBoV z norowirusami, rotawirusami, astrowirusami. W zakażeniach dróg oddechowych najczęściej są to współzakażenia z RSV, wirusami grypy, HMPV

(*Human Metapneumovirus*), RV (*Rhinovirus*) [25, 43]. W badaniach naszego zespołu stwierdzono 80% odsetek koinfekcji bokawirusa z innymi patogenami. Były to współzakażenia HBoV z RSV, EV (*Enterovirus*) i wirusem cytomegalii [29]. Ze względu na występowanie w podobnym okresie sezonowego wzrostu zachorowań dróg oddechowych wywołanych przez HBoV1 oraz RSV, opisywany udział współzakażeń HBoV1 z RSV jest często bardzo wysoki i wynosi nawet  $> 50\%$ . Może to mieć szczególne znaczenie dla dzieci poniżej drugiego roku życia, u których zakażenia RSV mają charakter ciężkich zakażeń dolnych dróg oddechowych, a zakażenie HBoV1 może pogorszyć rokowania dla pacjenta.

W dalszym ciągu trwają jednak dyskusje, czy tak wysoki udział HBoV w zakażeniach mieszanych jest wynikiem pokrywania się aktywności poszczególnych wirusów w tych samych porach roku i wynikających z tego nadkażeń, czy też wykrywania zakażeń bezobjawowych lub reaktywacji HBoV. Określana w różnych badaniach częstość występowania HBoV w asymptomatycznych zakażeniach różni się znacznie i wynosi od 0 do 40%.

## 8. Podsumowanie

Bokawirusy człowieka, po raz pierwszy opisane 10 lat temu, wywołują zakażenia, których głównymi objawami są kaszel, katar, ból gardła, trudności w oddychaniu, ale także nudności, wymioty i biegunka. Objawy takie są niespecyficzne i mogą być powodowane przez wiele innych patogenów np. koronawirusy, enterowirusy. Bokawirusy mogą także powodować zachorowania o ciężkim przebiegu np.: zapalenie oskrzelików płucnych, zapalenie płuc lub zapalenie żołądka i jelit u dzieci. Częstość zakażeń bokawirusami zależy od wielu czynników, nie wszystkie zostały do tej pory zbadane, jednak najczęściej wykrywane były u małych dzieci. Zgodnie z wynikami naszego zespołu, stanowią czynnik etiologiczny 6% wymagających hospitalizacji zakażeń oddechowych u małych dzieci. Udział bokawirusów znacznie wzrasta jeśli ocenie poddamy częstość zakażeń o lekkim lub asymptomatycznym przebiegu (nawet 40%). Jest to szczególnie istotne, jeśli weźmiemy pod uwagę często opisywane występowanie bokawirusów w zakażeniach mieszanych. Analiza danych w piśmiennictwie wskazuje na stosunkowo częste współzakażenia bokawirusów oraz RSV i HMPV. Jednak zjawisko to wymaga dalszych badań.

Występowanie zakażeń mieszanych może powodować istotne zaostrenie przebiegu zachorowania, przedłużenie czasu leczenia. Rozszerzona diagnostyka laboratoryjna zakażeń dróg oddechowych, uwzględniająca także bokawirusy, nie tylko pozwoli na zidentyfiko-

wanie czynnika etiologicznego zakażenia/zachorowania, ale także pozwoli na zastosowanie odpowiednich procedur zapobiegających szerzeniu się tych zakażeń. Należy bowiem podkreślić, że bokawirusy, podobnie jak enterowirusy, namnażają się m.in. w układzie pokarmowym, ponadto obecność genomu wirusa w próbkach klinicznych stwierdzano nawet po kilku tygodniach od ustąpienia objawów. Znaczenie biologiczne i epidemiologiczne tego zjawiska nie jest jeszcze do końca poznane, ale może ono wpływać na szerzenie się zakażeń bokawirusami.

## Piśmiennictwo

- Abdel-Moneim A.S., Kamell M.M., Al-Ghamdi A.S., Al-Malky M.I.R.: Detection of Bocavirus in Children Suffering from Acute Respiratory Tract Infections in Saudi Arabia. *PLoS ONE*, **8**, e55500 (2013)
- Allander T., Tammi M.T., Eriksson M., Bjerkner A., Tiveljung-Lindell A., Andersson B.: Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12891–12896 (2005)
- Arthur J.L., Higgins G.D., Davidson G.P., Givney R.C., Ratcliff R.M.: A Novel Bocavirus Associated with Acute Gastroenteritis in Australian Children. *PLoS Pathog.* **5**, e1000391 (2009)
- Bastien N., Brandt K., Dust K. i inni: Human Bocavirus infection Canada. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 848–850 (2006)
- Bennett J.B., MBBCh, Pediatric Bocavirus website <http://emedicine.medscape.com/article/1355393-overview#showall>. 6 marzec 2014 r.
- Bi Z., Formenty P.B.H., Roth C.E.: Human bocavirus, a real respiratory tract pathogen. *Afr. J. Microbiol. Res.* 051–056 (2007)
- Cheng W., Li J., Huang C. i inni.: Identification and nearly full-length genome characterization of novel porcine bocaviruses. *PLoS One*, **5**, e13583 (2010)
- Dijkman R., Koekkoek S.M., Molenkamp R., Schildgen O., Hoek L.: Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells. *J. Virol.* **83**, 7739–7748 (2009)
- Foulongne V., Olejnik Y., Perez V., Elaerts S., Rodière M., Segondy M.: Human bocavirus in French children. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1251–1253 (2006)
- Gurda B.L., Agbandje-McKenna M.: Human bocavirus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae. *J. Virol.* **84**, 5880–5889 (2010)
- Huang Q., Qiu J.: Establishment of a reverse genetics system for studying human bocavirus in human airway epithelia. *PLoS Pathog.* **8**, e1002899 (2012)
- ICTV website, [http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode\\_id=2013256](http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=2013256) (14 listopada 2014 roku)
- Jacques J., Moret H., Renois F., Lévêque N., Motte J., Andréoletti: Human Bocavirus quantitative DNA detection in French children hospitalized for acute bronchiolitis. *J. Clin. Virol.* **43**, 142–147 (2008)
- Jang S.K., M.D., Chae S.L., Young K.K., M.D., Kap N.L., Chang K.L.: Human Bocavirus in Patients with Respiratory Tract Infection. *Korean J. Lab. Med.* **31**, 179–184 (2011)
- Jartti T., Hedman K., Jartti L., Ruuskanen O., Allander T., Söderlund-Venermo M.: Human bocavirus—the first 5 years. *Rev. Med. Virol.* **22**, 46–64 (2012)
- Kantola K., Hedman L., Allander T., Jartti T., Lehtinen P., Ruuskanen O., Hedman K., Söderlund-Venermo M.: Serodiagnosis of human bocavirus infection. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 540–546 (2008)
- Kapoor A., Delwar E.: A new bocavirus species in human stool. *J. Infect. Dis.* **199**, 196–200 (2009)
- Kapoor A., Delwart E.: Human bocaviruses are highly diverse, dispersed, recombination prone, and prevalent enteric infections. *J. Infect. Dis.* **201**(1), 1633–1643 (2010).
- Kapoor A., Hornig M., Asokan A., Williams B., Henriquez J.A., Lipkin W.I.: Bocavirus episome in infected human tissue contains non-identical termini. *PLoS ONE*, **6**, e21362 (2011)
- Kapoor A., Mehta N., Esper F. I.: Identification and characterization of a new bocavirus species in gorillas. *PLoS ONE*, **5**, e11948 (2010)
- Karalar L., Lindner J., Schimanski S., Kertai M., Seegerer H., Modrow S.: Prevalence and clinical aspects of human bocavirus infection in children. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 633–639 (2009)
- Levicán J., Navas E., Orizola J., Avendaño L.F., Gaggero A.: Human Bocavirus in Children with Acute Gastroenteritis, Chile, 1985–2010. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1877–1880 (2013)
- Li J., Yang Y., Dong Y., Li Y., Huang Y., Yi K., Liu K., Li Y.: Key elements of the human bocavirus type 1 (HBoV1) promoter and its trans-activation by NS1 protein. *Virol. J.* **10**, 315 (2013)
- Ma X., Endo R., Ishiguro N., Ebihara T., Ishiko H., Ariga T., Kikuta H.: Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 1132–1134 (2006)
- Malecki M., Schildgen V., Schildgen O.: Human bocavirus: still more questions than answers. *Future Virol.* **6**, 1107–1114 (2011)
- Manning A., Russell V., Eastick K., Leadbetter G.H., Hallam N., Templeton K., Simmonds P.: Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J. Infect. Dis.* **194**, 1283–1290 (2006)
- Monteny M., Niesters H.G.M., Moll H.A., Berger M.Y.: Human Bocavirus in Febrile Children. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 180–182 (2007)
- Pedrosa-Corral I., Pérez-Ruiz M., Navarro-Mari J.M., Ruiz-Bravo A.: Association of Human bocavirus with Respiratory Infections in Outpatients and in Patients Attended at a Reference Hospital. *Indian J. Virol.* **22**, 84–89 (2011)
- Pancer K.W., Gut W., Abramczuk E., Lipka B., Litwińska B.: Czynniki wirusowe ostrych zakażeń dróg oddechowych u małych dzieci. Wzrost zachorowań wywołanych przez metapneumowirusy podczas pandemii grypy 2009 w Polsce. *Przegl. Epidemiol.* **68**, 727–731 (2014)
- Piekarczyk A.: Podstawy wirusologii molekularnej, wyd. PWN, Warszawa, 2004, 425–426
- Pozo F., García-García M.L., Calvo C., Cuesta I., Pérez-Breña P., Casas I.: High incidence of human bocavirus infection in children in Spain. *J. Clin. Virol.* **40**, 224–228 (2007)
- Qinfeng H., Qiu J.: Establishment of a Reverse Genetics System for Studying Human Bocavirus in Human. *PLoS Pathog.* **8**, e1002899 (2012)
- Qu X.W., Duan Z.J., Qi Z.Y., Xie Z.P., Gao H.C., Liu W.P., Huang C.P., Peng F.W., Zheng L.S., Hou Y.D.: Human Bocavirus infection. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 165–168 (2007)
- Regamey N., Frey U., Deffernez C., Latzin P., Kaiser L.: Isolation of human bocavirus from Swiss infants with respiratory tract infections. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **26**, 177–179 (2007)
- Schildgen O.: Human Bocavirus: Lessons Learned to Date. *Pathogens*, **2**, 1–12 (2013)
- Schildgen V., Malecki M., Tillmann R.L., Brockmann M., Schildgen O.: The Human Bocavirus Is Associated with Some Lung

- and Colorectal Cancers and Persist in Solid Tumors. *PLoS ONE*, **8**, e68020 (2013)
37. Schildgen O., Müller A., Allander T., Mackay I.M., Völz S., Kupfer B., Simon A.: Human bocavirus: passenger or pathogen in acute respiratory tract infections? *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 291–304 (2008)
  38. Sun B., Cai Y., Li Y., Li J., Liu K., Li Y., Yang Y.: The nonstructural protein NP1 of human bocavirus 1 induced cell cycle arrest and apoptosis in Hela cells. *Virology*, **440**, 75–83 (2013)
  39. Vincente D., Cilla G., Montes M., Pérez-Trallero E.: Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 636–637 (2007)
  40. Weissbrich B., Neske F., Schubert J., Tollmann F., Blath K., Blessing K., Kreth H. W.: Frequent detection of bocavirus DNA in German children with respiratory tract infections. *Infect. Dis.* **6**, 109 (2006)
  41. Yoko M., Masaru T.: Distinctive clinical features of human bocavirus in children younger than 2 years. *Eur. J. Pediatr.* **169**, 1087–1092 (2010)
  42. Zaghoul M.Z.: Human bocavirus (HBoV) in children with respiratory tract infection by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and qualitative polymerase chain reaction (PCR). *Virology*, **19**, 239 (2011)
  43. Zhou L., Zheng S., Xiao Q., Ren L., Xie X., Luo J., Wang L., Huang A., Liu W., Liu E.: Single detection of human bocavirus 1 with a high viral load in severe respiratory tract infections in previously healthy children. *BMC Infect. Dis.* **14**, 424 (2014)

1. Epidemiologia zakażeń HGV/GBV-C i HIV. 2. Współzakażenie HGV/GBV-C i HIV jako wynik wspólnych dróg zakażeń. 3. Analiza porównawcza budowy wirusów. 4. Kliniczne aspekty zakażenia. 5. Patogeneza współzakażenia HGV/GBV-C i HIV. 5.1. Tropizm. 5.2. Rola E2 i NS5A HGV/GBV-C w przebiegu zakażenia HIV. 5.3. Wpływ HGV/GBV-C na poziom ekspresji receptorów CCR5 i CXCR4 oraz wydzielanie cytokin. 6. Wpływ leczenia interferonem na zakażenie HGV/GBV-C. 7. HAART u pacjentów współzakażonych HGV/GBV-C i HIV. 8. Podsumowanie

### HGV/GBV-C and HIV coinfection: epidemiology, pathogenesis and clinical consequences of infection

**Abstract:** Recent studies showed that HGV/GBV-C infection may exert a beneficial effect on the course of HIV (human immunodeficiency virus) infection in coinfecting patients. It was found that CD4+ cell number is higher and progression to AIDS (acquired immune deficiency syndrome) is slower in coinfecting patients as compared to HIV infected subjects. HGV/GBV-C infection is not associated with hepatitis, but can be responsible for development of some lymphoproliferative disease. HGV/GBV-C and HIV share common features, in particular: they are tropic for cells of the immune system, their genetic material consist of RNA and both circulate as *quasispecies*. HGV/GBV-C and HIV are transmitted through infected blood, sexually and vertically. The proposed mechanisms of HGV/GBV-C influence on HIV infection are based on the same tropism to immune cells and direct competition on the cellular level. It was observed that HGV/GBV-C can affect cytokine level, reduce expression of CCR5 and CXCR4, E2 and NS5A HGV/GBV-C proteins have inhibitory effect on HIV replication.

Currently, there is no specific treatment directed against HGV/GBV-C infection, however, it is possible to analyze results of antiviral treatment in case of patients coinfecting with HGV/GBV-C, HCV or HIV. HAART (high-activity antiretroviral therapy) and interferon  $\alpha$  therapy are commonly used in these patients, but the effect of antiviral therapy on HGV/GBV-C remains unclear.

1. Epidemiology of HGV/GBV-C and HIV infection. 2. HGV/GBV-C and HIV coinfection as a result of common routes of transmission. 3. Comparative analysis of the structure of viruses. 4. Clinical aspects of infection. 5. Pathogenesis of HGV/GBV-C and HIV coinfection. 5.1. Tropism. 5.2. Role of E2 and NS5A HGV/GBV-C in the course of HIV infection. 5.3. Influence of HGV/GBV-C on CCR5 and CXCR4 expression and cytokines level. 6. Influence of interferon therapy on HGV/GBV-C infection. 7. HAART in patients with HGV/GBV-C and HIV coinfection. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** HAART, HCV, HGV/GBV-C, HIV

**Key words:** HAART, HCV, HGV/GBV-C, HIV

## 1. Epidemiologia zakażeń HGV/GBV-C i HIV

W połowie lat dziewięćdziesiątych badania prowadzone przez niezależne grupy doprowadziły do odkrycia dwóch nieznanych patogenów. Początkowo nowo odkryte izolaty, nazwane HGV oraz GBV-C, nie były uznawane za tożsame [34, 63], jednak późniejsze badania wykazały wysoką homologię ich sekwencji i uznano, że jest to ten sam wirus [73]. Badania epidemiologiczne wskazują na różną, zależną od regionu geograficznego, częstość zakażenia HGV/GBV-C wynoszącą od 0,9%, w Japonii [35] do nawet 9%, w Brazylii [32]. W Polsce odsetek osób zakażonych wynosi ok. 3,2% [18].

Wirus nabytego niedoboru odporności (*human immunodeficiency virus* – HIV) został odkryty kilkanaście lat przed HGV/GBV-C. Szacuje się, że na świecie zakażonych HIV jest 30 milionów ludzi [86]. Ostatnio udostępnione dane wskazują, że w Polsce w latach 1985–2011 zakażenie HIV zdiagnozowano u 15 196 osób [41]. Konsekwencją zakażenia HIV jest

rozwoj zespołu nabytego niedoboru odporności (*acquired immunodeficiency syndrome* – AIDS) [44, 71].

HGV/GBV-C nie jest wirusem pierwotnie hepatotropowym, a u osób zakażonych z reguły nie obserwuje się uszkodzenia wątroby. Stwierdzono natomiast tropizm wirusa do komórek układu immunologicznego [77] i możliwość występowania związku pomiędzy zakażeniem HGV/GBV-C a rozwojem chorób limfoproliferacyjnych: chłoniaka nieziarniczego (*non-Hodgkin's lymphoma*), ziarnicy złośliwej (*Hodgkin's disease*) oraz szpiczaka mnogiego (*multiple myeloma*); [45, 76]. Wspólną cechą HGV/GBV-C i HIV jest zatem tropizm względem komórek układu immunologicznego [21, 22].

Z powodu braku jednoznacznie potwierdzonej chorobotwórczości HGV/GBV-C nie wykonuje się obecnie rutynowych badań, w tym dawców krwi, pod kątem obecności tego wirusa. Na rynku nie są dostępne testy przesiewowe w kierunku obecności przeciwciał anty-E2 HGV/GBV-C [70]. W przeciwieństwie do testów wykrywających obecność HGV/GBV-C, testy

\* Autor korespondencyjny: Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Pawińskiego 3c, 02-106 Warszawa; tel. 22 57 20 709; e-mail: nkubisa@wum.edu.pl

w kierunku wykrycia zakażenia HIV są szeroko stosowane zarówno w stacjach krwiodawstwa, jak też są dostępne w placówkach medycznych [41].

## 2. Współzakażenie HGV/GBV-C i HIV jako wynik wspólnych dróg zakażeń

Główną drogę transmisji HGV/GBV-C stanowi krew, a ryzyko zakażenia jest najwyższe u pacjentów dializowanych, osób przyjmujących dożylnie środki odurzające, oraz u których przetaczano krew [5]. W przypadku zakażeń będących konsekwencją transfuzji, prawdopodobieństwo rozwoju HGV/GBV-C wzrasta wraz z ilością przetoczonych jednostek krwi [74]. Do zakażenia wirusem może dojść również drogą wertykalną [67] oraz drogą seksualną co potwierdzają badania przeprowadzone wśród partnerów osób zakażonych [50, 58, 85]. W przypadku HIV, drogi zakażenia są w zasadzie identyczne, jednak największe znaczenie w przenoszeniu tego patogenu ma droga seksualna [44]. Ze względu na wspólne drogi przenoszenia obserwuje się częste współzakażenia HGV/GBV-C i HIV [11, 77], jak również zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) [47] i wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) [4].

Od 15 do 40% osób zakażonych HIV-1 jest również zakażona HGV/GBV-C [13, 61]. Koinfekcja HIV może sprzyjać rozwojowi przewlekłego zakażenia HGV/GBV-C oraz poprzez upośledzenie odpowiedzi immunologicznej zwiększać prawdopodobieństwo nadkażenia tym wirusem [12]. Poziom wirerii HIV i leczenie przeciw-wirusowe HAART (*highly active antiretroviral therapy*) nie ma jednak znaczenia w rozwoju zakażenia [74].

Wyniki badań wskazują, że ryzyko transmisji HGV/GBV-C drogą wertykalną jest uzależnione od poziomu wirerii tego wirusa [33, 43] i jest najwyższe w przypadku wysokich wartości. Co ciekawe, sugeruje się, że ryzyko zakażenia HIV drogą wertykalną jest mniejsze u dzieci, które uległy zakażeniu HGV/GBV-C [67]. Jednak według Supapol i współautorów [67] wysoka wirerii HGV/GBV-C u matki jest związana nie tylko z większym ryzykiem transmisji tego wirusa, ale także może korelować z niższym poziomem RNA HIV. Dlatego też, dzieci matek współzakażonych HGV/GBV-C i HIV są w mniejszym stopniu narażone na zakażenie HIV niż w przypadku kobiet bez zakażenia HGV/GBV-C [67]. Nie można jednak wykluczyć istnienia innych, niż zakażenie HGV/GBV-C, czynników wpływających na obniżenie transmisji HIV [67].

## 3. Analiza porównawcza budowy HGV/GBV-C i HIV

Punktem wyjścia do badań nad współzakażeniem HGV/GBV-C i HIV były badania prowadzone wśród pacjentów z koinfekcją pokrewnym do HGV/GBV-C

wirusem – HCV. HGV/GBV-C należy tak jak HCV do rodziny *Flaviviridae*, a obydwie wirusy cechuje duże podobieństwo struktury i sekwencji genomów [70]. Ze względu na zbieżność w budowie i cyklu replikacyjnym tych wirusów sugerowano podobny efekt współzakażenia HGV/GBV-C z HIV, jak u pacjentów zakażonych HCV i HIV. W przypadku pacjentów zakażonych HIV, u których stwierdza się także obecność HCV, wykazano znacząco szybszą progresję do AIDS [25].

Genom HGV/GBV-C, tak jak HCV składa się z pojedynczej, dodatnio spolaryzowanej nici RNA. Jednak w przeciwieństwie do HCV, nie zawiera sekwencji kodującej rdzeniowe białko C [62]. Wykazano, że białko C może pełnić funkcje immunomodulacyjne, sygnalizacji komórkowej i prawdopodobnie ma potencjał onkogeny [62]. Jego brak w genomie HGV/GBV-C może więc być jedną z przyczyn braku patogenności takiej jak w przypadku HCV [62].

Geny strukturalne (E1 oraz E2) znajdują się na 5' końcu genomu HGV/GBV-C, a niestrukturalne odpowiedzialne za proces replikacji (NS2, NS3, NS4b, NS5a i NS5b) na 3' [30]. Wielkość genomu w zależności od izolatu waha się od 9103 do 9392 nukleotydów [34]. Analizy genomu tego wirusa sugerują występowanie regionów hiperzmiennych, tak jak w przypadku HCV [51]. HGV/GBV-C łączy z HCV nie tylko schemat replikacji przebiegający z fazą nici negatywnej, ale również brak integracji z genomem zakażonej komórki [87].

W przypadku HIV wykazano, że należy do rodziny *Retroviridae* (innej niż HGV/GBV-C i HCV) i jego genom składa się z dwóch identycznych nici RNA o dodatniej polarności. Genom HIV jest zbliżony wielkością do HGV/GBV-C i wynosi ok. 9200 nukleotydów oraz stwierdzono w nim obecność powtarzalnych sekwencji – LTR (*long terminal repeat*) na obu jego końcach [57]. Wyróżniono 9 genów, które są odpowiedzialne za produkcję kluczowych dla procesu replikacji enzymów takich jak odwrotna transkryptaza, proteazy i endonukleazy. Replikacja HIV zachodzi z etapem syntezy komplementarnej do RNA cząsteczki DNA, a następnie wytworzenie drugiej nici DNA. Następnie, w przeciwieństwie do HGV/GBV-C, może dojść do integracji materiału genetycznego HIV z genomem zakażonej komórki [57].

Wykazano do tej pory obecność sześciu genotypów HGV/GBV-C, których występowanie jest związane z regionem geograficznym [39]. W przypadku HIV obserwuje się obecność dwóch typów: HIV-1 i HIV-2 oraz trzech grup HIV-1: O, N i najbardziej liczną M [44]. Większość prowadzonych badań dotyczy HIV-1 ze względu na jego częstsze występowanie oraz obserwowaną szybszą progresję zakażenia w porównaniu do HIV-2 [31, 46].

Podobnie jak w przypadku HCV i HIV, również HGV/GBV-C cechuje się występowaniem tzw. pseudo-



typów (*quasispecies*) w izolatach wirusa pobranych od jednego pacjenta. Stwierdzono, że to zjawisko jest związane z niską dokładnością replikacji, która sprzyja powstawaniu nowych, licznych wariantów wirusa. Występowanie w przypadku zakażenia HCV lub HIV wielu wariantów genetycznych może sprzyjać unikaniu odpowiedzi immunologicznej przez te patogeny [21, 26, 53, 78]. Potwierdzenie występowania zjawiska *quasispecies* w przebiegu zakażenia HGV/GBV-C umożliwiło lepsze poznanie jego miejsc replikacji [21].

#### 4. Kliniczne aspekty koinfekcji HGV/GBV-C i HIV

Większość dostępnych badań dotyczy wpływu HGV/GBV-C na przebieg zakażenia HIV-1, ale pojawiają się też doniesienia dotyczące HIV-2 [19]. Wykazano, że u pacjentów współzakażonych HGV/GBV-C i HIV obserwuje się wolniejszy przebieg i późniejszy rozwój pełnoobjawowego AIDS oraz dłuższą przeżywalność niż u osób z monoinfekcją HIV. Dłuższy okres przeżycia pacjentów współzakażonych HGV/GBV-C i HIV jest niezależny od czynników takich jak wiek oraz płeć [71, 75]. W części badań potwierdzono również, że mają oni wyższą liczbę komórek CD4+ niż pacjenci bez zakażenia HGV/GBV-C [71, 75]. Wyeliminowanie HGV/GBV-C u tych pacjentów może prowadzić do pogorszenia przebiegu zakażenia HIV, czyli do szybszego spadku liczby komórek CD4+ i rozwoju pełnoobjawowego AIDS [71, 75]. Jednak niektóre badania sugerują, że przyczyną eliminacji zakażenia HGV/GBV-C jest zmniejszenie się rezerwuaru komórek docelowych dla tego wirusa w następstwie zakażenia HIV [75].

Nie wszystkie badania jednoznacznie potwierdzają „korzystny” wpływ HGV/GBV-C na przebieg zakażenia HIV lub wykluczają jakikolwiek związek pomiędzy HGV/GBV-C a liczbą komórek CD4+ [71]. I tak, w badaniach Quiros-Roldan i współautorów nie wykazano związku między zakażeniem HGV/GBV-C, liczbą komórek CD4+ i rozwojem AIDS u pacjentów zakażonych obydwojema wirusami [48]. Nie wykazano także związku między poziomem wirēmii HGV/GBV-C a liczbą komórek CD4+ [71].

Sugeruje się, że do utrzymywania się zakażenia HGV/GBV-C może być konieczna odpowiednia minimalna liczba komórek CD4+, w których może replikować HGV/GBV-C [75]. Ponieważ wysokiej wirēmii HIV towarzyszy mniejsza liczba tych komórek, w konsekwencji można obserwować niższy poziom replikacji HGV/GBV-C [75]. U pacjentów zakażonych HIV-2 nie obserwuje się wpływu HGV/GBV-C na przebieg zakażenia. Można to wytłumaczyć łagodniejszym przebiegiem zakażenia HIV-2, z niską wirēmią oraz mniejszym uszkodzeniem komórek CD4+ [19].

#### 5. Patogeneza współzakażenia HGV/GBV-C i HIV

Wyjaśnienie mechanizmu „korzystnego” wpływu HGV/GBV-C na przebieg zakażenia HIV było przedmiotem licznych badań [42, 54, 65, 71, 79, 83]. Zaproponowano w nich szereg hipotez, przy czym większość z nich zakładała wpływ wirusa na funkcję układu immunologicznego. Analizowano tropizm obu wirusów [16, 22], oddziaływanie między białkami wirusa [20, 82] oraz rolę zakażenia w ekspresji niektórych cytokin [80, 84]. Wskazywano też na wpływ HGV/GBV-C na spadek ekspresji receptorów Fas [37] oraz aktywację szlaku interferonowego [23].

Już wczesne badania sugerowały związek między obydwojema wirusami, a komórkami, w których dochodzi do ich replikacji. Przypuszczano, że wirusy mogą na siebie oddziaływać w sposób pośredni oraz bezpośredni, ze względu na to samo miejsce replikacji [16, 21, 22]. Udowodniono bezpośredni, hamujący działanie białek E2 oraz NS5A HGV/GBV-C na replikację HIV [54, 83], prawdopodobnie głównie poprzez wpływ na proces wnikania HIV do komórek. Wskazuje się na modulujący wpływ HGV/GBV-C na zmianę profilu niektórych cytokin: RANTES (*regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*), MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* ), MIP-1 $\beta$  (*macrophage inflammatory protein-1 $\beta$* ), SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*) oraz ekspresję receptorów CCR5 i CXCR4 [79], które uczestniczą w procesie zakażenia komórek CD4+ przez HIV. Zaobserwowano obniżoną ekspresję CCR5 u pacjentów z koinfekcją HGV/GBV-C i HIV w porównaniu do zakażonych tylko HIV [40, 84].

Badania kliniczne wskazują na związek pomiędzy HGV/GBV-C a aktywacją i proliferacją limfocytów T. W przebiegu zakażenia HIV obserwuje się przewlekłą aktywację komórek T, która sprzyja zwiększonej replikacji HIV i szybszemu rozwojowi AIDS [7, 65]. Stwierdzono jednak, że współzakażenie HGV/GBV-C może ograniczać nadmierną aktywację limfocytów T i zwiększać odsetek komórek naiwnych CD4+ i CD8+ [65]. Potwierdzono, że wirēmii HGV/GBV-C jest związana z niższą ekspresją markerów aktywacji limfocytów T oraz wzrostem liczby limfocytów podwójnie ujemnych (CD3+ CD4- CD8-) u pacjentów zakażonych HIV [3, 6, 7].

##### 5.1. Tropizm HGV/GBV-C i HIV

Tropizm HIV jest szczegółowo poznany i wieloletnie badania wskazują przede wszystkim na limfocyty CD4+ i monocyty/makrofagi jako podstawowe miejsca replikacji [22]. Jednak stwierdzono obecność białek HIV także w komórkach endotelialnych, komórkach Kupffera, hepatocytach i innych [22]. W przypadku HIV możliwość wniknięcia wirusa do komórki docelowej jest związana z interakcją między wirusowym gp120,

a komórkowym receptorem CD4 oraz odpowiednimi koreceptorami dla poszczególnych szczepów. W zależności od rodzaju koreceptora wyróżniono wiążące się z CCR5 szczepy R5 wykazujące tropizm do monocytów/makrofagów i pierwotnych komórek CD4+, oraz szczepy X4 łączące się z CXCR4 do komórek CD4+ [82].

Jak wspomniano, nie potwierdzono hepatotropizmu HGV/GBV-C [24, 27], natomiast wskazuje się na jego limfotropizm [21]. Potwierdzają to badania wykazujące występowanie nici negatywnej RNA w komórkach układu immunologicznego, w szczególności w jednonądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC); [15, 74]. Wykazano replikację wirusa w populacji komórek CD4+ i CD8+, w komórkach B [16] oraz w komórkach szpiku kostnego [21]. Badania ilościowe wykazały wyższy poziom RNA HGV/GBV-C w surowicy w porównaniu do tkanki wątrobowej, co również wskazuje na istnienie innych źródeł replikacji i uwalniania tego wirusa (w tym przypadku również sugeruje się PBMC); [56]. Możliwym miejscem pierwotnej i niezależnej replikacji od PBMC są komórki szpiku kostnego, co potwierdzono wykryciem negatywnej nici RNA HGV/GBV-C w tych komórkach [28, 49] oraz odmiennych wariantów molekularnych wirusa niewystępujących w PBMC (tzw. kompartmentalizacja); [21]. Jednak nie wszystkie badania potwierdzają, że wirus replikuje w PBMC [36].

## 5.2. Rola E2 i NS5A HGV/GBV-C w przebiegu zakażenia HIV

Główną funkcją białka E2 HGV/GBV-C jest wiązanie wirusa z wrażliwymi na zakażenie komórkami [59]. Badania *in vitro* wykazały, że dodanie tego białka do linii komórkowej Jurkat (ludzkie komórki T), powoduje spadek replikacji HIV w hodowlach wcześniej nadkażonych tym wirusem [83]. Dalsza analiza wykazała, że regionem E2 HGV/GBV-C odpowiedzialnym za ten efekt może być siedemnastoaminokwasowy fragment, a dokładnie sekwencja 276–292 [83].

Udowodniono wpływ białka E2 HGV/GBV-C na proces wnikania HIV do komórki. Wydaje się, że dwa krótkie peptydy pochodzące z N-terminalnego końca E2 pełnią istotną rolę podczas późnego etapu wnikania HIV, poprzez oddziaływanie z białkiem wirusa gp41 [20]. Możliwe też, że E2 wpływa na wzajemne oddziaływanie N-terminalnej i C-terminalnej części białka gp120 z gp41 HIV w trakcie wiązania z CD4 i prowadzi do zahamowania tego procesu [13].

Na poziom replikacji HIV może wpływać również NS5A HGV/GBV-C powodując obniżenie ekspresji białka CD4 i w konsekwencji ograniczając rozprzestrzenianie się HIV w układzie immunologicznym [82, 84]. Uważa się, że NS5A HGV/GBV-C może również modyfikować transkrypcję genów dla cytokin i chemokin i tym samym zwiększać uwalnianie SDF-1. Doświadczenia wykonane na linii komórkowej ludz-

kich limfocytów T wykazały, że dodawanie neutralizujących przeciwciał anti-SDF-1 do hodowli z ekspresją NS5A HGV/GBV-C tylko częściowo zniosło hamujący wpływ na replikację HIV. Wskazuje to na istnienie jeszcze innych mechanizmów działania NS5A HGV/GBV-C na replikację HIV [54, 81, 82]. Mechanizm działania białka HGV/GBV-C na przebieg zakażenia HIV może być w przyszłości wykorzystany do opracowania nowych terapii antyretrowirusowych [82].

## 5.3. Wpływ HGV/GBV-C na poziom receptorów CCR5 i CXCR4 oraz profil cytokin

Dużą wagę przypisuje się do możliwości wpływu HGV/GBV-C na przebieg zakażenia HIV poprzez modulację ekspresji receptorów powierzchniowych CCR5 oraz CXCR5. Naturalnymi ligandami dla CCR5 są RANTES, MIP-1 $\alpha$  i MIP-1 $\beta$ , natomiast dla CXCR4 – SDF-1; [2]. W komórkach zakażonych HGV/GBV-C wykazano wzrost poziomu niektórych cytokin: RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , i SDF-1 co z kolei może prowadzić do ograniczenia dostępności receptorów dla HIV i w konsekwencji utrudnionego rozprzestrzeniania się HIV w układzie immunologicznym [79]. Wyniki prowadzonych do tej pory badań wykazują wpływ HGV/GBV-C na spadek ekspresji tych receptorów na powierzchni PBMC, w szczególności w komórkach CD4+ [84].

Mechanizm prowadzący do spadku ekspresji CCR5 i CXCR4 nie został do końca poznany. Wykazano, że E2 HGV/GBV-C oddziałuje z receptorem CD81 i prowadzi w konsekwencji do spadku ekspresji CCR5 na powierzchni komórki [40]. Wpływ replikacji HGV/GBV-C na dwa główne koreceptory wejścia HIV do komórki jest też przypuszczalnie związany z bezpośrednim działaniem reszty serynowej w pozycji 158 aa NS5A HGV/GBV-C [81].

Zaobserwowano, że pacjenci z współzakażeniem HGV/GBV-C i HIV prezentują często stosunkowo stabilny poziom cytokin limfocytów Th1 (*T helper cells*); (IL-2, IL-12), podczas gdy u pacjentów bez zakażenia HGV/GBV-C poziom tych cytokin znacząco maleje [42, 52]. Cytokiny produkowane przez limfocyty Th2 (IL-4 i IL-10) pozostają u pacjentów z koinfekcją na względnie stałym poziomie, natomiast u osób bez zakażenia HGV/GBV-C ekspresja IL-4 i IL-10 wzrasta. Te wyniki mają szczególne znaczenie w rozwoju AIDS, które cechuje się m.in. wzmożoną produkcją IL-4 i IL-10 [42,52].

Przypuszczalnie zakażenie HGV/GBV-C wpływa stabilizująco na profil cytokin Th1/Th2 spowalniając progresję zakażenia HIV [52, 55]. Potwierdziły to również badania *in vitro* w liniach komórkowych Jurkat, w których zakażenie HGV/GBV-C prowadziło do redukcji ekspresji mRNA dla kilku cytokin Th2: IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13 [52, 83].

## 6. Wpływ leczenia interferonem na zakażenie HGV/GBV-C

Wpływ terapii przeciwwirusowej na zakażenie HGV/GBV-C lub jego eliminację można obserwować u pacjentów leczonych z powodu współzakażeń z HCV (leczonych interferonem, pegylowanym interferonem oraz rybawiryną). Brak jest natomiast danych dotyczących leczenia, które miałyby na celu eliminację samego zakażenia HGV/GBV-C.

Wysoka homologia sekwencji HGV/GBV-C z HCV mogłaby sugerować podobny efekt działania interferonu na oba wirusy. Jednak otrzymane do tej pory wyniki nie wskazują jednoznacznie, że stosowany w terapii przeciwwirusowej interferon- $\alpha$  wpływa na eradykację HGV/GBV-C. Przypuszczalnie może jedynie powodować spadek poziomu replikacji tego wirusa [29, 69]. Zaobserwowano też inny przebieg odpowiedzi pacjentów na leczenie interferonem. W przypadku HCV następuje nagły spadek wiremii, natomiast wiremii HGV/GBV-C obniża się stopniowo [72]. Interferon  $\alpha$  podany w dużych dawkach ma wpływ na obniżenie replikacji HGV/GBV-C, ale stwierdzono iż nie jest to efekt długotrwały. Po pół roku od zakończenia terapii następuje zazwyczaj powrót do obserwowanego przed leczeniem poziomu replikacji [29].

Natomiast badania prowadzone przez Schwarze-Zander i współautorów [60] u pacjentów współzakażonych trzema wirusami: HGV/GBV-C, HCV i HIV, wykazały eliminację zakażenia HGV/GBV-C u 50% leczonych interferonem lub pegylowanym interferonem z rybawiryną. Zanik HGV/GBV-C RNA był częściej obserwowany u pacjentów z wyższą wyjściową liczbą komórek CD4+ [60]. Prawdopodobnie na eradykację HGV/GBV-C wpływa w tym przypadku nie tylko sama terapia, ale także pobudzenie mechanizmów nabytej odpowiedzi immunologicznej [60]. Sugeruje się, że odpowiedź na leczenie prawdopodobnie ma związek z białkiem NS5A HGV/GBV-C, które może zawierać region zbliżony do występującego w NS5A HCV – ISDR (*interferon sensitivity determinig region*). Występowanie tego regionu może wpływać na przetrwanie wirusa oraz umożliwia unikanie odpowiedzi immunologicznej [80].

## 7. HAART u pacjentów współzakażonych HGV/GBV-C i HIV

Celem terapii przeciwretrowirusowej jest zahamowanie replikacji HIV i umożliwienie odbudowy funkcji układu immunologicznego [65]. Jednak terapia antyretrowirusowa nie w pełni redukuje aktywację układu immunologicznego charakterystyczną dla zakażenia HIV [7]. Teoretycznie pozytywny wpływ HGV/GBV-C na przebieg zakażenia HIV-1 pozwalałby oczekiwać lepszych wyników HAART u osób z koinfekcją. Ta zależność nie zawsze znajduje potwierdzenie w obser-

wacjach [9]. W części publikacji wskazuje się na lepszy efekt HAART u osób współzakażonych HGV/GBV-C w postaci wyższej liczby komórek CD4+ i CD8+ i niższego poziomu RNA HIV niż u pacjentów zakażonych tylko HIV [52]. Stwierdzono, że wyższa liczba komórek CD8+ jest związana z występowaniem zarówno RNA HGV/GBV-C jak i przeciwciał skierowanych przeciwko temu wirusowi [52].

U pacjentów współzakażonych HGV/GBV-C, którzy otrzymują HAART oraz dodatkowo IL-2 zaobserwowano niższą liczbę komórek CD4+ w porównaniu do pacjentów tak samo leczonych, zakażonych tylko HIV. Wiadomo, że stosowanie IL-2 w terapii HIV z jednej strony sprzyja odbudowie układu immunologicznego, z drugiej może zwiększać replikację HIV w komórkach CD4+ [66]. W przypadku zakażenia HGV/GBV-C niektóre badania wskazują na hamujący wpływ IL-2 na replikację HGV/GBV-C, co może być istotne w przypadku pacjentów współzakażonych [17, 66].

Nie wszystkie badania wskazały wzrost skuteczności HAART u pacjentów z koinfekcją HGV/GBV-C. Obecnie stosowane, bardzo efektywne programy leczenia mogą maskować jakkolwiek wpływ HGV/GBV-C na przebieg zakażenia HIV [14]. Sprzeczne obserwacje dotyczące wpływu zakażenia HGV/GBV-C na HIV w tych grupach pacjentów tłumaczy się także wzrostem wiremii HGV/GBV-C w trakcie HAART i jej spadkiem w przypadku przerwania leczenia. Takie wyniki mogą sugerować bezpośredni wpływ HIV na replikację HGV/GBV-C, ale też mogą być wynikiem ograniczonego dostępu do komórek CD4+, w których dochodzi do replikacji obu wirusów [8]. A zatem brak różnic w odpowiedzi na HAART u pacjentów z i bez współzakażenia HGV/GBV-C można wytłumaczyć wpływem tej terapii na przebieg zakażenia HGV/GBV-C, w szczególności na poziom komórek CD4+ oraz replikację HIV [8, 9, 64, 68].

Niektóre badania wskazują również na inne czynniki wpływające na związek między zakażeniem HGV/GBV-C a HIV. Wiadomo, że komórki CD4+ i CD8+ zakażone HIV charakteryzują się zwiększoną ekspresją Fas, co w konsekwencji prowadzi do apoptozy i eliminacji tych komórek [37]. Można przypuszczać, że pozytywny wpływ HGV/GBV-C na przebieg zakażenia HIV ma związek ze spadkiem ekspresji Fas na powierzchni komórek układu immunologicznego. U pacjentów nieleczonych, współzakażonych HGV/GBV-C i HIV-1, obserwuje się znacząco mniejszą ekspresję Fas na limfocytach w porównaniu z pacjentami zakażonymi tylko HIV. Ta różnica nie występuje u pacjentów otrzymujących HAART. Spadek ekspresji Fas na limfocytach współzakażonych HGV/GBV-C i HIV-1 może mieć związek z bezpośrednim działaniem białka NS5A HGV/GBV-C albo ze zmianą poziomu ekspresji niektórych chemokin i cytokin: TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ), interferonu  $\gamma$  lub interferonu  $\alpha$  [37].

U pacjentów z koinfekcją dodatkowo zaobserwowano silniejszą aktywację szlaku interferonowego w porównaniu do pacjentów bez zakażenia HGV/GBV-C [10]. Pobudzenie wydzielania endogennego interferonu może powodować silniejszą odpowiedź przeciwwirusową, a w konsekwencji osiągać lepsze wyniki terapii [10, 23, 38]. Według Lalle i współautorów koinfekcja z HGV/GBV-C pobudza wrodzoną odpowiedź przeciwwirusową na zakażenie HIV, aktywację interferonu  $\gamma$ , jak i genów odpowiedzi na interferon [23].

Ostatnio wykazano rolę genotypu HGV/GBV-C w odpowiedzi na leczenie antyretrowirusowe. Zaobserwowano obniżenie wiremii HIV oraz podwyższenie liczby komórek CD4+ u pacjentów współzakażonych genotypem 2b HGV/GBV-C i przyjmujących terapię antyretrowirusową [1]. Nie można jednak traktować genotypu HGV/GBV-C jako czynnika prognostycznego, a samo zakażenie tym wirusem nie musi mieć wpływu na odpowiedź na terapię antyretrowirusową [9].

## 8. Podsumowanie

Liczne badania wykazały, że HGV/GBV-C podobnie jak HIV może zakażać komórki układu immunologicznego. Podobne drogi przenoszenia zakażenia HGV/GBV-C i HIV powodują częste występowanie współzakażenia obydwoma wirusami. Obserwacje kliniczne pacjentów z koinfekcją wykazały, że progresja uszkodzenia układu immunologicznego postępuje u nich wolniej niż u osób zakażonych tylko HIV. Ten pozytywny wpływ HGV/GBV-C na przebieg zakażenia HIV może mieć związek z tropizmem obu wirusów do tych samych komórek oraz spadkiem ekspresji receptorów CCR5 i CXCR4 przez białka HGV/GBV-C, a w konsekwencji obniżeniem replikacji HIV. Przeprowadzone badania nie wykazały natomiast jednoznacznie czy występowanie współzakażenia HGV/GBV-C wpływa pozytywnie na skuteczność terapii antyretrowirusowej

Podsumowując, zakażenie HGV/GBV-C nie jest uważane za czynnik prognostyczny przebiegu choroby u osób zakażonych HIV. Stanowi jednak frapujący model do badań klinicznych i podstawowych oddziaływań między tymi wirusami. Możliwa rola HGV/GBV-C w rozwoju chorób limfoproliferacyjnych może skłaniać do dalszych badań nad patogennością tego wirusa, zwłaszcza u osób z zaburzeniami odporności, i działaniem leków przeciwwirusowych.

## Piśmiennictwo

- Alcade R., Nishiya A., Casseb J., Fonseca L. A., Duarte A.J.: Prevalence and distribution of the GBV-C/HGV among HIV-1 infected patients under anti-retroviral therapy. *Virus Res.* **151**, 148–152 (2010)
- Amara A., Gall S.L., Schwartz O., Salamero J., Montes M., Loetscher P., Arenzana-Seisdedos F.: HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1 $\alpha$ -dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J. Exp. Med.* **186**, 139–146 (1997)
- Baggio-Zappia G.L., Barbosa Ade J., Brunialti M.K., Salomao R., Granato C.F.: Influence of GB virus C on IFN-gamma and IL-2 production and CD38 expression in T lymphocytes from chronically HIV-infected and HIV-HCV-co-infected patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **106**, 662–669 (2011)
- Barusruk S., Urwijitaroon Y.: High prevalence of HGV coinfection with HBV or HCV among northeastern Thai blood donors. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, **37**, 289–293 (2006)
- Basaras M., Arrese E., Cabrera F., Ezpeleta C., Cisterna R.: Detection of HGV in serum and peripheral blood mononuclear cells of maintenance haemodialysis patients. *J. Hosp. Infect.* **42**, 155–159 (1999)
- Bhattarai N., McLinden J.H., Xiang J., Kaufman T.M., Stapleton J.T.: GB virus C envelope protein E2 inhibits TCR-induced IL-2 production and alters IL-2-signaling pathways. *J. Immunol.* **189**, 2211–2216 (2012)
- Bhattarai N., Rydze R.T., Chivero E.T., Stapleton J.T.: GB virus C viremia is associated with higher levels of double-negative T cells and lower T-cell activation in HIV-infected individuals receiving antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* **206**, 1469–1472 (2012)
- Bjorkman P., Flamholz L., Molnegren V., Marshall A., Guner N., Widell A.: Enhanced and resumed GB virus C replication in HIV-1-infected individuals receiving HAART. *AIDS*, **21**, 1641–1643 (2007)
- Brumme Z.L., Chan K.J., Dong W.W., Mo T., Wynhoven B., Hogg R.S., Harrigan P.R.: No association between GB virus-C viremia and virological or immunological failure after starting initial antiretroviral therapy. *AIDS*, **16**, 1229–1933 (2002)
- Capobianchi M.R., Lalle E., Martini F., Poccia F., D'Offizi G., Antonucci G., Dianzani F.: Influence of GBV-C infection on the endogenous activation of the IFN system in HIV-1 co-infected patients. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, **52**, 3–8 (2006)
- Clevenberg P., Durant J., Halfon P., Tran A., Manos T., Rahelinirina V., Dellamonica P.: High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus infection in different risk groups of HIV-infected patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **4**, 644–647 (1998)
- Devereux H., Sabin C.A., Kinson Z., Brown D., Griffioen A., Dusheiko G.M., Lee C.A.: Influence of HIV-1 infection on GBV-C infection in multiply infected haemophilic patients. *J. Med. Virol.* **56**, 316–320 (1998)
- Eissmann K., Mueller S., Sticht H., Jung S., Zou P., Jiang S., Reil H.: HIV-1 fusion is blocked through binding of GB Virus C E2D peptides to the HIV-1 gp41 disulfide loop. *PLoS ONE*, **8**, e54452 (2013)
- Ernst D., Greer M., Akmatova R., Pischke S., Wedemeyer H., Heiken H., Stoll M.: Impact of GB virus C viraemia on clinical outcome in HIV-1-infected patients: a 20-year follow-up study. *HIV Med.* **15**, 245–250 (2013)
- Fogeda M., Lopez-Alcorocho J.M., Bartolome J., Arocena C., Martin M.A., Carreno V.: Existence of distinct GB virus C/hepatitis G virus variants with different tropism. *J. Virol.* **74**, 7936–7942 (2000)
- George S.L., Varnaz D., Stapleton J.T.: GB virus C replicates in primary T and B lymphocytes. *J. Infect. Dis.* **193**, 451–454 (2006)
- George S.L., Xiang J., Stapleton J.T.: Clinical isolates of GB virus type C vary in their ability to persist and replicate in peripheral blood mononuclear cell cultures. *Virology*, **316**, 191–201 (2003)
- Grabarczyk P., Brojer E., Windyga J., Łopaciuk S., Klukowska A., Mikulska M.: GBV-C/HGV and TTV infection markers in Polish blood donors and haemophilia patients. *Przegl. Epidemiol.* **60**, 581–588 (2006)
- Kaye S., Howard M., Alabi A., Hansmann A., Whittle H., Schim van der Loeff M.: No observed effect of GB virus C coinfection on disease progression in a cohort of African woman infected with HIV-1 or HIV-2. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 876–878 (2005)

20. Kim S., Pang H.B., Kay M.S.: Peptide mimic of the HIV envelope gp120-gp41 interface. *J. Mol. Biol.* **376**, 786–797 (2008)
21. Kisiel E., Cortez K.C., Pawelczyk A., Ośko I.B., Kubisa N., Laskus T., Radkowski M.: Hepatitis G virus/GBV-C in serum, peripheral blood mononuclear cells and bone marrow in patients with hematological malignancies. *Infect. Genet. Evol.* **19**, 195–199 (2013)
22. Kong L., Welge J.A., Powell E.A., Blackard J.T.: HIV infection of hepatocytes results in a modest increase in hepatitis C virus expression *in vitro*. *PLoS ONE*, **9**, e83728. (2014)
23. Lalle E., Sacchi A., Abbate I., Vitale A., Martini F., D'Offizi G., Capobianchi M.R.: Activation of interferon response genes and of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 positive subjects with GB virus C co-infection. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **21**, 161–171 (2008)
24. Laras A., Zacharakis G., Hadziyannis S.J.: Absence of the negative strand of GBV-C/HGV RNA from the liver. *J. Hepatol.* **30**, 383–388 (1999)
25. Laskus T., Kibler K.V., Chmielewski M., Wilkinson J., Adair D., Horban A., Radkowski M.: Effect of hepatitis C infection on HIV-induced apoptosis. *PLoS ONE*, **8**, e75921. (2013)
26. Laskus T., Radkowski M., Wang L.F., Nowicki M., Rakela J.: Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J. Virol.* **74**, 1014–1017 (2000)
27. Laskus T., Radkowski M., Wang L.F., Vargas H., Rakela J.: Lack of evidence for hepatitis G virus replication in the livers of patients coinfecting with hepatitis C and G viruses. *J. Virol.* **71**, 7804–7806 (1997)
28. Laskus T., Radkowski M., Wang L.F., Vargas H., Rakela J.: Detection of hepatitis G virus replication sites by using highly strand-specific Tth-based reverse transcriptase PCR. *J. Virol.* **72**, 3072–3075 (1998)
29. Lau D.T., Miller K.D., Detmer J., Kolber J., Herpin B., Metcalf J.A., Hoofnagle J.H.: Hepatitis G virus and human immunodeficiency virus coinfection: response to interferon-alpha therapy. *J. Infect. Dis.* **180**, 1334–1337 (1999)
30. Leary T.P., Muerhoff A.S., Simons J.N., Pilot-Matias T.J., Erker J.C., Chalmers M.L., Mushahwar I.K.: Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the *Flaviviridae* associated with human non-A-E hepatitis. *J. Med. Virol.* **48**, 60–67 (1996)
31. Lemey P., Pybus O.G., Wang B., Saksena N.K., Salemi M., Vandamme A.M.: Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc. Natl. Acad. USA*, **100**, 6588–6592 (2003)
32. Levi J.E., Contri D.G., Lima L.P., Takaoka D.T., Garrini R.H., Santos W., Wendel S.: High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **45**, 75–78 (2003)
33. Lin H.H., Kao J.H., Yeh K.Y., Liu D.P., Chang M.H., Chen P.J., Chen D.S.: Mother-to-infant transmission of GB virus C/hepatitis G virus: the role of high-titered maternal viremia and mode of delivery. *J. Infect. Dis.* **177**, 1202–1206 (1998)
34. Linnen J., Wages J.Jr., Zhages-Keck Z.Y., Fry K.E., Krawczynski K.Z., Alter H., Kim J.P.: Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science*, **271**, 505–508 (1996)
35. Masuko K., Mitsui T., Iwano K., Yamazaki C., Okuda K., Meguro T., Mayumi M.: Infection with hepatitis GB virus C in patients on maintenance hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1485–1490 (1996)
36. Mellor J., Haydon G., Blair C., Livingstone W., Simmonds P.: Low level or absent *in vivo* replication of hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* **79**, 705–714 (1998)
37. Moenkemeyer M., Schmidt R.E., Wedemeyer H., Tillmann H.L., Heiken H.: GBV-C coinfection is negatively correlated to Fas expression and Fas-mediated apoptosis in HIV-1 infected patients. *J. Med. Virol.* **80**, 1933–1940 (2008)
38. Mohamed A.A., Nada O.H., El Desouky M.A.: Implication of protein kinase R gene quantification in hepatitis C virus genotype 4 induced hepatocarcinogenesis. *Diagn. Pathol.* DOI: 10.1186/1746-1596-7-103 (2012)
39. Muerhoff A.S., Dawson G.J., Desai S.M.: A previously unrecognized sixth genotype of GB virus C revealed by analysis of 5'-untranslated region sequences. *J. Med. Virol.* **78**, 105–111 (2006)
40. Nattermann J., Nischalke H.D., Kupfer B., Rockstroh J., Hess L., Sauerbruch T., Spengler U.: Regulation of CC chemokine receptor 5 in hepatitis G virus infection. *AIDS*, **17**, 1457–1462 (2003)
41. Niedzwiedzka-Stadnik M., Pielacha M., Rosinska M.: HIV and AIDS in Poland in 2012. *Przegl. Epidemiol.* **68**, 283–289 (2014)
42. Nunnari G., Nigro L., Palermo F., Attanasio M., Berger A., Doerr H.W., Cacopardo B.: Slower progression of HIV-1 infection in persons with GB virus C co-infection correlates with an intact T-helper 1 cytokine profile. *Ann. Intern. Med.* **139**, 26–30 (2003)
43. Ohto H., Ujiie N., Sato A., Okamoto H., Mayumi M.: Mother-to-infant transmission of GB virus type C/HGV. *Transfusion*, **40**, 725–730 (2000)
44. Parczewski M., Leszczyszyn-Pynka M., Bander D., Urbańska A., Stańczak G., Boroń-Kaczmarek A.: Characteristics of HIV-1 non-B subtype infections in Northwest Poland. *J. Med. Virol.* **82**, 1306–1313 (2010)
45. Pavlova B.G., Heinz R., Selim U., Tuchler H., Pittermann E., Eder G.: Association of GB virus C (GBV-C)/hepatitis G virus (HGV) with haematological diseases of different malignant potential. *J. Med. Virol.* **57**, 361–366 (1999)
46. Popper S.J., Sarr A.D., Travers K.U., Gueye-Ndiaye A., Mboup S., Essex M.E., Kanki P.J.: Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. *J. Infect. Dis.* **180**, 1116–1121 (1999)
47. Price H., Bansi L., Sabin C.A., Bhagani S., Burroughs A., Chadwick D., Gilson R.: Hepatitis B virus infection in HIV-positive individuals in the UK collaborative HIV cohort (UK CHIC) study. *PLoS ONE*, **7**, e49314. (2012)
48. Quiros-Roldan E., Maroto M.C., Torti C., Moretti F., Casari S., Pan A., Carosi G.: No evidence of beneficial effect of GB virus type C infection on the course of HIV infection. *AIDS*, **16**, 1430–1431 (2002)
49. Radkowski M., Kubicka J., Kisiel E., Cianciara J., Nowicki M., Rakela J., Laskus T.: Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects. *Blood*, **95**, 3986–3989 (2000)
50. Ramia S., Mokhbat J., Sibai A., Klaysme S., Naman R.: Exposure rates to hepatitis C and G virus infections among HIV-infected patients: evidence of efficient transmission of HGV by the sexual route. *Int. J. STD AIDS*, **15**, 463–466 (2004)
51. Ranjbar M.M., Ghorban K., Alavian S.M., Keyvani H., Dadmanesh M., Roayaei Ardakany A., Sazmand A.: GB Virus C/ Hepatitis G Virus Envelope Glycoprotein E2: Computational Molecular Features and Immunoinformatics Study. *Hepat. Mon.* **13**, e15342 (2013)
52. Rodriguez B., Woolley I., Ledermann M.M., Zdunek D., Hess G., Valdez H.: Effect of GB virus C coinfection on response to anti-retroviral treatment in human immunodeficiency virus-infected patients. *J. Infect. Dis.* **187**, 504–507 (2003)
53. Ruiz V., Giordano M., Rivero C.W., Minassian M.L., Cuestas M.L., Trinks J., Oubina J.R.: GB virus C quasispecies detected in plasma and lymphocyte subsets in a natural human infection. *J. Gen. Virol.* **91**, 1687–1692 (2010)
54. Rydzek R.T., Bhattarai N., Stapleton J.T.: GB virus C infection is associated with a reduced rate of reactivation of latent HIV and

- protection against activation-induced T-cell death. *Antivir. Ther.* **17**, 1271–1279 (2012)
55. Rydze R., Xiang J., McLinden J.H., Stapleton J.T.: GB virus type C infection polarizes T-cell cytokine gene expression toward a Th1 cytokine profile via NS5A protein expression. *J. Infect. Dis.* **206**, 69–72 (2012)
  56. Saito S., Tanaka K., Kondo M., Morita K., Kitamura T., Kiba T., Sekihara H.: Plus- and minus-stranded hepatitis G virus RNA in liver tissue and in peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 288–291 (1997)
  57. Sarkar I., Hauber I., Hauber J., Buchholz F.: HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase. *Science*, **316**, 1912–1915 (2007)
  58. Sawayama Y., Hayashi J., Etoh Y., Urabe H., Minami K., Kashiwagi S.: Heterosexual transmission of GB virus C/hepatitis G virus infection to non-intravenous drug-using female prostitutes in Fukuoka, Japan. *Dig. Dis. Sci.* **44**, 1937–1943 (1999)
  59. Schmolke S., Tacke M., Schmitt U., Engel A.M., Ofenloch-Haehnle B.: Identification of hepatitis G virus particles in human serum by E2-specific monoclonal antibodies generated by DNA immunization. *J. Virol.* **72**, 4541–4545 (1998)
  60. Schwarze-Zander C., Blackard J.T., Zheng H., Addo M.M., Lin W., Robbins G.K., Chung R.T.: GB virus C (GBV-C) infection in hepatitis C virus (HCV)/HIV-coinfected patients receiving HCV treatment: importance of the GBV-C genotype. *J. Infect. Dis.* **194**, 410–419 (2006)
  61. Silva S.A., Rodrigues C.L., Campos A.F., Levi J.E.: Evaluation of GBV-C / HVG viremia in HIV-infected women. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **54**, 31–35 (2012)
  62. Simons J.N., Desai S.M., Schultz D.E., Lemon S.M., Mushahwar I.K.: Translation initiation in GB viruses A and C: evidence for internal ribosome entry and implications for genome organization. *J. Virol.* **70**, 6126–6135 (1996)
  63. Simons J.N., Leary T.P., Dawson G.J., Pilot-Matias T.J., Muerhoff A.S., Schlauder G.G., Mushahwar I.K.: Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat. Med.* **1**, 564–569 (1995)
  64. Soriano-Sarabia N., Abad M.A., Vallejo A., Gutierrez S., Leal M.: Influence of hepatitis C and hepatitis G virus co-infection on viral and cellular dynamics in patients infected with human immunodeficiency virus following interruption of highly active anti-retroviral therapy. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**, 290–293 (2006)
  65. Stapleton J.T., Chaloner K., Martenson J.A., Zhang J., Klinzman D., Xiang J., Landay A.: GB virus C infection is associated with altered lymphocyte subset distribution and reduced T cell activation and proliferation in HIV-infected individuals. *PLoS ONE*, **7**, e50563. (2012)
  66. Stapleton J.T., Chaloner K., Zhang J., Klinzman D., Souza I.E., Xiang J., Mitsuyasu R.: GBV-C viremia is associated with reduced CD4 expansion in HIV-infected people receiving HAART and interleukin-2 therapy. *AIDS*, **23**, 605–610 (2009)
  67. Supapol W.B., Remis R.S., Rabound J., Millson M., Tappero J., Kaul R., Butera S.: Reduced mother-to-child transmission of HIV associated with infant but not maternal GB virus C infection. *J. Infect. Dis.* **197**, 1369–1377 (2008)
  68. Takamatsu J., Toyoda H., Fukuda Y., Nakano I., Yokozaki S., Hayashi K., Saito H.: Effects of HAART on hepatitis C, hepatitis G, and TT virus in multiply coinfected HIV-positive patients with haemophilia. *Haemophilia*, **7**, 740–743 (2001)
  69. Tanaka E., Alter H.J., Nakatsuji Y., Shih J.W., Kim J.P., Matsumoto A., Kiyosawa K.: Effect of hepatitis G virus infection on chronic hepatitis C. *Ann. Intern. Med.* **125**, 740–743 (1996)
  70. Tassopoulos N.C., Papatheodoridis G.V., Delladetsima I., Hatzakis A.: Clinicopathological features and natural history of acute sporadic non-(A-E) hepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 1208–1215 (2008)
  71. Tillmann H.L., Heiken H., Knapik-Botor A., Heringlake S., Ockenga J., Wilber J.C., Manns M.P.: Infection with GB virus C and reduced mortality among HIV-infected patients. *N. Engl. J. Med.* **345**, 715–724 (2001)
  72. Toyoda H., Fukuda Y., Yokozaki S., Nakano I., Hayakawa T., Takamatsu J.: Interferon treatment of two patients with quadruple infection with hepatitis C virus (HCV), human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis G virus (HGV), and TT virus (TTV). *Liver*, **19**, 438–443 (1999)
  73. Tucker T.J., Smuts H.E.: GBV-C/HGV genotypes: proposed nomenclature for genotypes 1–5. *J. Med. Virol.* **62**, 82–83 (2000)
  74. Vahidnia F., Petersen M., Rutherford G., Busch M., Assmann S., Stapleton J.T., Custer B.: Transmission of GB virus type C via transfusion in a cohort of HIV-infected patients. *J. Infect. Dis.* **205**, 1436–1442 (2012)
  75. Van der Bij A.K., Kloosterboer N., Prins M., Boeser-Nunnink B., Geskus R.B., Lange J.M., Schuitemaker H.: GB virus C coinfection and HIV-1 disease progression: The Amsterdam Cohort Study. *J. Infect. Dis.* **191**, 678–685 (2005)
  76. Wiwanitkit V.: Individuals with HGV-RNA are at high risk of B cell non-Hodgkin's lymphoma development. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **6**, 215–216 (2005)
  77. Woolley I., Valdez H., Walker C., Landay A., Zdunek D., Hess G., Lenderman M.M.: Hepatitis G virus RNA is common in AIDS patients' plasma but is not associated with abnormal liver function tests or other clinical syndromes. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **19**, 408–412 (1998)
  78. Wu N., De La Cruz J., Al-Mawsawi L.Q., Olson C.A., Qi H., Luan H.H., Sun R.: HIV-1 quasiespecies delineation by tag linkage deep sequencing. *PLoS ONE*, **9**, e97505. (2014)
  79. Xiang J., George S.L., Wunschmann S., Chang Q., Klinzman D., Stapleton J.T.: Inhibition of HIV-1 replication by GB virus C infection through increases in RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta, and SDF-1. *Lancet*, **363**, 2040–2046 (2004)
  80. Xiang J., Martinez-Smith C., Gale M.Jr., Chang Q., Labrecque D.R., Schmidt W.N., Stapleton J.T.: GB virus type C NS5A sequence polymorphisms: association with interferon susceptibility and inhibition of PKR-mediated eIF2alpha phosphorylation. *J. Interferon Cytokine Res.* **25**, 261–270 (2005)
  81. Xiang J., McLinden J.H., Chang Q., Jordan E.L., Stapleton J.T.: Characterization of a peptide domain within the GB virus C NS5A phosphoprotein that inhibits HIV replication. *PLoS ONE*, **3**, e2580. (2008)
  82. Xiang J., McLinden J.H., Chang Q., Kaufman T.M., Stapleton J.T.: An 85-aa segment of the GB virus type C NS5A phosphoprotein inhibits HIV-1 replication in CD4+ Jurkat T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15570–15575 (2006)
  83. Xiang J., McLinden J.H., Kaufman T.M., Mohr E.L., Bhattarai N., Chang Q., Stapleton J.T.: Characterization of a peptide domain within the GB virus C envelope glycoprotein (E2) that inhibits HIV replication. *Virology*, **430**, 53–62 (2012)
  84. Xiang J., McLinden J.H., Rydze R.A., Chang Q., Kaufman T.M., Klinzman D., Stapleton J.T.: Viruses within the *Flaviviridae* decrease CD4 expression and inhibit HIV replication in human CD4+ cells. *J. Immunol.* **183**, 7860–7869 (2009)
  85. Yeo A.E., Matsumoto A., Hisada M., Shih J.W., Alter H.J., Goedert J.J.: Effect of hepatitis G virus infection on progression of HIV infection in patients with hemophilia. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Ann. Intern. Med.* **132**, 959–963 (2000)
  86. Yu X., Weber I.T., Harrison R.W.: Prediction of HIV drug resistance from genotype with encoded three-dimensional protein structure. *BMC Genomics*, DOI: 10.1186/1471-2164-15-s5-s1 (2014)
  87. Zampino R., Pickering J., Iqbal M., Gaud U., Thomas H.C., Karayiannis P.: Hepatitis G virus/GBV-C persistence: absence of hypervariable E2 region and genetic analysis of viral quasiespecies in serum and lymphocytes. *J. Viral Hepat.* **6**, 209–218 (1999)

Paweł Nawrotek<sup>1</sup>\*, Adrian Augustyniak<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wpłynęło w lipcu 2015 r.

1. Wstęp. 2. Charakterystyka nanomateriałów. 3. Zastosowanie nanomateriałów w mikrobiologii. 4. Nanomateriały pochodzenia mikrobiologicznego. 5. Oddziaływanie nanomateriałów na mikroorganizmy środowiskowe. 6. Podsumowanie

#### Nanotechnology in microbiology – selected aspects

*Abstract:* Microbiology plays an important role in nanotechnology, especially that the natural environment (particularly soil) is considered to be the main reservoir of modern molecular nanomaterials, which may influence its inhabitants – microorganisms. Variety of shapes, sizes and properties predestine nanomaterials for tools in the development of many life aspects and associated disciplines, including medicine, agriculture and biotechnology. At the same time, the present knowledge regarding consequences of the interaction between, e.g., environmental microorganisms and nanomaterials (such as silica nanospheres, carbon nanotubes, or graphene oxide flakes modified with titanium dioxide, copper or silver) seems to be insufficient. It is problematic to predict distant outcome and significance of the exposition to such nanostructures. Therefore, it is fundamental to describe the interactions between nanomaterials and living organisms, including bacteria and fungi, which constitute the first barrier between the nanotechnological products and the natural environment. Undertaking the steps for health and environment protection is particularly required when nanomaterials are used for agrotechnical purposes, e.g., exploitation of nanomaterials-containing fertilisers. On the other hand, there are new possibilities of the nanomaterials production with the use of appropriate bacteria. Furthermore, it appears that microorganisms may be stimulated by the nanomaterials to overcome certain problems in the industrial processes.

1. Introduction. 2. Characterization of nanomaterials 3. Application of nanomaterials in microbiology 4. Nanomaterials of microbiological origin 5. Effect of nanomaterials on environmental microorganisms 6. Summary

---

**Słowa kluczowe:** nanotechnologia, nanomateriały, mikroorganizmy środowiskowe, interakcja, biotechnologia

**Key words:** nanotechnology, nanomaterials, environmental microorganisms, interaction, biotechnology

---

## 1. Wstęp

Nanotechnologia jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin nauki XXI wieku. Jej osiągnięcia wykorzystywane są głównie w przemyśle i medycynie. O skali wytwarzania produktów nanotechnologicznych może świadczyć fakt, iż na świecie powstaje ich kilkadziesiąt tysięcy ton rocznie [56]. Istnieje wiele rodzajów nanomateriałów i nanocząstek opartych na pierwiastkach chemicznych, takich jak: krzem, węgiel, tytan, srebro, pallad, złoto, platyna itp. [1]. W zależności od przeznaczenia wykorzystuje się różne rodzaje struktur, w tym same nanomateriały lub nanocząstki wchodzące w skład modyfikowanych powierzchni użytkowych [13]. Istotnym aspektem i zarazem wyzwaniem nanotechnologii jest wykorzystywanie właściwości prze-

ciwdrobnoustrojowych nanomateriałów. Dzięki temu produkcja aktywnych nanostruktur ma szerokie grono odbiorców i jest wykorzystywana w wielu aspektach życia codziennego [69]. Liczne korzyści wynikające ze stosowania produktów nanotechnologicznych nie powinny jednak przysłaniać możliwych zagrożeń będących skutkiem ich masowej eksploatacji. Rosnąca liczba odpadów zawierających nanomateriały przenikając do środowiska naturalnego może w różnorodny sposób oddziaływać na żyjące w nim organizmy [12, 29]. Obecna wiedza na temat ewentualnych skutków interakcji organizmów żywych, w tym np. bakterii glebowych, z różnymi nanocząsteczkami jest wciąż niewystarczająca, trudno jest też przewidzieć jakie to może mieć znaczenie bądź jakie mogą być tego odległe konsekwencje. W niniejszej pracy scharakteryzowano

---

\* Autor korespondencyjny: Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, al. Piastów 45, 70-311 Szczecin; tel: +48 91 44 96 710; fax: +48 91 45 41 642; e-mail: pawel.nawrotek@zut.edu.pl

wybrane nanomateriały znajdujące zastosowanie w mikrobiologii, z uwzględnieniem nanomateriałów pochodzenia mikrobiologicznego, a także przedstawiono najnowsze wyniki badań dotyczących ich oddziaływania na mikroorganizmy środowiskowe oraz wskazano perspektywy wynikające ze stosowania nanomateriałów i problemów z tym związanych.

## 2. Charakterystyka nanomateriałów

Nanomateriał definiuje się jako strukturę zbudowaną z jednej lub wielu rodzajów cząsteczek, której wielkość (przynajmniej w jednej płaszczyźnie) mieści się w przedziale od 0,1 do 1000 nm. Przedrostek „nano” pochodzi z języka greckiego i w dosłownym tłumaczeniu oznacza „karzeł”. Skalą, w której należy posługiwać się określeniem „nano” jest zakres odnoszący się do miliardowych części całości mieszczący się w granicach od  $10^{-9}$  do  $10^{-11}$  [47].

Nanomateriały wytwarzane są podczas procesów fizycznych, syntezy chemicznej oraz biologicznej – wewnątrzkomórkowo lub na powierzchni komórek mikroorganizmów [41]. Generalnie produkcja nanomateriałów prowadzona jest dwoma sposobami. Pierwszy określany jako „top down” polega na zmniejszaniu materiału do osiągnięcia nanoskali, z kolei drugi, zwany „bottom up” przebiega odwrotnie i polega na łączeniu ze sobą atomów i molekuł do momentu osiągnięcia odpowiedniej wielkości [48]. Wykorzystanie

metod mikrobiologicznych do tworzenia nanomateriałów zyskuje wymiar proekologiczny i ściśle wpisuje się w działania związane z tzw. „zieloną chemią” [33]. Zasadniczą zaletą tego podejścia jest również możliwość znacznego ograniczenia kosztów produkcji nanomateriałów w stosunku do pozostałych sposobów ich syntezy. Ponadto, nanomateriały produkowane są wówczas z pominięciem szkodliwych dla środowiska związków chemicznych, przez co mogą charakteryzować się potencjalnie niższym poziomem toksyczności względem komórek [1, 33]. Wybrane rodzaje nanomateriałów wytwarzanych przez komórki bakteryjne i grzybowe zestawiono w tabeli I.

W zasadniczej klasyfikacji nanomateriałów uwzględnia się, takie parametry jak: wielkość – 0,1–1000 nm; kształt – płaskie, trójkątne, sferyczne, piramidalne, oktaedralne, sześciennie, nieregularne; struktura – porowata, nieporowata; złożoność budowy – zbudowane z cząsteczek jednego rodzaju lub z cząsteczek dwóch i więcej rodzajów; sposób wytwarzania – synteza fizyczna, chemiczna oraz biologiczna. Aktualnie nanomateriały różnicuje się także na wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe [1, 33, 41].

## 3. Zastosowanie nanomateriałów w mikrobiologii

Nanomateriały znajdują różnorodne zastosowania w mikrobiologii. Stanowią alternatywę dla obecnie stosowanych metod unieszkodliwiania patogenów [28],

Tabela I  
Przykłady nanomateriałów wytwarzanych przez bakterie i grzyby

|          | Nanomateriał                | Mikroorganizm  | Wielkość (nm) | Źródło |
|----------|-----------------------------|--|---------------|--------|
| Bakterie | AgNPs                       | <i>Arthrobacter gangotriensis</i> , <i>Pseudomonas antarctica</i> , <i>P. proteolytica</i> , <i>P. meridiana</i> | 6–13          | [64]   |
|          | AuNPs                       | <i>Marinobacter pelagius</i>   | 10            | [62]   |
|          |                             | <i>Thermomonospora</i> sp.   | 8–40          | [3]    |
|          |                             | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | 15–30         | [32]   |
|          | CdS NPs                     | <i>Brevibacterium casei</i>  | 10–30         | [52]   |
|          | CdS QD                      | <i>Escherichia coli</i> (GM)   | 6             | [43]   |
|          | CdTe QD                     | <i>Escherichia coli</i>  | 10–30         | [8]    |
|          | greigite NPs                | BW-1   | bd            | [39]   |
|          | magnetite NPs               | <i>Thiobacillus thioparus</i>  | bd            | [19]   |
| PHB NPs  | <i>Brevibacterium casei</i> | 100–125  | [53]          |        |
| Grzyby   | AgNPs                       | <i>Trichoderma viride</i>  | 5–40          | [21]   |
|          |                             | <i>Fusarium oxysporum</i>  | 5–15          | [2]    |
|          |                             | <i>Aspergillus fumigatus</i>   | 5–25          | [10]   |
|          |                             | drożdże MKY3   | 2–5           | [35]   |

AgNPs – nanocząstki srebra; AuNPs – nanocząstki złota; CdS NPs – nanocząstki siarczku kadmu; CdS QD – kropki molekularne siarczku kadmu; CdTe QD – kropki molekularne tellurku kadmu; greigite NPs – nanocząstki greigitu; magnetite NPs – nanocząstki magnetytu; PHB NPs – nanocząstki kwasu polihydroksymasłowego; GM – szczerp genetycznie modyfikowany; bd – brak danych



mogą być nośnikami aktywnych związków o działaniu bakteriobójczym [18, 21], a także mają zastosowanie w produkcji szczepionek [45]. Należy podkreślić, iż możliwość wykorzystywania mikroorganizmów do wytwarzania nanomateriałów jest zagadnieniem zyskującym coraz większe znaczenie wśród mikrobiologów i biotechnologów [47, 63].

Jak już wspomniano niezmiernie istotnym i popularnym przykładem zastosowania nanomateriałów w mikrobiologii jest wykorzystywanie ich właściwości antimikrobiologicznych. Efektem tego trendu są liczne możliwości stosowania określonych nanomateriałów w medycynie, np. w profilaktyce i terapii chorób bakteryjnych, przemyśle spożywczym, kosmetycznym, rolnictwie podczas prac związanych z użyźnianiem gleby, a także budownictwie do produkcji cementów o wzmoczonych właściwościach antybakteryjnych [12, 15, 26, 69].

Generalnie przyjmuje się, że właściwości antybakteryjne nanomateriałów zwiększają się wraz ze zmniejszeniem wielkości cząstek [54]. Dotychczas odnotowano różne mechanizmy oddziaływania nanostruktur na komórki bakteryjne oparte na ich przenikaniu do wnętrza komórki, agregacji na jej powierzchni oraz wytwarzaniu w środowisku zewnętrznym reaktywnych rodników tlenu [28]. Właściwości antybakteryjne wykazuje wiele rodzajów nanomateriałów. Szczególnie dużą grupę stanowią te, które zawierają metale, takie jak: srebro, złoto, miedź, pallad lub platyna [1]. Podobne właściwości wykazują również nanostruktury oparte na tlenkach metali, czyli nanotlenkach, w tym np. ditlenku tytanu ( $TiO_2$ ) i tlenku cynku ( $ZnO$ ) [49].

Dużym zainteresowaniem badaczy ze względu na silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, cieszą się nanocząstki srebra, często stosowane do zwalczania patogenów bakteryjnych z rodzaju *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Staphylococcus* oraz *Pseudomonas* [17, 63]. Fayaz i wsp. [21] podają, że nanocząstki srebra wytwarzane przez grzyb z gatunku *Trichoderma viride* wzmacniały działanie antybiotyków, takich jak: ampicylina, kanamycyna, erytromycyna i chloramfenikol. Ten sam typ nanocząstek wykazywał także wysoką skuteczność przeciwko enterokrwotocznym szczepom *E. coli* O157: H7 oraz metycylinoopornym szczepom *S. aureus* (MRSA) [54]. Nanometale oddziałują na komórki bakteryjne w różnorodny sposób. Stwierdzono, że nanocząstki srebra przyłączają się do komórek i wywołują uwolnienie substancji, do których agregują. Nanocząstki złota indukują formowanie biofilmu i gromadzą się w jego obrębie. Z kolei, struktury oparte na platynie powodują uszkodzenie ściany komórkowej i wpływ cytozolu [16, 40].

Tlenki metali, w tym przede wszystkim ditlenek tytanu i tlenek cynku, wykazują działanie antybakteryjne poprzez efekt fotokatalityczny powstający w następstwie aktywacji światłem [49]. Właściwości bakte-

riobójcze wykazują także nanomateriały przygotowane na bazie kwasu tytanowego (nano-trititanate –  $H_2Ti_3O_7$ ). Pan i wsp. [51] wykazali użyteczną właściwość tego nanomateriału polegającą na tym, że zmiana kształtu i wielkości obniżały jego toksyczność względem komórek eukariotycznych przy jednoczesnym zachowaniu właściwości bakteriobójczych.

Znaczący efekt toksyczności wobec bakterii uzyskiwany jest także poprzez funkcjonalizowanie nanostruktur określonymi nanocząstkami. W szczególności dotyczy to nanomateriałów krzemionkowych, które mogą być modyfikowane, np. ditlenkiem tytanu lub miedzią. Właściwości antybakteryjne tak modyfikowanych nanostruktur potwierdzono m.in. w przypadku testowego szczepu *Escherichia coli* [13]. Bibbs i wsp. [11] wykazali, że nanostruktury z poliwinylpiperolidonu (PVP) modyfikowane srebrem, wykazywały wysoką toksyczność względem dwoinki *Streptococcus pneumoniae*. Funkcjonalizowane mogą być ponadto inne nanomateriały włączając w to nanorurki węglowe oraz płatki tlenku grafenu [27, 60].

Nanomateriały są również wykorzystywane jako nośniki związków o działaniu antimikrobiologicznym. Fayaz i wsp. [21] dowodzą, że mogą one być nie tylko nośnikami dla antybiotyków, ale także działac z nimi synergistycznie. Interesującym zastosowaniem nanomateriałów może być możliwość wykorzystania ich jako adjuwantów w szczepionkach. W ten sposób wykorzystywane mogą być m.in. nanocząsteczki chitozanu, które wprawdzie nie wykazują właściwości immunomodulujących, jednakże mogą stanowić nośnik dla innych immunomodulatorów [45]. Medyczne zastosowanie mogą mieć też nanostruktury magneytu i greigitu pochodzenia bakteryjnego [9, 57]. Na bazie nanocząstek magneytu możliwe jest opracowanie potencjalnej terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem cząsteczek magnetycznych, którą teoretycznie można prowadzić dwiema drogami. Pierwsza, polegałaby na przyłączeniu do powierzchni nanomateriału substancji antynowotworowej i skierowaniu go przy pomocy pola magnetycznego do miejsca objętego guzem. Druga, opierałaby się na zmianach kierunku pola magnetycznego umożliwiających zdeponowanie nanomateriału w ognisku chorobowym i jednocześnie jego rozgrzanie, prowadzące do unieszkodliwienia nowotworu na drodze termicznej. Magneyt znajduje też zastosowanie w diagnostyce obrazowej, np. z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego (MRI) [22, 46].

Potencjał aplikacyjny nanomateriałów nie ogranicza się jedynie do zastosowań medycznych. Trwają prace nad wykorzystaniem nanocząstek w nawozach stosowanych w rolnictwie [15]. Ciekawym aspektem jest również możliwość wykorzystania bakteriofagów do przenoszenia nanomateriałów. Metoda określana jako „phage display” polega na ekspozycji na powierzchni

faga określonych bioaktywnych nanostruktur, np. nanocząstek złota, które mogą być wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej oraz diagnostyce [66]. Ponadto, możliwe staje się już stosowanie nanocząstek organicznych, takich jak liposomy, które mogą być bardzo pomocne w prowadzeniu ukierunkowanej terapii skierowanej przeciwko specyficznym komórkom nowotworowym [24].

#### 4. Nanomateriały pochodzenia mikrobiologicznego

W ostatnich latach odnotowuje się coraz większe zainteresowanie produkcją nanomateriałów z wykorzystaniem bakterii i grzybów, a także eksponowaniem nanostruktur na powierzchni cząstek wirusowych [33, 47, 57]. Wydaje się, iż synteza nanomateriałów z wykorzystaniem komórek mikroorganizmów może odgrywać szczególne dużą rolę w nanotechnologii. Nanomateriały wytworzone przez pojedynczą komórkę są ujednoczone pod względem kształtu i wielkości, co stanowi duże utrudnienie w przypadku tradycyjnych technologii ich pozyskiwania. Dobrym przykładem są bakterie magnetotaktyczne, które wytwarzają w swoich komórkach magnetosomy zawierające magnetyt i greigit [9, 57]. Substancje te mogą stanowić źródło nanomateriałów przeznaczonych do zastosowań biomedycznych, podobnie jak nanocząsteczki metali pozyskiwane metodami biogenicznymi wykorzystywane, np. w kierunkowej terapii przeciwnowotworowej [33]. Potencjalne medyczne zastosowanie mogą mieć także nanocząstki siarczku kadmu (*CdS*) opłaszczone kwasem polihydroksymasłowym (PHB) syntetyzowane przez *Brevibacterium casei*. Fluorescencyjne właściwości tych nanostruktur mogą zostać wykorzystane do precyzyjnego obrazowania skupisk komórek nowotworowych [52]. Z kolei, szczepy pałeczek z rodzaju *Pseudomonas* są zdolne do wewnątrzkomórkowego syntetyzowania nanostruktur zbudowanych z metali ciężkich, takich jak selen i kadm, co związane jest z ich opornością na metale ciężkie oraz zdolnością do redukcji selenianu sodu [6]. Gatunek *Pseudomonas aeruginosa* stanowi ponadto efektywne źródło surfaktantów, które mogą zostać wykorzystane podczas chemicznej syntezy nanocząstek zawierających srebro [20].

Znaczący potencjał biotechnologiczny w zakresie otrzymywania nanocząstek mogą wykazywać również powszechnie występujące w środowisku promieniowce. Podczas pilotażowych badań własnych ustalono, że izolat glebowy z rodzaju *Streptomyces* posiadał zdolność do wewnątrzkomórkowej akumulacji tytanu w obszarach odpowiadających umiejscowieniu ziaren polifosforanu [5]. Potencjalną możliwość wykorzystania tych bakterii w syntezie nanomateriałów, np. nanocząstek srebra, podkreślają niektórzy autorzy [14, 37, 67].

Nanostruktury molekularne mogą być dodatkowo syntetyzowane przez mikroorganizmy modyfikowane genetycznie. W badaniach Mi i wsp. [43] do komórek *E. coli* wklonowano insert, który umożliwiał wytwarzanie nanocząstek *CdS* w postaci tzw. nano kropek (QD – quantum dots), które charakteryzowały się unikalnymi właściwościami optycznymi. Metodami inżynierii genetycznej doprowadzono także do syntezy nanocząstek złota za pośrednictwem bakterii z gatunku *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* oraz *P. savastanoi* [4].

Obok udziału w syntezie samych nanomateriałów mikroorganizmy mogą również z nimi oddziaływać, czego efektem może być stymulacja ich aktywności. Na podstawie badań Ge i wsp. [23] można przypuszczać, że kontakt z nanomateriałem obecnym w środowisku może spowodować wzrost aktywności metabolicznej określonych drobnoustrojów, w tym przede wszystkim zwiększenie sekrecji metabolitów wtórnych. Z kolei, z badań przeprowadzonych przez Maurer-Jones i wsp. [42] wynika, że zastosowanie nanocząstek ditlenku tytanu w hodowli *Shewanella oneidensis* prowadziło do zwiększenia sekrecji flawin. W badaniach własnych także potwierdzono, że ten nanotlenek aktywowany promieniami UV może stymulować komórki *Streptomyces* sp. przyspieszając sekrecję egzopolimerów [5]. Praktyczne wnioski ze swoich badań wysnuli w tym kontekście Larsen i wsp. [38], którzy wykazali, że komórki *E. coli* eksponowane na kontakt z nanocząstkami chitozanu ulegały przyspieszonej agregacji. Autorzy ci zasugerowali, że zjawisko to może znaleźć zastosowanie, np. podczas separowania komórek bakteryjnych w przypadku wykrywania kontaminacji zakłócających kontrolowany przebieg procesu fermentacji.

Warto podkreślić, iż nanomateriały mogą także wzmacniać działanie antybiotyków, chociaż jednocześnie zwiększają ryzyko horyzontalnego transferu genów oporności [59]. Qiu i wsp. [59] zaobserwowali, że częstotliwość wymiany plazmidów zawierających sekwencje wielolekooporności, pomiędzy *E. coli* a *Salmonella* spp., wzrastała nawet dwustukrotnie po ich kontakcie z nanomateriałami zawierającymi tlenki glinu, tytanu, krzemu oraz żelaza. Konieczne są dalsze badania pogłębiające ten interesujący aspekt nanotechnologicznego wymiaru mikrobiologii.

#### 5. Oddziaływanie nanomateriałów na mikroorganizmy środowiskowe

Zwiększające się zapotrzebowanie na nanomateriały w różnych dziedzinach życia powoduje ciągły wzrost ich produkcji. Oszacowano, iż w 2012 roku na świecie wyprodukowano dziesiątki tysięcy ton nanomateriałów, w tym największej dwutlenku tytanu – do 10 000 ton.

Produkcja innych nanomateriałów, takich jak:  $CeO_2$ ,  $FeO_x$ ,  $AlO_x$ ,  $ZnO$  czy nanorurek węglowych (CNT) wahała się między 100 a 1000 ton rocznie, natomiast wytwarzanie nanokrzemionki ( $SiO_2$ ) osiągnęło wielkość ponad 10 000 ton/rok [56]. Nanostruktury molekularne mogą przedostawać się do środowiska naturalnego różnymi drogami, np. poprzez bezpośrednie dodawane ich do gleby w postaci komponentów środków ochrony roślin [34] lub w postaci odpadów. Niekontrolowane uwalnianie tego rodzaju materiału do środowiska stanowi przedmiot coraz większego zainteresowania zarówno ze strony producentów, jak i ekologów. Jednocześnie brak jest precyzyjnych uwarunkowań prawnych dotyczących zagospodarowania odpadów przemysłu nanotechnologicznego, a także wiarygodnych metod badawczych umożliwiających prowadzenie nadzoru nad przedostawaniem się nanomateriałów do ekosystemów [25, 29, 30].

Wykazano szereg negatywnych skutków jakie nanomateriały mogą powodować w środowisku, włączając w to zaburzenie bioróżnorodności społeczności mikroorganizmów glebowych, wpływ na obieg pierwiastków oraz biomagnifikację poprzez przenoszenie zakumulowanych przez mikroorganizmy nanomateriałów na wyższe poziomy troficzne [70]. Ponadto, wzrost ilości nanostruktur w środowisku może zwiększać potencjalne ryzyko negatywnych oddziaływań na ludzi. Shvedova i wsp. [65] wskazują na korelację pomiędzy wdychaniem nanorurek węglowych a zwiększaniem się trudności w leczeniu zapalenia płuc na tle bakteryjnym.

Nanostruktury, które przedostają się do środowiska nie tracą swojej toksyczności. Może to stanowić problem dla prawidłowego funkcjonowania różnych ekosystemów, a w szczególności sposób także mikrobiomu gleby. Stwierdzono, że bakterie glebowe są bardzo wrażliwe na działanie nanomateriałów opartych na ditlenku tytanu oraz tlenku cynku [23]. Natomiast Nogueira i wsp. [50] wykazali wpływ zarówno organicznych, jak i nieorganicznych, nanomateriałów na różnorodność społeczności drobnoustrojów glebowych. Ponadto, wyniki badań przeprowadzonych na nanomateriałach zbudowanych z ditlenku tytanu, krzemianu tytanu, selenku kadmu oraz złota, dowiodły, że struktury te charakteryzują się wysoką toksycznością wobec bakterii z rodzaju *Salmonella*. Stwierdzono, że badane nanostruktury złota i krzemianu tytanu stanowiły jednocześnie w przypadku tych bakterii czynniki genotoksyczne [55]. W innej pracy potwierdzono, że nanocząstki srebra wykazywały właściwości bakteriobójcze wobec bakterii zasiedlających glebę pochodzącą ze strefy arktycznej. Zaburzenia w funkcjonowaniu konsorcjów drobnoustrojów glebowych, w szczególności bakterii wiążących azot z rodzaju *Bradyrhizobium*, mogą prowadzić do zakłócenia cyklu obiegu pierwiastków [36]. Częściowo potwierdziły to badania Priester

i wsp. [58], którzy przeanalizowali skład pierwiastkowy soi wzrastającej w glebie kontaminowanej nanomateriałami zawierającymi nanotlenki cezu i cynku. Obecność nano- $CeO_2$  w glebie wywołała zaburzenia w wiązaniu azotu oraz doprowadziła do zmniejszenia plonowania. Jednocześnie nanomateriały złożone z  $ZnO$  zostały zakumulowane przez jadalne części tej rośliny.

Potencjalny wpływ nanomateriałów na biomagnifikację dobrze ilustrują badania przeprowadzone na przykładzie pierwotniaka z gatunku *Tetrahymena thermophila*. W jego przypadku odnotowano bowiem wzrost stężenia nanomateriałów zawierających dwutlenek tytanu w następstwie wchłonięcia bakterii *P. aeruginosa*, które je wcześniej zakumulowały [44]. W podobnych badaniach dowiedziono także bioakumulacji nanocząstek zawierających selen i kadm [70]. Unrine i wsp. [68] opisali ten proces w kontekście nanocząstek złota, przy czym ich praca koncentrowała się przede wszystkim na oznaczaniu obecności nanomateriałów w organizmach zajmujących wyższe poziomy troficzne. Z kolei, Bang i wsp. [7] wykazali toksyczność dwutlenku tytanu względem rozwielitek.

Pomimo stopniowego rozwoju badań dotyczących oddziaływania nanomateriałów na mikroorganizmy środowiskowe, nadal nie jest znana ich specyficzna reakcja na kontakt z nanostrukturami molekularnymi. Wydaje się, że nanocząstki posiadające właściwości antymikrobiologiczne nie doprowadzają do eradykacji wszystkich bakterii. Badania przeprowadzone przez Yang i wsp. [71] wykazały, że szczep *P. aeruginosa* PAO1 posiadał mechanizmy obronne chroniące go przed działaniem kropek molekularnych zawierających kadm czy selen. W innej pracy stwierdzono, że pałeczki *P. aeruginosa* mogą również dyspergować aglomeraty  $TiO_2$ , co może świadczyć o potencjalnej zdolności tych mikroorganizmów do usuwania (biodegradacji) nanomateriałów ze środowiska [31]. Podobne właściwości względem metali ciężkich nagromadzonych w środowisku mogą wykazywać też promieniowce z rodzaju *Streptomyces*, w tym zwłaszcza szczepy, które wykształciły wysoką oporność na izotopy uranu [61]. Udowodniono, że na drodze ko-metabolizmu mogą być rozkładane także nanorurki węglowe przy udziale konsorcjum bakterii, w skład którego wchodzi takie gatunki jak: *Burkholderia kururiensis*, *Delftia acidovorans* i *Stenotrophomonas maltophilia* [72].

## 6. Podsumowanie

Mikrobiologia odgrywa ważną rolę w nanotechnologii, tym bardziej, że środowisko (zwłaszcza gleba) jest obecnie głównym rezerwuarem nowoczesnych nanomateriałów molekularnych, umożliwiając im wpływ zarówno na procesy, jak i mikroorganizmy w niej

występujące. Różnorodność kształtów, rozmiarów oraz właściwości czyni nanomateriały niezwykle przydatnym narzędziem rozwoju wielu dziedzin życia, w tym medycyny, rolnictwa i biotechnologii. Jednocześnie aktualna wiedza na temat ewentualnych skutków interakcji, m.in. mikroorganizmów środowiskowych z określonymi nanocząsteczkami, takimi jak: nanosfery krzemowe, nanorurki węglowe lub płatki tlenku grafenu modyfikowane dwutlenkiem tytanu, miedzią czy srebrem, wydaje się wciąż niewystarczająca. Trudno jest przewidzieć odległe konsekwencje lub znaczenie ekspozycji na takie nanostruktury. Brakuje również odpowiednich i precyzyjnych uwarunkowań prawnych dotyczących obrotu nanomateriałami oraz zasad regulujących ich bezpieczne stosowanie. W związku z tym istnieje ciągła potrzeba opisywania zależności pomiędzy nanomateriałami a kontaktującymi się z nimi organizmami żywymi, w tym przede wszystkim bakteriami i grzybami glebowymi, stanowiącymi pierwszą barierę pomiędzy produktami nanotechnologicznymi a środowiskiem naturalnym. Implikuje to zarówno ochronę zdrowia i środowiska, jak i działania agrotechniczne, takie jak możliwość zastosowania nowych nawozów zawierających nanomateriały, mimo że ich oddziaływanie na ekosystemy glebowe i wodne nie zostało dokładnie zbadane. Z drugiej strony, należy pamiętać, że stosowane są już alternatywne metody otrzymywania nanomateriałów z wykorzystaniem kompetentnych w tym zakresie bakterii, a dodatkowo, istnieje potencjalna możliwość stymulowania aktywności metabolicznej niektórych mikroorganizmów przez wybrane nanomateriały. Skuteczne metody oceny oddziaływań mikroorganizm-nanomateriał mogą doprowadzić do uniknięcia negatywnych konsekwencji uwalniania nanostruktur do środowiska (ekonano-ryzko) oraz przyczynić się do opracowania nowych technologii pozwalających na osiągnięcie korzystnych rezultatów prozdrowotnych, proekologicznych, a także przemysłowych.

## Piśmiennictwo

- Adil S.F., Assal M.E., Khan M., Al-Warthan A., Siddiquia M.R.H., Liz-Marzán L.M.: Biogenic synthesis of metallic nanoparticles and prospects toward green chemistry. *Dalton Trans.* **44**, 9709–9717 (2015)
- Ahmad A., Mukherjee P., Senapati S., Mandal D., Khan M.I., Kumar R., Sastry M.: Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **28**, 313–318 (2003)
- Ahmad A., Senapati S., Khan M.I., Kumar R., Sastry M.: Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel extremophilic actinomycete, *Thermomonospora* sp. *Langmuir*, **19**, 3550–3553 (2003)
- Attaran N., Eshghi H., Rahimizadeh M., Mashreghi M., Bakavoli M.: Genetically modified luminescent bacteria *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas savastanoi*, and wild type bacterium *Vibrio fischeri* in biosynthesis of gold nanoparticles from gold chloride trihydrate. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **4**, DOI:10.3109/21691401.2014.942457 (2014)
- Augustyniak A., Cendrowski K., Nawrotek P., Barylak M., Mijowska E.: Humic acid-like substances secretion as a response of *Streptomyces* sp. to UV-light activated titania/silica nanospheres (w) 6<sup>th</sup> European Bioremediation Conference, red. N. Kalođerakis, F. Fava, E. Manousaki, Chania 2015, s. 169
- Ayano H., Miyake M., Terasawa K., Kuroda M., Soda S., Sakaguchi T., Ike M.: Isolation of a selenite-reducing and cadmium-resistant bacterium *Pseudomonas* sp. strain RB for microbial synthesis of CdSe nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* **117**, 576–581 (2014)
- Bang S.H., Le T., Lee S.K., Kim P., Kim J.S., Min J.: Toxicity assessment of titanium (IV) oxide nanoparticles using *Daphnia magna* (Water flea). *Environ. Health Toxicol.* **26**, DOI: 0.5620/eht.2011.26.e20111002 (2011)
- Bao H., Lu Z., Cui X., Qiao Y., Guo J., Anderson J.M., Li C.M.: Extracellular microbial synthesis of biocompatible CdTe quantum dots. *Acta Biomater.* **6**, 3534–3541 (2010)
- Bazylinski D.A., Frankel R.B., Heywood B.R., Mann S., King J.W., Donaghay P.L., Hanson A.K.: Controlled biomineralization of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) and greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>) in a magnetotactic bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3232–3239 (1995)
- Bhainsa K.C., D'Souza S.F.: Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **47**, 160–164 (2006)
- Bibbs R.K., Harris R.D., Peoples V.A., Barnett C., Singh S.R., Dennis V.A., Coats M.T.: Silver polyvinyl pyrrolidone nanoparticles exhibit a capsular polysaccharide influenced bactericidal effect against *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Microbiol.* **5**, DOI:10.3389/fmicb.2014.00665 (2014)
- Borm P.J.A., Oberdorfer J. i wsp.: The potential risk of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part. Fibre Toxicol.* **3**, DOI:10.1186/1743-8977-3-11 (2006)
- Cendrowski K., Peruzynska M., Markowska-Szczupak A., Chen X., Wajda A., Lapczuk J., Kurzawski, M., Kalenczuk R., Drozdziak M., Mijowska E.: Mesoporous silica nanospheres functionalized by TiO<sub>2</sub> as a photoactive antibacterial agent. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **4**, DOI:10.4172/2157-7439.1000182 (2013)
- Chauhan R., Kumar A., Abraham J.: A biological approach to the synthesis of silver nanoparticles with *Streptomyces* sp. JARI and its antimicrobial activity. *Sci Pharm.* **81**, 607–621 (2013)
- Chen H., Yada R.: Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. *Trend. Food Sci. Tech.* **22**, 585–594 (2011)
- Chwalibog A., Sawosz E., Hotowy A., Szeliga J., Mitura S., Mitura K., Grodzik M., Orłowski P., Sokolowska A.: Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *Int. J. Nanomedicine*, **5**, 1085–1094 (2010)
- Durán N., Marcato P.D., Conti R.D., Alves O.L., Costa F.T.M., Brocchi M.: Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *J. Braz. Chem. Soc.* **21**, 949–959 (2010)
- Eckhardt S., Brunetto P.S., Gagnon J., Priebe M., Giese B., Fromm K.M.: Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chem. Rev.* **113**, 4708–4754 (2013)
- Elcey C.D., Kuruvilla A.T., Thomas D.: Synthesis of magnetite nanoparticles from optimized iron reducing bacteria isolated from iron ore mining sites. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **3**, 408–417 (2014)
- Farias C.B.B., Silva A.F., Rufino R.D., Luna J.M., Souza J.E.G., Sarubbo L.A.: Synthesis of silver nanoparticles using a bio-

- surfactant produced in low-cost medium as stabilizing agent. *Electron. J. Biotechnol.* **17**, 122–125 (2014)
21. Fayaz A.M., Balaji K., Girilal M., Yadav R., Kalaichelvan P.T., Venketesan R.: Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **6**, 103–109 (2010)
  22. Feng M., Lu Y., Yang Y., Zhang M., Xu Y., Gao H., Dong L., Xu W., Yu S.: Bioinspired greigite magnetic nanocrystals: chemical synthesis and biomedicine applications. *Sci. Rep.* **3**, DOI:10.1038/srep02994 (2013)
  23. Ge Y., Schimel J.P., Holden P.A.: Identification of soil bacteria susceptible to  $TiO_2$  and  $ZnO$  nanoparticles. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6749–6758 (2012)
  24. Gray B.P., Li S., Brown K.C.: From phage display to nanoparticle delivery: Functionalizing liposomes with multivalent peptides improves targeting to a cancer biomarker. *Bioconjug. Chem.* **24**, 85–96 (2013)
  25. Grieger K.D., Linkov I., Hansen S.F., Baun A.: Environmental risk analysis for nanomaterials: Review and evaluation of frameworks. *Nanotoxicol.* **6**, 196–212 (2012)
  26. Guo M., Ling T., Poon C.: Nano- $TiO_2$ -based architectural mortar for NO removal and bacteria inactivation: Influence of coating and weathering conditions. *Cement Concrete Comp.* **36**, 101–108 (2013)
  27. Guo X., Mei N.: Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials. *J. Food. Drug. Anal.* **22**, 105–115 (2014)
  28. Hajipour M.J., Fromm K.M., Ashkarran A.A., Jimenez D., Laramendi I.R., Rojo T., Serpooshan V., Parak W.J., Mahmoudi M.: Antibacterial properties of nanoparticles *Trends Biotechnol.* **30**, 499–512 (2012)
  29. Hannah W., Thompson P.B.: Nanotechnology, risk and the environment: a review. *J. Environ. Monit.* **10**, 291–300 (2008)
  30. Hastings J., Jeliazkova N., Owen G., Tsiliki G., Munteanu C.R., Steinbeck C., Willighagen E.: eNanoMapper: harnessing ontologies to enable data integration for nanomaterial risk assessment. *J. Biomed. Seman.* **6**, DOI:10.1186/s13326-015-0005-5 (2015)
  31. Horst A.M., Neal A.C., Mielke R.E., Sislian P.R., Suh W.H., Madler L., Stucky G.D., Holden P.A.: Dispersion of  $TiO_2$  nanoparticle agglomerates by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 7292–7298 (2010)
  32. Husseiny M.I., Abd El-Aziz M., Badr Y., Mahmoud M.A.: Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **67**, 1003–1006 (2007)
  33. Ingale A.G., Chaudhari A.N.: Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: an eco-friendly approach. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **4**, DOI:10.4172/2157-7439.1000165 (2013)
  34. Khot L.R., Sankaran S., Maja J.M., Ehsani R., Schuster E.W.: Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. *Crop Protect.* **35**, 64–70 (2012)
  35. Kowshik M, Ashtaputre S., Kharrazi S., Vogel W., Urban J., Kulkarni S.K. Paknikar K.M.: Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3. *Nanotechnol.* **14**, 95–100 (2003)
  36. Kumar N., Shah V, Walker V.K.: Perturbation of an arctic soil microbial community by metal nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* **190**, 816–822 (2011)
  37. Kumar P.S., Balachandran C., Durairampanian V., Ramasamy D., Ignacimuthu S., Al-Dhab N.A.: Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using *Streptomyces* sp. 09 PBT 005 and its antibacterial and cytotoxic properties. *Appl. Nanosci.* **5**, 169–180 (2015)
  38. Larsen M.U., Seward M., Tripathi A., Shapley N.C.: Biocompatible nanoparticles trigger rapid bacteria clustering. *Biotechnol. Prog.* **25**, 1094–1102 (2009)
  39. Lefèvre C.T., Menguy N., Abreu F., Lins U., Pósfai M., Prozorov T., Pignol D., Frankel R.B., Bazylinski D.A.: A Cultured greigite-producing magnetotactic bacterium in a novel group of sulfate-reducing bacteria. *Science*, **334**, 1720–1723 (2011)
  40. Lemire J.A., Harrison J.J., Turner R.J.: Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 371–84 (2013)
  41. Li X., Xu H., Chen Z., Chen G.: Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *J. Nanomater.* DOI:10.1155/2011/270974 (2011)
  42. Maurer-Jones M.A., Gunsolus I.L., Meyer B.M., Christenson C.J., Haynes, C.L.: Impact of  $TiO_2$  nanoparticles on growth, biofilm formation, and flavin secretion in *Shewanella oneidensis*. *Anal. Chem.* **85**, 5810–5818 (2013)
  43. Mi C., Wang Y., Zhang J., Huang H., Xu L., Wang S., Fang X., Fang J., Mao C., Xu S.: Biosynthesis and characterization of CdS quantum dots in genetically engineered *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **153**, 125–132 (2011)
  44. Mielke R.E., Priester J.H., Werlin R.A., Gelb J., Horst A.M., Orias E., Holden P.A.: Differential growth of and nanoscale  $TiO_2$  accumulation in *Tetrahymena thermophila* by direct feeding versus trophic transfer from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 5616–5624 (2013)
  45. Mohan T., Verma P., Rao D.N.S.: Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *Indian J. Med. Res.* **138**, 779–795 (2013)
  46. Mornet S., Vasseur S., Grasset F., Veverka P., Goglio G., Demourgues A., Portier J., Pollert E., Duguet E.: Magnetic nanoparticle design for medical applications. *Prog. Solid State Chem.* **34**, 237–247 (2006)
  47. Narayanan K.B., Sakthivel N.: Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv. Colloid Interface Sci.* **156**, DOI:10.1016/j.cis.2010.02.001 (2010)
  48. Narayanan K.B., Sakthivel N.: Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Adv. Colloid Interface Sci.* **169**, 59–79 (2011)
  49. Ng A.M.C., Chan C.M.N., Guo M.Y., Leung Y.H., Djurišić A.B., Hu X., Chan W.K., Leung F.C.C., Tong S.Y.: Antibacterial and photocatalytic activity of  $TiO_2$  and  $ZnO$  nanomaterials in phosphate buffer and saline solution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 5565–5573 (2013)
  50. Nogueira V., Pereira R. i wsp.: Impact of organic and inorganic nanomaterials in the soil microbial community structure. *Sci. Total. Environ.* **424**, 344–50 (2012)
  51. Pan R., Liu Y., Chen W., Dawson G., Wang X., Li Y., Dong B., Zhu Y.: The toxicity evaluation of nano-trititanate with bactericidal properties in vitro. *Nanotoxicol.* **6**, 327–337 (2012)
  52. Pandian S.R.K., Deepak V., Kalishwaralal K., Gurunathan S.: Biologically synthesized fluorescent CdS NPs encapsulated by PHB. *Enzyme Microb. Tech.* **48**, 319–325 (2011)
  53. Pandian S.R.K., Deepak V., Kalishwaralal K., Muniyandi J., Rameshkumar N., Gurunathan S.: Synthesis of PHB nanoparticles from optimized medium utilizing dairy industrial waste using *Brevibacterium casei* SRKP2: a green chemistry approach. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **74**, 266–273 (2009)
  54. Paredes, D., Ortiz, C., Torres, R.: Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int. J. Nanomedicine*, **9**, 1717–1729 (2014)
  55. Pereira R., Rocha-Santos T.A.P., Antunes F.E., Rasteiro M.G., Ribeiro R., Goncalves F., Soares A.M.V.M., Lopes I.: Screening evaluation of the ecotoxicity and genotoxicity of soils

- contaminated with organic and inorganic nanoparticles: the role of ageing. *J. Hazard. Mater.* **194**, 345–354 (2011)
56. Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B.: Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J. Nanopart. Res.* **14**, DOI:10.1007/s11051-012-1109-9 (2012)
  57. Posfai M.L., Buseck P.R., Bazylinski D.A., Frankel R.B.: Iron sulfides from magnetotactic bacteria: Structure, composition, and phase transitions. *Am. Min.* **83**, 1469–1481 (1998)
  58. Priester J.H., Holden P.A. i wsp.: Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 14734–14735 (2012)
  59. Qiu Z., Yu Y., Chen Z., Jin M., Yang D., Zhao Z., Wang J., Shen Z., Wang X., Qian D., Huang A., Zhang B., Li J.: Nano-alumina promotes the horizontal transfer of multiresistance genes mediated by plasmids across genera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4944–4949 (2012)
  60. Rodrigues D.F., Jaisi D.P., Elimelech M.E.: Toxicity of functionalized single-walled carbon nanotubes on soil microbial communities: implications for nutrient cycling in soil. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 625–633 (2013)
  61. Schmidt A., Haferburg G., Schmidt A., Lischke U., Merten D., Ghergel F., Büchel G., Kothe E.: Heavy metal resistance to the extreme: *Streptomyces* strains from a former uranium mining area. *Chem. Erde*, **69**, 35–44 (2009)
  62. Sharma N., Pinnaka A.K., Raju M., Ashish F.N.U., Bhattacharyya M.S., Choudhury A.R.: Exploitation of marine bacteria for production of gold nanoparticles. *Microb. Cell Fact.* **11**, DOI:10.1186/1475-2859-11-86 (2012)
  63. Sharma V.K., Yngard R.A., Lin Y.: Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* **145**, 83–96 (2009)
  64. Shivaji S., Madhu S., Singh S.: Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria, *Process Biochem.* **46**, 1800–1807 (2011)
  65. Shvedova A.A., Kagan V.E., i wsp.: Sequential exposure to carbon nanotubes and bacteria enhances pulmonary inflammation and infectivity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **38**, 579–590 (2008)
  66. Souza G.R., Christianson D.R., Staquicini F.I., Ozawa M.G., Snyder E.Y., Sidman R.L., Miller J.H., Arap W., Pasqualini R.: Networks of gold nanoparticles and bacteriophage as biological sensors and cell-targeting agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1215–1220 (2006)
  67. Tsibakhashvili N.Y., Shklover V.Y., i wsp.: Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces glaucus* and *Spirulina platensis*. *Adv. Sci. Lett.* **4**, DOI:10.1166/asl.2011.1915 (2011)
  68. Unrine J.M., Shoults-Wilson W.A., Zhurbich O., Bertsch P.M., Tsyusko O.V.: Trophic transfer of Au nanoparticles from soil along a simulated terrestrial food chain. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 9753–9760 (2012)
  69. Weir A., Westerhoff P., Fabricius L., Goetz N.: Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 2242–2250 (2012)
  70. Werlin R., Priester J.H., Mielke R.E., Kramer S., Jackson S.P., Stoimenov K., Stucky G.D., Cherr G.N., Orias E., Holden P.A.: Biomagnification of cadmium selenide quantum dots in a simple experimental microbial food chain. *Nature Nanotechnol.* **6**, 65–71 (2011)
  71. Yang Y., Mathieu J.M., Chattopadhyay S., Miller J.T., Wu T., Shibata T., Guo W., Alvarez P.J.J.: Defense mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 against quantum dots and their released heavy metals. *ACS Nano*, **6**, 6091–6098 (2012)
  72. Zhang L., Petersen E.J., Habteselassie M.Y., Mao L., Huang Q.: Degradation of multiwall carbon nanotubes by bacteria. *Environ. Pollut.* **181**, 335–339 (2013)

Iwona Wojciechowska-Koszek<sup>1</sup>, Magdalena Mnichowska-Polanowska<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii i Diagnostyki Immunologicznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin

Wpłynęło w lipcu 2015 r.

1. Etiologia boreliozy. 2. Swoista, humoralna odpowiedź immunologiczna w przebiegu boreliozy. 3. Materiał i metody stosowane w diagnostyce boreliozy. 4. Testy serologiczne w diagnostyce boreliozy. 4.1. ELISA. 4.2. Western-blot czy Immunoblot 5. Interpretacja wyników. 5.1. Wyniki fałszywie ujemne. 5.2. Wyniki fałszywie dodatnie. 6. Podsumowanie

#### Serological testing for Lyme disease in laboratory practice

**Abstract:** Lyme disease (LD) is a tick-borne multisystem disease caused by *B. burgdorferi sensu lato* genospecies. The disease requires mandatory reporting and registration since 2014. The laboratory testing for LD is desirable because the diversity and non-specificity of symptoms can complicate the diagnosis. Laboratory data can support or cast doubt on a clinical suspicion of LD. A laboratory method of choice for LD diagnosis is two-tier serological testing recommended by European and Polish guidelines. The choice of target antigens for LD serodiagnostics is still a great challenge due to borrelial antigen heterogeneity in European countries. Commercial tests are still being modified to improve sensitivity and/or specificity of LD serodiagnostics by means of emerging technology advances. The use of species-specific borrelial antigens can be promising for determination of LD etiology, but does not eliminate the cross-reactivity completely. The uniform standardized interpretation criteria are still unrealistic because of different methodologies used in laboratory practice. The serodiagnostics of Lyme disease should be carried out in a laboratory by specialists who understand the limitations of commercial kits [1.13], and cooperate with clinicians regarding laboratory reporting and diagnostic doubts.

1. Etiology. 2. Specific humoral immunoresponse in the course of Lyme disease. 3. Material and methods used in Lyme disease diagnostics. 4. Serodiagnostics of Lyme disease. 4.1. ELISA. 4.2. Western-blot or Immunoblot 5. Criteria for interpretation. 5.1. False-negative results. 5.2. False-positive results. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** borelioza z Lyme, ELISA, OspC, VlsE, Western-blot

**Key words:** ELISA, Lyme borreliosis, OspC, VlsE, Western-blot

## 1. Etiologia boreliozy

Borelioza z Lyme jest wieloukładową chorobą zakaźną przenoszoną przez kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus* w obszarze europejskim. W Polsce od 2014 roku borelioza podlega obowiązkowemu zgłaszaniu i rejestracji a zachorowanie w każdym przypadku musi być związane z wcześniejszym narażeniem na kontakt z kleszczem. Po raz pierwszy została opisana pod nazwą „choroby z Lyme” (LD) w 1977 roku w miejscowości Old Lyme w USA [5, 18]. W 1982 Willy Burgdorfer wyizolował z kleszczy krętki – czynnik etiologiczny, który nazwano *Borrelia burgdorferi*. Z punktu widzenia systematyki krętki należą do Gram-ujemnych bakterii wewnątrzkomórkowych, rzędu *Spirochetales*, rodziny *Spirochaetaceae*, rodzaju *Borrelia* [29, 46, 53]. Od pierwszej izolacji i identyfikacji odkryto kilka genogatunków krętków z rodzaju *Borrelia* tworzących kompleks *B. burgdorferi sensu lato*. W Europie zakażenie wywołują głównie trzy genogatunki przenoszone transstadialnie i transowarialnie w cyklu rozwojowym kleszcza. Należą do nich: *B. garinii*, *B. afzelii* i *B. burgdorferi sensu stricto*. Obecnie w obszarze europejskim

rejestruje się zachorowania wywołane przez inne genogatunki: *B. spielmanii*, *B. bisettii* i *B. valaisiana* [6, 29, 38, 39, 42, 48, 53].

## 2. Swoista, humoralna odpowiedź immunologiczna w przebiegu boreliozy

Krętki uruchamiają w organizmie żywiciela szereg nieswoistych jak i swoistych reakcji immunologicznych, a złożone zdolności do unikania mechanizmów obronnych gospodarza utrudniają ich eliminację. W 2–3 tygodniu od zakażenia pojawiają się przeciwciała IgM (przeciwciała wczesne) jako wynik aktywacji swoistej humoralnej odpowiedzi immunologicznej [22]. Swoiste IgM osiągają szczyt produkcji w 2 miesiącu od zakażenia, a następnie w większości przypadków ich ilość stopniowo spada i rozpoczyna się produkcja IgG (przeciwciała późne). Chociaż IgM silniej aktywują dopełniacz i procesy fagocytozy, IgG są lepszym „narzędziem” w walce z patogenem ponieważ charakteryzują się wyższą swoistością i powinowactwem do antygenów *Borrelia*, a ich wysokie miana utrzymują się przez wiele lat [20, 22, 23].

\* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii i Diagnostyki Immunologicznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny, ul. Powstańców Wlkp. 72; 70-111 Szczecin; tel. 091 466 16 54; e-mail: rumianek1978@wp.pl

Wraz z rozwojem procesu chorobowego obserwuje się ewolucję produkcji obu klas przeciwciał. Silna odpowiedź humoralna, z wysokim stężeniem przeciwciał może utrzymywać się u niektórych zakażonych przez miesiące a nawet lata po skutecznym leczeniu [4, 5, 18]. Zmniejszenie stężenia swoistych przeciwciał może wskazywać na wyleczenie. Przeciwciała wczesnej odpowiedzi immunologicznej IgM skierowane są głównie przeciwko białku flageliny (p41) i gatunkowo-swoistemu powierzchniowemu białku OspC (Osp – outer surface protein) [5, 21, 28, 52]. Dla późnych stadiów choroby (zapalenie stawów, zanikowe zapalenie skóry, neuroborelioza czy neuropatia obwodowa) charakterystyczne są swoiste przeciwciała IgG produkowane głównie przeciwko gatunkowo-swoistemu antygenowi VlsE oraz białkom p39 i p58, a następnie p83/100, p53, p43, p30, p21, p14 i Osp17 [6, 7, 10, 14, 21]. Białko powierzchniowe VlsE jest wcześniej rozpoznawane przez przeciwciała IgG i silnie stymuluje produkcję przeciwciał, co może obniżyć produkcję przeciwciał wobec innych antygenów [23]. Przeciwciała swoiste przeciwko wymienionym białkom *Borrelia* mają znaczenie diagnostyczne, jednak mogą reagować krzyżowo z białkami kilku genogatunków [41, 54]. Homologię białek w obrębie genogatunków związaną z wytworzeniem przeciwciał krzyżowo reagujących należy uwzględnić przy projektowaniu i konstruowaniu testów do serologicznej diagnostyki boreliozy [11, 24, 54].

### 3. Materiał i metody stosowane w diagnostyce boreliozy

Prawidłowe postawienie rozpoznania zależy od odpowiednio dobranej metody diagnostycznej oraz interpretacji wyników w powiązaniu z obrazem klinicznym zakażenia [4, 5, 13, 18, 20]. W diagnostyce boreliozy można zastosować testy serologiczne, hodowlę komórkową oraz metody genetyczne z wykorzystaniem PCR [4, 5, 20]. Każda z metod posiada zarówno swoje zalety, jak i ograniczenia.

Diagnostyka serologiczna jest diagnostyką z wyboru, a wyniki testów serologicznych potwierdzają bądź podają w wątpliwość podejrzenie kliniczne. Uzyskanie wiarygodnego wyniku zależy od okresu pobrania materiału na badanie (krew, płyn mózgowo-rdzeniowy) jak i od interpretacji wyników [5, 18, 19, 20]. Zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych (PTEiLChZ) zaleca się wykonanie pierwszego badania u pacjenta z podejrzeniem boreliozy po upływie 3–4 tygodni od ekspozycji na kleszcza w celu uniknięcia wyniku fałszywie ujemnego. Wytworzenie minimalnej ilości przeciwciał wczesnych wykrywanych przez test serologiczny

zajmuje organizmowi od 2 do 4 tygodni. Przeciwciała IgM utrzymują się w krwioobieg pacjenta zakażonego maksymalnie do 6 miesięcy, niekiedy mogą utrzymywać się przez cały okres choroby, z kolei wysoki poziom IgG może być wykrywany po wielu latach od remisji choroby [18, 20].

Hodowla krętków na podłożu Barbour-Stoener-Kelly (BSK) trwa kilka miesięcy i jej czułość jest najwyższa (30–70%) dla biopłatów pobranych ze zmian skórnych u pacjentów z przewlekłym zanikowym zapaleniem skóry kończyn (*ACA-acrodermatitis chronica atrophicans*) [33, 48]. Do innych materiałów z których można prowadzić hodowlę należą: płyn mózgowo-rdzeniowy w przypadku neuroboreliozy, płyn stawowy czy biopłat maziówki w przypadku boreliozowego zapalenia stawów (LA – *Lyme arthritis*) [35, 50]. Czułość hodowli w przypadku płynu mózgowo-rdzeniowego wynosi jedynie 5% [50]. Pomimo, iż hodowla jest złotym standardem mikrobiologicznym, w odniesieniu do krętków nie ma zastosowania w rutynowym postępowaniu diagnostycznym. Hodowlę prowadzi się jedynie w pracowniach badawczo-naukowych [49].

Metody genetyczne z wykorzystaniem reakcji PCR powinny wykrywać sekwencje genogatunków występujących w Europie [38]. Klasyczny jakościowy PCR wykrywa jedynie materiał genetyczny krętków a więc zarówno przy żywych jak i martwych krętkach wynik może być dodatni, informując jedynie o potencjalnej etiologii zakażenia, nie o jego aktywności [44]. W sferze badań naukowych pozostaje również zastosowanie ilościowej techniki real-time PCR, pomimo prób podejmowanych przez badaczy zajmujących się tą tematyką [3, 15]. Odsetek wyników dodatnich uzyskanych jakościowym i ilościowym testem genetycznym zależy od użytego materiału klinicznego (zmiany skórne, krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn stawowy, tkanki), typu techniki PCR oraz metod izolacji DNA [3, 37, 44]. Najniższy odsetek wyników PCR-dodatnich w porównaniu z testem serologicznym obserwowano dla krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego (10–30%), czyli najczęściej pobieranych materiałów klinicznych do diagnostyki boreliozy [3]. Najwyższy odsetek wyników PCR-dodatnich wykazano natomiast dla płynu stawowego i fragmentów tkanek (50–70%), które z kolei stanowią niewielki procent materiałów badanych rutynowo. Stosując PCR uzyskano również ujemne wyniki z krwi i z płynu mózgowo-rdzeniowego w przypadku pacjentów z rozpoznaną boreliozą [1, 3, 44]. Zaletą ilościowego PCR, przy jego standaryzacji, byłaby możliwość określenia specyfiki zakażenia oraz jego aktywności na podstawie ilości wykrywanego DNA, ocena progresji choroby oraz odpowiedzi na leczenie [15, 44]. W chwili obecnej dodatnie wyniki PCR z krwi obwodowej w przypadku ujemnych wyników badań serologicznych powinny być



interpretowane krytycznie, natomiast dodatnie wyniki z płynu stawowego powinny być rozpatrywane w kontekście dodatniej serologii [4, 15]. Ograniczeniem PCR, pomimo dostępności gotowych zestawów do izolacji krętków pozostaje brak standaryzacji w diagnozowaniu boreliozy występującej w Polsce [15, 19].

Zastosowanie testów „drugiego wyboru” czyli hodowli lub techniki PCR powinno ograniczyć się do sytuacji, w których mamy do czynienia z klinicznie i serologicznie niejednoznaczными wynikami [1, 18]. Dotyczy to zarówno pacjentów z zakażeniami, w przebiegu których pojawiają się przeciwciała w kompleksach immunologicznych, jak również pacjentów z niedoborami immunologicznymi, w szczególności niedoborami odpowiedzi swoistej humoralnej [18, 19].

Przy opracowywaniu nowych testów typu PCR jak również przy wyborze antygenów do badań serologicznych należy uwzględnić zróżnicowanie szczepów wywołujących zakażenia. Ze względu na zróżnicowanie genogatunków testy do diagnostyki boreliozy stosowane na kontynencie amerykańskim, nie nadają się do diagnostyki boreliozy nabywanej w Europie [28]. Wyniki badań surowic europejskich testowanych przez komercyjne zestawy wykorzystujące syntetyczny peptyd C6 z białka VlsE, dostępne na rynku amerykańskim korelują z wynikami uzyskanymi w testach europejskich, mimo to powinny być traktowane z ostrożnością [8].

#### 4. Testy serologiczne w diagnostyce boreliozy

Rozpoznanie boreliozy ze względu na zróżnicowany obraz kliniczny i niespecyficzność objawów wymaga potwierdzenia badaniem laboratoryjnym. Wszystkie postaci kliniczne powinny być weryfikowane za pomocą metod immunologicznych i genetycznych według zaleceń europejskich DGHM (German Society for Hygiene and Microbiology) i polskich PTEiLChZ [18, 20]. Wyjątkiem jest jedynie postać kliniczna z obecnością rumienia wędrującego (EM – *erythema migrans*). Rozpoznanie EM opiera się wyłącznie na obrazie klinicznym [33]. Jednak w postaciach nietypowych potwierdzenie laboratoryjne może być pomocne, ale dopiero po upływie co najmniej 2 tygodni od wystąpienia zmian [18, 20, 33, 34, 50].

Prawidłowa serodiagnostyka wymaga poznania i zrozumienia zastosowań oraz ograniczeń poszczególnych testów komercyjnych dostępnych na rynku [1, 4, 13, 19, 20]. Przy wyborze istotny jest dobór odpowiednich antygenów diagnostycznych oraz kryteriów interpretacyjnych [19, 20, 27, 49, 50, 52].

Serologiczna diagnostyka boreliozy z Lyme, najczęściej występującej choroby odkleszczowej w Polsce i w Europie wymaga oznaczenia dwóch klas przeciw-

ciał: IgM i IgG oraz wdrożenia schematu diagnostyki dwuetapowej; niestety nadal w wielu przypadkach nie jest to uwzględniane [1, 11, 18–20, 40, 50]. W Europie zgodnie z rekomendacją DGHM w pierwszym etapie są stosowane przesiewowe testy immunoenzymatyczne ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) lub immunofluorescencji pośredniej IIFA (Indirect Immunofluorescence Assay) [1, 18, 49, 50]. Wytyczne PTEiLChZ zalecają stosowanie testów ELISA. Wyniki badań Wojciechowska-Koszko i wsp. [52] wykazały wyższy odsetek wyników dodatnich w teście potwierdzenia, w przypadku zastosowania w diagnostyce przesiewowej immunofluorescencji pośredniej niż badań immunoenzymatycznych. W opinii autorów [2, 27, 52] przydatne byłyby kolejne wielośrodkowe badania porównawcze na szerszym panelu surowic.

Test przesiewowy wykonany techniką ELISA pozwala jedynie na wstępną detekcję przeciwciał przeciwko *Borrelia*, nie służy do potwierdzenia choroby i na jego podstawie nie można stawiać ostatecznej diagnozy [50, 52].

Wszystkie wyniki dodatnie lub graniczne (wątpliwe) uzyskane przy pomocy screeningu są weryfikowane w drugim etapie za pomocą testu Western-blot (WB) [1, 18, 50]. Zarówno test przesiewowy ELISA jak i test potwierdzenia WB powinny być zawsze wykonywane z dodatnią i ujemną próbą kontrolną. Jedynie takie testy, w których kontrole dają oczekiwany wynik mogą być interpretowane i mają wartość diagnostyczną [20].

Według zaleceń DGHM stosowane w diagnostyce boreliozy testy screeningowe powinny być na poziomie czułości  $\geq 90\%$  [24, 25]. Pomimo wprowadzania antygenów rekombinowanych testy przesiewowe ELISA niekoniecznie zyskały na swoistości, która wynosi 29–71% w zależności od zastosowanego antygeny. W związku z wysoką czułością ale niską swoistością testów ELISA, istnieje ryzyko pojawiania się wyników fałszywie dodatnich i w konsekwencji błędnych rozpoznań [50].

Test potwierdzenia WB ma na celu odrzucenie wyników fałszywie dodatnich zatem powinien posiadać jak najwyższą swoistość – przynajmniej 95% [18, 50]. Niska swoistość WB obniża wartość WB jako testu potwierdzenia [2]. Obecnie w diagnostyce serologicznej częściej stosuje się testy Immunoblot (IB) z antygenami rekombinowanymi niż klasyczne WB oparte wyłącznie na antygenach natywnych. Stosowanie antygenów rekombinowanych zmniejsza ryzyko wystąpienia reakcji krzyżowych, które pojawiają się często w trakcie stosowania antygenów natywnych. Badania naukowe porównujące WB i IB [9, 16, 21] wykazały, że oczyszczone i rekombinowane antygeny włączone w IB prowadziły do znaczącego wzrostu swoistości IB – 95% w porównaniu z WB – 76%. Testy nie różniły się istotnie statystycznie czułością, zaledwie 4% wyższą czułość notowano dla IB [16].

#### 4.1. ELISA

Test immunoenzymatyczny ELISA może być wykonywany metodą ilościową jak i półilościową o wysokiej czułości. Antygenami stosowanymi w tradycyjnych testach przesiewowych były całe komórki bakteryjne, jednak ostatnio stosowane testy zawierają oczyszczone antygeny bakteryjne, białka rekombinowane czy syntetyczne peptydy [2]. Zaleca się używanie testów ELISA II generacji (oczyszczone antygeny na drodze izolacji chemicznej) lub III generacji (antygeny rekombinowane). Testy II i III generacji i zmniejszają ryzyko nieswoistych reakcji krzyżowych, podnosząc jednocześnie czułość i swoistość oznaczenia [5, 48, 50]. Istnieje wysokie ryzyko reakcji krzyżowych przy zastosowaniu całych komórek bakteryjnych w formie lizatu, zatem nie jest zalecane stosowanie testów I generacji [2]. Nieswoiste reakcje krzyżowe mogą pojawiać się w przypadku diagnostyki boreliozy z Lyme prowadzonej u pacjentów z rozpoznaną chorobą autoimmunologiczną czy z zakażeniem wirusowym [9, 17, 36, 51].

Zaproponowano monitorowanie skuteczności wdrożonej antybiotykoterapii z użyciem testu ELISA, uzasadniając, że w przypadku skutecznie prowadzonej terapii poziom przeciwciał znamienne spada po 10–20 dniach od rozpoczęcia leczenia [4]. Według aktualnych zaleceń PTEiLChZ badania serologiczne nie mogą ostatecznie służyć do oceny skuteczności leczenia z powodu długiego utrzymywania się przeciwciał. Ocena powinna być oparta przede wszystkim o dynamikę obrazu klinicznego, gdyż nie występuje korelacja poziomu przeciwciał i obrazu klinicznego [9, 18].

#### 4.2. Western-Blot czy Immunoblot

Test WB stosowany w drugim etapie diagnostyki jest testem wyłącznie jakościowym. W przeciwieństwie do immunoenzymatycznego testu przesiewowego ELISA, WB ma niższą czułość, ale posiada wysoką swoistość [20, 36]. Należy pamiętać że zarówno testy typu WB jak również typu IB stosowane w końcowym etapie diagnostyki posiadają swoje zalety jak i wady. W przypadku testów WB, w których stosuje się lizat komórkowy czułość i swoistość zależy od genogatunku szczepu użytego jako antygen diagnostyczny. Zaletą użycia lizatu jest wykrycie większej ilości przeciwciał skierowanych przeciwko szerszemu spektrum białek, jednak wiąże się to z ryzykiem pojawienia się reakcji krzyżowych. Wadą lizatu jest trudność rozróżnienia frakcji swoistej od frakcji krzyżowo-reagującej [16, 17, 24, 47]. Dostępne testy IB cechują się podobną lub wyższą swoistością niż WB, ale niekoniecznie wyższą czułością [16, 26, 35, 43]. IB zawiera w swym składzie wyselekcjonowane, specyficzne białka rekombinowane należące do jednego

lub kilku genogatunków *Borrelia*. Możliwość detekcji swoistych przeciwciał skierowanych przeciw jednemu lub kilku genogatom *Borrelia* charakterystycznym dla danego regionu geograficznego wydaje się obiecująca. Mniejsze jest również ryzyko reakcji krzyżowych dzięki zastosowaniu gatunkowo-swoistych białek bądź ich fragmentów, które nie występują u innych drobnoustrojów. W praktyce ustalenie specyfiki zakażenia jest trudne pomimo zastosowania gatunkowo-specyficznych antygenów dla klasy IgM: OspC lub OspC advanced (30% bardziej specyficzne od rekombinowanego antygeny OspC) jak również antygenów rekombinowanych dla klasy IgG: VlsE. Wykorzystując antygeny rekombinowane w diagnostyce serologicznej boreliozy z Lyme nie można jednoznacznie wykluczyć zjawiska homologii antygenów różnych genogatunków jak również możliwości zakażenia z udziałem kilku genogatunków (dane własne, niepublikowane). W tabeli I zestawiono antygeny *Borrelia* służące do wykrywania swoistych przeciwciał w przebiegu boreliozy z Lyme, stosowane w testach WB/IB [48].

#### 5. Interpretacja wyników

Zgodnie z zalecaną interpretacją wyników, końcowy raport laboratoryjny nie powinien generować wyników granicznych w zakresie diagnostyki serologicznej boreliozy z Lyme; wynik w ujęciu laboratoryjnym powinien być dodatni lub ujemny [36]. Interpretując wyniki badań serologicznych musimy zdawać sobie sprawę, że wykonanie testu potwierdzenia nie rozwiązuje wszystkich problemów związanych z diagnostyką choroby z Lyme, testy wymagają ciągłych udoskonaleń i ujednolicenia kryteriów interpretacji wyników [35, 49, 54].

Wybór dowolnej kombinacji ELISA – IB dostarczanych przez różnych producentów wpływa na odsetek wyników dodatnich, interpretację i uniemożliwia porównywanie wyników między laboratoriami stosującymi różne metodologie. Problemy dotyczą standaryzacji w zakresie rodzaju reagujących antygenów, jak również ich ilości, która pozwoliłaby na uznanie wyniku za dodatni [19, 31]. Stosując diagnostykę z wyboru niemożliwe jest również odróżnienie od siebie zakażenia aktywnego i przebytego w przeszłości [4, 49].

Zwykle oznaczenie wykonuje się w dwóch klasach, ale w interpretacji niezwykle ważne jest rozpoznanie lub podejrzenie kliniczne, znajomość postaci klinicznej lub co najmniej fazy choroby (wczesna, późna). W późnym okresie choroby znaczenie przeciwciał IgM jest kontrowersyjne [23], natomiast powinny być obecne przeciwciała klasy IgG, w późnej neuroboreliozy zawsze w płynie mózgowo-rdzeniowym [25]. We wczesnych postaciach brak wykrywalnych poziomów swoistych IgM jest możliwe oraz zwykle brak IgG [25].

Tabela I  
Zestawienie antygenów *Borrelia* sp. stosowanych w testach WB/IB do wykrywania swoistych przeciwciał anti-*Borrelia* w diagnostyce serologicznej boreliozy z Lyme

| Antygen                               | Opis antygeny   | Znaczenie diagnostyczne  |
|---------------------------------------|---|--|
| VlsE peptyd C6                        | Variable major protein (VMP)<br>– zmienne białko błonowe      | <b>Wysoce czułe i specyficzne</b> ; kluczowe w wykrywaniu IgG      |
| OspC / p25                            | Białko powierzchniowe   | <b>Wysoce specyficzne</b> ; kluczowe w wykrywaniu IgM              |
| OspA / p31                            | Białko powierzchniowe   | <b>Wysoce specyficzne</b> , wykrywane u ludzi po szczepieniu (USA) |
| p58 ( <i>B. garinii</i> PBi) / OppA-2 | Białko wiążące oligonukleotydy                                | <b>Wysoce specyficzne i czułe</b>                                  |
| p39 / BmpA                            | <i>Borrelia</i> membrane protein A (BMPA)<br>– białko błonowe | <b>Wysoce specyficzne i czułe</b>                                  |
| p83 / p100                            | Białko błonowe  | <b>Specyficzne</b>   |
| p41 / Fla                             | Składnik flageliny  | Niespecyficzne   |
| BBK32                                 | Białko wiążące fibronektynę                                   | <b>Specyficzne</b>   |
| p20 / BBQ03                           | Brak doniesień w literaturze                                  | Brak doniesień w literaturze                                       |
| BBA36                                 | Białko powierzchniowe   | Niska czułość  |
| BBO323                                | Białko związane z błoną                                       | Niska czułość  |
| pG / OspF                             | Białko powierzchniowe   | Niska czułość  |
| p58 ( <i>B. afzelii</i> PKo)          | Niescharakteryzowane  | <b>Specyficzne</b>   |
| p43                                   | Niescharakteryzowane  | <b>Specyficzne</b>   |
| p30                                   | Niescharakteryzowane  | <b>Specyficzne</b>   |
| p14                                   | Niescharakteryzowane  | Brak doniesień w literaturze                                       |
| <i>Borrelia</i> lipidy                | Składniki błony   | <b>Specyficzne</b>   |
| p18 / DbpA / Osp17 / p17              | DbpA (Decorinbinding protein A)<br>– białko wiążące dekorynę  | <b>Kluczowe w wykrywaniu IgG</b>                                   |
| p21 / BBK53                           | Białko zewnątrz błonowe                                       | Brak doniesień w literaturze                                       |
| p19 / BBN38 / Crasp3 / ErpP           | Białko wiążące czynnik H                                      | Niska czułość  |
| p18 / BBP38 / OspE                    | Białko powierzchniowe wiążące czynnik G                       | <b>Czułe</b>   |

Sposób interpretacji zwykle podaje producent testu. Wielu producentów zaleca interpretację opracowaną przez Center for Disease Control and Prevention (CDC) w USA. Jednak stosowanie tych kryteriów może być przyczyną błędnych interpretacji, gdyż ocena wyników badań na terenie Europy musi uwzględniać genogatunki chorobotwórcze z terenu Europy [19, 31]. W roku 2000 EUCALB (European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis) przeprowadził wielośrodkowe badania mające na celu ocenę najbardziej charakterystycznych pasm dla zakażenia *Borrelia burgdorferi*. Na tej podstawie podjęto próbę skonstruowania zasad interpretacji wyników przeprowadzonych testem WB, jednak nie wyodrębniono jednoznacznych kryteriów, które dałyby wysoki poziom czułości i swoistości we wszystkich sześciu laboratoriach [20, 43, 45].

### 5.1. Wyniki fałszywie dodatnie

Przyczyną wyników fałszywie dodatnich mogą być reakcje krzyżowe przeciwciał anti-*Borrelia* z takimi samymi lub podobnymi antygenami występującymi u innych gatunków [32]. Podobieństwo dotyczy nastę-

pujących antygenów: p41, p58-60, p66, p68, p71, p73, które mogą występować m.in. u krętków *Treponema pallidum* czy *Ehrlichia* [9, 17, 51]. Reakcje fałszywie dodatnie mogą być również wynikiem podobieństwa antygenowego białek *Borrelia* z antygenami wirusów z rodziny *Herpesviridae* (EBV, CMV) [17, 51]. W przypadku pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi występuje zwiększona produkcja przeciwciał, zwłaszcza w klasie IgG, zatem może dochodzić do nieswoistego wiązania z białkami *Borrelia* [36, 47]. Wykonywanie testów serologicznych u pacjentów z niecharakterystycznymi objawami ogólnymi jak również u osób zdrowych wiąże się również z ryzykiem uzyskania wyników fałszywie dodatnich [12]. Eliminacja wyników fałszywie dodatnich jest konieczna, aby uniknąć niepotrzebnej antybiotykoterapii [23, 51].

### 5.2. Wyniki fałszywie ujemne

Lokalna produkcja przeciwciał, np.: w płynie mózgowo-rdzeniowym lub płynie stawowym oraz tendencja patogenu do maskowania swojej obecności poprzez wewnątrzkomórkowe bytowanie może być przyczyną

falszywie ujemnych wyników [49]. Antybiotykoterapia wdrożona w początkowych stadiach choroby może osłabiać odpowiedź humoralną i generować wyniki fałszywie ujemne, pomimo jednoznacznych objawów klinicznych choroby [4]. Ryzyko uzyskania wyników fałszywie ujemnych istnieje również u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi oraz w przypadku ostrej infekcji krętkami *Borrelia*. W obu wymienionych przypadkach może dojść do powstania kompleksów pomiędzy krążącymi przeciwciałami a antygenami bakteryjnymi. Powstałe kompleksy immunologiczne nie mogą być wykrywane przez powszechnie stosowane techniki serologiczne [36, 51].

W rutynowym postępowaniu diagnostycznym surowice niereaktywne w teście ELISA nie są poddawane dalszemu testowaniu [18]. Jednak badania Ang i wsp. [2] jak również badania własne (dane niepublikowane) potwierdzają iż ta sama próbka niereaktywna w teście ELISA może być immunoreaktywna w teście IB. Z powyższych danych wynika iż technika ELISA może „przepuszczać” wyniki dodatnie. Dobrą praktyką byłoby potwierdzanie nie tylko wątpliwych i dodatnich ale również ujemnych wyników testu przesiewowego w uzasadnionych przypadkach, np.: w odniesieniu do pacjentów z klinicznym podejrzeniem boreliozy z Lyme [2, 52]. Pozostaje jednak pytanie o czułość testu przesiewowego, czas w jakim pobrano próbkę do badań oraz o refundację i tak już wysokich kosztów badań serologicznych z zakresu diagnostyki boreliozy z Lyme. We wczesnych stadiach boreliozy, kiedy miano przeciwciał jest niskie testy serologiczne mogą być fałszywie ujemne z powodu niskiej czułości. Odpowiedni czas pobrania materiału do badań serologicznych (3–4 tygodnie od momentu zakażenia) może ograniczyć generowanie wyników fałszywie ujemnych [18, 20, 33, 34, 50].

## 6. Podsumowanie

Złożona budowa krętków oraz ich zmienność antygenowa wpływa na konieczność konstruowania i standaryzacji odpowiednio czułych i swoistych testów laboratoryjnych, które wciąż ulegają technologicznym modyfikacjom [11, 25, 27, 30]. Stosowanie dowolnej kombinacji testów ELISA – WB/IB dostarczanych przez różnych producentów oraz brak ujednoczonych kryteriów interpretacji stwarza trudności diagnostyczne i niemożność porównywania wyników między laboratoriami [19, 31]. Wykorzystując gatunkowo-swoiste antygeny istnieją wciąż ograniczone możliwości w określaniu specyfiki zakażenia. Diagnostyka z wyboru prowadzona w oparciu o najnowsze testy nie eliminuje całkowicie reakcji krzyżowych. Nadal nie można jednoznacznie wykluczyć zjawiska homologii

antygenów różnych genogatunków jak również nie można rozstrzygnąć problemu jedno/wielogenogatunkowej etiologii boreliozy z Lyme [11, 24]. Serologiczna diagnostyka boreliozy w praktyce laboratoryjnej nie jest łatwa, wymaga wiedzy specjalistycznej, wyboru i stosowania wiarygodnych testów, umiejętności interpretacji oraz badań porównawczych nad immunoreaktywnością surowic w oparciu o najnowsze testy dostępne na rynku. Bardzo ważna jest wiedza dotycząca pobrania materiału na badanie oraz prowadzenie diagnostyki zgodnie z wytycznymi PTEiLChZ [18–20, 50]. W polskich laboratoriach praktykuje się jeszcze jednostopniowy schemat badania, co potwierdzają dane NIZP-PZH [40]. Diagnostyka boreliozy powinna być prowadzona w laboratoriach, gdzie specjaliści rozumieją ograniczenia poszczególnych testów komercyjnych dostępnych na rynku [1, 13], jak również współpracują z klinicystą w zakresie omówienia wyników i wyjaśniania wątpliwości.

## Piśmiennictwo

1. Agüero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P.: Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 484–509 (2005)
2. Ang C.W., Notermans D.W., Hommes M., Simoons-Smit A.M., Herremans T.: Large differences between test strategies for the detection of anti-*Borrelia* antibodies are revealed by comparing eight ELISAs and five immunoblots. *Eur J. Clin. Microbiol.* **30**, 1027–1032 (2011)
3. Babady N.E., Sloan L.M., Vetter E.A., Patel R., Binnicker M.J.: Percent positive rate of Lyme real-time polymerase chain reaction in blood, cerebrospinal fluid, synovial fluid and tissue. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **62**, 464–466 (2008)
4. Bielecki M., Kowal K.: Borelioza – diagnostyka, leczenie, powikłania. *Terapia*, **257**, 50–57 (2011)
5. Biesiada G., Czepiel J., Leśniak M., Garlicki A., Mach T.: Analiza czynników epidemiologicznych, objawów klinicznych i markerów serologicznych w przebiegu boreliozy. *Przegl. Epidemiol.* **67**, 181–183 (2010)
6. Biesiada G., Czepiel J., Salamon D., Garlicki A., Dziubek A., Maziarz B., Mach T.: Analiza genotypów krętków *Borrelia burgdorferi* w grupie chorych na boreliozę. *Przegl. Lek.* **66**, 511–512 (2009)
7. Branda J.A., Linskey K., Kim Y.A., Steere A.C., Farraro M.J.: Two-tiered antibody testing for Lyme disease with use of 2 enzyme immunoassays, a whole-cell sonicate enzyme immunoassay followed by a VlsE C6 peptide enzyme immunoassay. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 541–547 (2011)
8. Branda J.A., Strle F., Strle K., Sikand N., Ferraro M.J., Steere A.C.: Performance of United States serologic assays in the diagnosis of Lyme borreliosis acquired in Europe. *Clin. Infect. Dis.* **57**, 333–340 (2013)
9. Bruckbauer H.R., Preac-Mursic V., Fuchs R., Wilske B.: Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**, 224–232 (1992)
10. Bryksin A.V., Godfrey H.P., Carbonaro C.A., Wormser G.P., Agüero-Rosenfeld M.E., Cabello F.C.: *Borrelia burgdorferi* BmpA, BmpB, and BmpD proteins are expressed in human infection and contribute to P39 immunoblot reactivity in

- patients with Lyme disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**, 935–940 (2005)
11. Chandra A., Latov N., Wormser G.P., Marques A.R., Alaedini A.: Epitope mapping of antibodies to VlsE protein of *Borrelia burgdorferi* in post-Lyme disease syndrome. *Clin. Immunol.* **141**, 103–110 (2011)
  12. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: Występowanie przeciwciał swoistych dla *B. burgdorferi* u ludzi zdrowych na terenie Polski. *Przegl. Epidemiol.* **56**, 33–38 (2002)
  13. DeBiasi R.L.: A concise critical analysis of serologic testing for the diagnosis of Lyme disease. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **16**, 450 (2014)
  14. Embers M.E., Jacobs M.B., Johnson B.J., Philipp M.T.: Dominant epitopes of the C6 diagnostic peptide of *Borrelia burgdorferi* are largely inaccessible to antibody on the parent VlsE molecule. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 931–936 (2007)
  15. Exner M.M., Lewinski M.A.: Isolation and detection of *Borrelia burgdorferi* DNA from cerebral spinal fluid, synovial fluid, blood, urine, and ticks using Roche MagNA Pure system and real-time PCR. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **46**, 235–240 (2003)
  16. Fawcett P.T., Rosé C.D., Gibney K.M., Doughty R.A.: Comparison of immunodot and western blot assays for diagnosing Lyme borreliosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**, 503–506 (1998)
  17. Fawcett P.T., Gibney K.M., Rose C.D., Dubbs S.B., Doughty R.A.: Frequency and specificity of antibodies that crossreact with *Borrelia burgdorferi* antigens. *J. Rheumatol.* **19**, 582–587 (1992)
  18. Flisiak R., Pancewicz S.: Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme – zalecenia Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych – 2011. <http://pteilchz.org.pl/standardy.htm>, data wejścia 14.07.2015.
  19. Gałęzowska E.: Borelioza – problemy z diagnostyką laboratoryjną. *Alma Mater*, **4**, 140–145 (2010)
  20. Gąsiorowski J., Witecka-Knysz E., Knysz B., Gerber H., Gładysz A.: Diagnostyka boreliozy. *Med. Pr.* **58**, 439–447 (2007)
  21. Goettner G., Schulte-Spechtel U., Hillermann R., Liegl G., Wilske B., Fingerle V.: Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3602–3609 (2005)
  22. Gołąb J., Jakóbiński M., Lasek W., Stokłosa T.: Odporność przeciw bakteriom wewnątrzkomórkowym (w) Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2008, s. 317–319
  23. Grzeszczuk A.: Borelioza w praktyce klinicznej. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2010
  24. Hauser U., Lehnert G., Wilske B.: Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2241–2247 (1999)
  25. Heikkilä T., Seppälä I., Saxen H., Panelius J., Yrjänäinen H., Lahdenne P.: Species specific serodiagnosis of Lyme arthritis and Neuroborreliosis due to *Borrelia burgdorferi stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* by using Decorin binding protein. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 453–460 (2002)
  26. Hernández-Nova B., Rodríguez-Torres A. i wsp.: Utility of a commercial immunoblot kit (BAG-*Borrelia* blot) in the diagnosis of the preliminary stages of Lyme disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **47**, 321–329 (2003)
  27. Hunfeld K.P., Ernst M., Zachary P., Jaulhac B., Sonneborn H.H., Brade V.: Development and laboratory evaluation of a new recombinant ELISA for the serodiagnosis of Lyme disease. *Wien. Klin. Wochenschr.* **114**, 580–585 (2002)
  28. Ivanova L., Christova I., Neves V., Aroso M., Meirelles L., Brisson D., Gomes-Solecki M.: Comprehensive seroprofiling of sixteen *B. burgdorferi* OspC: implications for Lyme disease diagnostics design. *Clin. Immunol.* **132**, 393–400 (2009)
  29. Kondrusik M.: Biologia i morfologia krętka *Borrelia burgdorferi* (w) Borelioza z Lyme, red. T. Hermanowska-Szpakowicz. AM, Białystok, 1999, s. 3–6
  30. Krupka I., Knauer J., Lorentzen L., O'Connor T.P., Saucier J., Straubinger R.K.: *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in Europe induce diverse immune responses against C6 peptides in infected mice. *Clin. Vaccine Immunol.* **16**, 1546–1562 (2009)
  31. Kubiak K., Dzika E., Równiak J., Dziedziech M., Dzisko J.: Seroprevalence of Lyme disease and genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in patients diagnosed with borreliosis in the Province of Warmia-Masuria in north-eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **19**, 203–207 (2012)
  32. Liang F.T., Aberer E., Cinco M., Gern L., Hu C.M., Lobet Y.N., Ruscio M., Voet P.E. Jr, Weynants V.E., Philipp M.T.: Antigenic conservation of an immunodominant invariable region of the VlsE lipoprotein among European pathogenic genospecies of *B. burgdorferi* SL. *J. Infect. Dis.* **182**, 1455–1462 (2000)
  33. Lipsker D.: Dermatological aspects of Lyme borreliosis. *Méd. Mal. Infect.* **37**, 540–547 (2007)
  34. Jovićić V.Lj., Grego E.M., Lako B.L., Ristović B.M., Lepšanić Z.A., Stajković N.T.: Improved serodiagnosis of early Lyme borreliosis: immunoblot with local *Borrelia afzelii* strain. *APMIS*, **111**, 1053–1059 (2003)
  35. Marangoni A., Sparacino M., Mondardini V., Cavrini F., Storni E., Donati M., Cevenini R., Sambri V.: Comparative evaluation of two enzyme linked immunosorbent assay methods and three Western Blot methods for the diagnosis of culture-confirmed early Lyme borreliosis in Italy. *New Microbiol.* **28**, 37–43 (2005)
  36. Miąskiewicz K., Walczak E., Roguska K., Noworyta J., Brasse-Rumin M., Biernacka E., Legatowicz-Koprowska M., Palacz A., Lewandowski P., Ząbek J.: Propozycja nowego podejścia metodowego i interpretacji wyników oznaczeń przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* – analiza składu przeciwciał krążących kompleksów immunologicznych. *Reumatologia*, **49**, 328–334 (2011)
  37. Moniuszko A., Dunaj J., Zajkowska J., Czupryna P., Świerzbńska R., Guziejko K., Aleksiejczuk P., Barry G., Kondrusik M., Pancewicz S.: Comparison of detection of *Borrelia burgdorferi* DNA and anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in patients with erythema migrans in north-eastern Poland. *Post. Dermatol Alergol.* **32**, 11–14 (2015)
  38. Mukhacheva T.A., Kovalev S.Y.: *Borrelia* spirochetes in Russia: genospecies differentiation by real-time PCR. *Ticks Tick-Borne Dis.* **5**, 722–726 (2014)
  39. Pancewicz S.A.: Borelioza z Lyme – zasady rozpoznawania i leczenia. *Pediatr. Med. Rodz.* **10**, 163–173 (2014)
  40. Paradowska-Stankiewicz I., Chreścijańska I.: Lyme disease in Poland in 2012. *Przegl. Epidemiol.* **68**, 275–277, 375–377 (2014)
  41. Rasiah C., Schiltz E., Reichert J., Vogt A.: Purification and characterization of a tryptic peptide of *Borrelia burgdorferi* flagellin, which reduces cross-reactivity in immunoblots and ELISA. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 147–154 (1992)
  42. Rauter C., Hartung T.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7203–7216 (2005)
  43. Robertson J., Gray J. i wsp.: A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2097–2102 (2000)
  44. Schwaiger M., Péter O., Cassinotti P.: Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi sensu lato* infections using a real-time PCR assay. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 461–469 (2001)
  45. Serology: tests in use. Immunoblot. <http://www.eucalb.com/> data wejścia: 14.07.2015

46. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F.: Lyme borreliosis. *Lancet*, **379**, 461–473 (2012)
47. Tokarska-Rodak M., Koziol-Montewka M., Fota-Markowska H., Bielec D., Modrzewska R., Pańczuk A.: Frequency and specificity of the antibodies against *Borrelia burgdorferi* tested by Western blot method in patients with symptoms of arthritis. *Cent. Eur. J. Immunol.* **33**, 220–223 (2008)
48. Tylewska-Wierzbowska S., Chmielewski T.: Borelioza z Lyme – rozpoznanie kliniczne i laboratoryjne. *Med. Zak.* **15**, 565–570 (2008)
49. Tylewska-Wierzbowska S., Chmielewski T.: Diagnostyka serologiczna boreliozy z Lyme – wytyczne europejskie. *Post. Mikrobiol.* **44**, 289–293 (2005)
50. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U.: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *Immunol. Med. Microbiol.* **49**, 13–21 (2007)
51. Witecka-Knysz E., Klimczak M., Lakwa K., Zajkowska J., Pancewicz S., Kondrusik M., Grzegorzczuk S., Świerzbńska R., Hermanowska-Szapowicz T.: Borelioza: dlaczego diagnostyka jest taka trudna? *Diagn. Lab.* **1**, 11–13 (2007)
52. Wojciechowska-Koszko I., Mączyńska I., Szych Z., Giedrys-Kalemba S.: Serodiagnosis of borreliosis: indirect immunofluorescence assay, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **59**, 69–77 (2011)
53. Woś H.: Borelioza, choroba przenoszona przez kleszcze. *Pediatr Pol.* **85**, 371–374 (2010)
54. Zajkowska J.M., Kondrusik M., Pancewicz S.A., Grygorczuk S., Jamiołkowski J., Stalewska J.: Porównanie wyników testu z antygenem VlsE (C6) oraz testów z zastosowaniem antygenów rekombinowanych u osób chorych na boreliozę z Lyme. *Pol. Merkuriusz Lek.* **23**, 95–99 (2007)

Tomasz Dzieciatkowski<sup>1, 2\*</sup>, Agata Sulowska<sup>2</sup>, Maciej Przybylski<sup>1, 2</sup><sup>1</sup>Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny

Wpłynęło w maju 2014 r.

1. Wstęp. 2. Diagnostyka serologiczna zakażeń *Candida* spp. 3. Diagnostyka serologiczna aspergillozy 4. Diagnostyka serologiczna kryptokokozy 5. Metody molekularne stosowane w diagnostyce grzybic inwazyjnych 6. Podsumowanie

### Serological and molecular diagnostic methods for invasive fungal infections

**Abstract:** Various species of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. remain the most common cause of invasive fungal infections, but other yeasts and filamentous fungi are emerging as significant pathogens. Invasive mycoses continue to be a significant cause of morbidity, especially in transplant recipients and/or in patients undergoing long-time antibiotic therapy. A reliable and early diagnostic method of fungal infections by detecting fungal DNA or invasiveness factors, such as (1→3)-β-D-glucan or antimycelial antibodies, have proven very useful in reducing associated mortality in affected patients. This article is a review of the literature on current serological and molecular methods used in invasive fungemia diagnostics.

1. Introduction. 2. Serological diagnostics of *Candida* spp. infections. 3. Serological methods in diagnostics of invasive aspergillosis. 4. Serological diagnostics of *Cryptococcus neoformans* infections. 5. Molecular methods used in the diagnosis of invasive fungemia. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** grzybice inwazyjne, ELISA, PCR, immunosupresja

**Keywords:** invasive fungemia, ELISA, PCR, immunosuppression

## 1. Wstęp

Ze względu na znaczące w ostatnich latach zwiększenie liczby zabiegów transplantacji narządów uczynionych oraz komórek krwiotwórczych, konieczne stało się opracowanie i wdrożenie nowych, czułych metod wykrywania grzybic układowych. Powinny być one wykorzystywane w rutynowej praktyce klinicznej, zwłaszcza u pacjentów z grup podwyższonego ryzyka wystąpienia zakażeń grzybiczych [12, 27]. Według wprowadzonych w 2008 przez EORTC/IFI (European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections) zrewidowanych zaleceń dotyczących definicji grzybic inwazyjnych, dodatni wynik badania wykonanego metodami biologii molekularnej lub serologicznymi jest jednym z kryteriów umożliwiających zdiagnozowanie prawdopodobnej (*probable*) grzybicy inwazyjnej. Metody niehodowlane stanowią istotny element laboratoryjnej diagnostyki inwazyjnych zakażeń grzybiczych, należy jednak podkreślić, że izolacja i hodowla pozostaje metodą najbardziej miarodajną – zgodnie z ustaleniami EORTC/IFI, wyizolowanie czynnika etiologicznego z materiału w warunkach fizjologicznych jałowego jest jedynym

kryterium mikrobiologicznym umożliwiającym zdefiniowanie pewnej (*proven*) grzybicy inwazyjnej [10].

Współczesna diagnostyka serologiczna grzybic inwazyjnych obejmuje wykrywanie w surowicy i/lub innych płynach ustrojowych:

- antygenów rozpuszczalnych,
- swoistych przeciwciał przeciwgrzybiczych oraz określanie ich miana.

Standardowe techniki serologiczne, takie jak immunodufuzja, testy precypitacyjne czy odczyn wiązania dopełniacza okazały się niewystarczająco czułe i swoiste, aby mogły być stosowane we współczesnej diagnostyce grzybic narządowych. Do metod wykorzystywanych obecnie w komercyjnych testach laboratoryjnych zalicza się:

- aglutynację lateksową (LA),
- metody immunofluorescencyjne: bezpośrednie (DIF) oraz pośrednie (IIF),
- metody immunoenzymatyczne: jakościowe (EIA) oraz ilościowe (ELISA).

Testy ilościowe, poprzez podanie miana antygeny czy przeciwciał, mogą służyć do obserwacji i monitorowania toczącego się zakażenia. Pozwala to na śledzenie samego procesu rozwoju grzybicy inwazyjnej,

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

jak i skuteczności zastosowanego leczenia. Należy jednak pamiętać, że badanie miana przeciwciał przeciwgrzybiczych (zwłaszcza w klasie IgM) jest utrudnione u pacjentów z niedoborami odporności, a uzyskane wyniki w tej grupie chorych mogą być fałszywie ujemne [27]. Podobnie na uwagę zasługuje fakt, iż obecnie używane metody traktują rozpuszczalne oligosacharydy ściany komórkowej konkretnych gatunków grzybów jak markery antygenowe zakażenia: podczas inwazyjnej formy infekcji utrzymują się one w krwiobiegu tylko przez pewien czas (od 8 do 96 godz.), ulegając nieustannej eliminacji w wyniku wiązania w kompleksach immunologicznych [27]. W związku z tym, niezwykle istotne jest regularne monitorowanie ich obecności w płynach ustrojowych chorych (surowicy krwi lub osoczu) – Rys. 1.

## 2. Diagnostyka serologiczna zakażeń *Candida* spp.

Zakażenia wywoływane przez grzyby drożdżopodobne w przeważającej większości powodowane są przez gatunek *Candida albicans*. Podobnie jak pozostałe grzyby należące do tego rodzaju, posiada on w swojej ścianie komórkowej mannan, który jest wysoce immunogennym antygenem polisacharydowym, indukującym odpowiedź humoralną [18]. Zjawisko to wykorzystano do diagnostyki inwazyjnej kandydozy opartej na równoległym monitorowaniu w surowicy krwi miana krążącego mannanu i przeciwciał anty-mannanowych u pacjentów z grup podwyższonego ryzyka [18, 28].

Ilościowy test immunoenzymatyczny Platelia® *Candida* Ag (Bio-Rad) może być stosowany do wykrywania szerokiego zakresu stężeń antygeny, a jego wysoka czułość analityczna (0,062 ng/ml) umożliwia monitorowanie zakażenia poczynając od wczesnych jego etapów. W metodzie tej wykorzystano monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko  $\alpha$ -1,5 oligomannozydom *Candida* spp. Test powinien być stosowany w diagnostyce układowej kandydozy u pacjentów z grup podwyższonego ryzyka, niezależnie od ich statusu immunologicznego i/lub stadium rozwoju fungemii [28]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wykrycie obecności antygeny mannanowego na wczesnym etapie zakażenia zależy w dużym stopniu od liczby i częstości oznaczeń wykonanych dla danego pacjenta. Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, iż czułość diagnostyczna testu Platelia *Candida* przy jednorazowym oznaczeniu w pojedynczej próbce surowicy krwi wynosi 58% [9], a wskaźnik ten wzrasta jeżeli badanie zostanie powtórzone w kolejnych próbkach krwi, pobranych od tego samego chorego. Oznacza to, że pojedynczy ujemny wynik na obecność antygeny nie wyklucza inwazyjnej formy kandydozy, co może być powodowane zbyt niskim stężeniem antygeny, który w przebiegu zakaże-

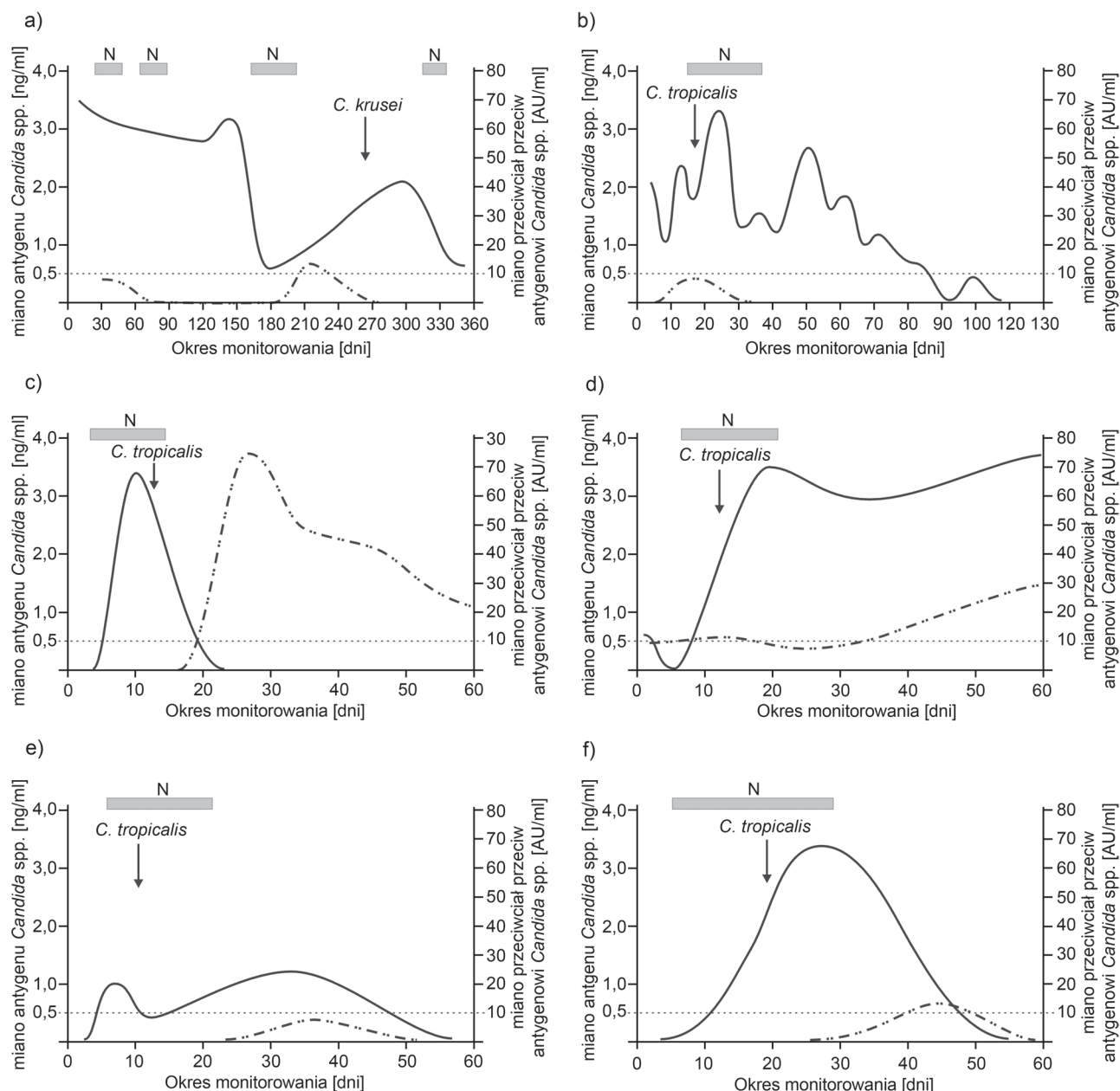
nia podlega szybkiej eliminacji z krwiobiegu. Test jest przydatny w rozpoznawaniu zakażeń o etiologii *C. albicans*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*, wykazuje natomiast znacznie mniejszą czułość w przypadku diagnozowania zakażeń wywołanych przez *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. guillierimondi* [9, 18, 28].

Drugim istotnym elementem diagnostyki serologicznej w przebiegu zakażenia grzybami z rodzaju *Candida* spp jest ocena poziomu przeciwciał anty-mannanowych. Wykrycie przeciwciał w klasach IgM i/lub IgG odzwierciedla aktualne oraz przebyte zakażenie; wskazuje też na możliwość zakażenia układowego u pacjentów z grup wysokiego ryzyka. Należy wyraźnie podkreślić, że wynik pojedynczego oznaczenia przeciwciał, interpretowany w oderwaniu od wyników pozostałych badań mikologicznych (hodowla, wykrywanie antygenów), diagnostyki obrazowej oraz oceny stanu klinicznego pacjenta nie umożliwia rozróżnienia pomiędzy kolonizacją, miejscowymi postaciami kandydozy a formą inwazyjną zakażenia [18, 28]. Nagły wzrost poziomu przeciwciał, zwłaszcza w klasie IgM, świadczyć może o rozwoju aktywnego zakażenia, natomiast wynik ujemny nie wyklucza inwazyjnej postaci zakażenia *Candida* spp. Uzyskane w trakcie monitorowania serologicznego ujemne wyniki oznaczeń przeciwciał przy jednoczesnej długotrwałej antygenemii mannanowej mogą być związane z niepomysłnym rokowaniem [9, 22]. Przy zlecaniu badania poziomu swoistych przeciwciał przeciwgrzybiczych należy pamiętać, iż powinny być one wykonywane kilkakrotnie w odstępach 10–21 dni. O toczącym się zakażeniu grzybiczym świadczy zmiana poziomu przeciwciał o 25–30% początkowej wartości w tym odstępie czasowym [21, 22].

Dodatkowo na podkreślenie zasługuje fakt, iż pojedyncze oznaczenie przeciwciał IgG anty-*Candida* ma niską wartość diagnostyczną. Dodatni wynik badania jest niesłychanie częsty – przeciwciała w tej klasie na wysokim poziomie (powyżej 70 IU/ml) występują w surowicy około 90% pacjentów bez historii inwazyjnej kandydozy [1, 18].

W diagnostyce serologicznej inwazyjnej kandydozy zalecane jest równoległe badanie antygenów i przeciwciał, co pozwala na znaczne zwiększenie czułości oraz swoistości wykrywania inwazyjnych postaci zakażeń *Candida* spp. Część chorych wykazuje dodatni wynik dla obydwu markerów na różnych etapach tego samego epizodu zakażenia, co jest najlepszym potwierdzeniem rozwoju infekcji. U pacjentów z upośledzonym układem odpornościowym, u których mogą wystąpić zaburzenia w tworzeniu przeciwciał sugerowane jest stałe monitorowanie ich poziomu, a także wykonywanie testu wykrywającego antygen mannanowy. Przydatność takiego toku postępowania diagnostycznego wykazano także u chorych w okresie neutropenii [18], przy czym badanie antygenów powinno być wtedy wykonywane





Rys. 1. Przykładowe wyniki monitorowania antygenu mannanowego *Candida* spp. i przeciwciał skierowanych przeciwko mannanowi w przebiegu inwazyjnej kandydozy.

— poziom antygenu mannanowego *Candida* spp., - · - · - · poziom przeciwciał przeciw mannanowi, ↓ – pierwsze wyhodowanie *Candida* spp. z próbki krwi obwodowej, N – okresy neutropenii; a: pacjent z ostrą białaczką limfoblastyczną, zakażenie *Candida krusei* [22]; b – f: zakażenie *Candida tropicalis* u pacjentów z ostrą białaczką szpikową (b, c) lub ostrą białaczką limfoblastyczną (d, e, f) [19].

odpowiednio często (co 73–96 h), a monitorowanie poziomu swoistych przeciwciał nabiera większego znaczenia u pacjentów z krótkimi epizodami neutropenii [22], w okresie odbudowy liczby neutrofilii [9] oraz przy nawrotach kandydozy inwazyjnej [18]. Z uwagi na częstotliwość współistnienia „szczytu” antygenemii z dodatnimi wynikami hodowli krwi, wydaje się być celowe równoczesne pobieranie próbek krwi do badań hodowlanych i serologicznych [28].

Kolejnymi wartościowymi parametrami służącymi do oceny aktywnego zakażenia *Candida* spp. są:

- wykrycie 1,3-β-D-glukanu w surowicy krwi,

- wykrycie przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom pseudostrzępek (*Candida albicans* germ tube antibody, CAGTA).

(1→3)-β-D-glukan (BDG) jest β-D-glukopiranozylowym polisacharydem ściany komórkowej występującym u większości saprofitycznych i patogennych gatunków grzybów, z wyjątkiem *Mucorales* i *Cryptococcus* spp. Podobnie jak w przypadku innych sacharydów ściany komórkowej grzybów, BDG występuje w zarówno jako wielkocząsteczkowe polimery, jak i w formie rozpuszczalnej. Związek ten nie występuje w komórkach prokariotycznych ani eukariotycznych, zatem jego

Tabela I  
Wyniki badań laboratoryjnych w zakażeniach wywoływanych przez *Candida* spp.

| Rodzaj zakażenia                     | Wynik miana przeciwciał antymannanowych <i>Candida</i> spp. |     | Wynik miana przeciwciał anty-„germ tubes” | Wynik oznaczenia antygenemii <i>Candida</i> spp. |
|--------------------------------------|---|-----|---|--|
|                                      | IgM   | IgG |   |  |
| Przejściowe zakażenie błon śluzowych | +   | -   | -   | -  |
| Ostra kandydoza błon śluzowych       | ++  | +   | -   | -  |
| Przewlekła kandydoza błon śluzowych  | +   | +   | -   | -  |
| Inwazyjna kandydoza                  | +   | ++  | +   | +(+/-)   |

pojawienie się we krwi oraz innych materiałach, jałowych w warunkach fizjologicznych, jest dobrym markerem grzybiczego zakażenia inwazyjnego, w tym kandydozy [11]. Dostępne na rynku testy służące do wykrywania BDG opierają się na zasadzie aktywacji kaskady koagulacyjnej amebocytów skrzypłowca *Limulus polyphemus*.

Sacharydy ściany komórkowej pseudostrzępek (filamenty, *pseudomycelium*) *Candida* spp. różnią się strukturą antygenową od ściany komórkowej blastokonidiów. Forma pseudomycelialna jest wytwarzana w reakcji na kontakt komórek drożdżaka ze składnikami surowicy, i co za tym idzie, świadczy o przenikaniu grzyba do łożyska naczyniowego, zatem synteza przeciwciał przeciwko antygenom filamentów *Candida* spp. implikuje wystąpienie inwazyjnej postaci zakażenia. [12, 13].

Dotychczasowe badania wykazały, że wieloczynnikowa diagnostyka obejmująca równoczesne monitorowanie antygenemii oraz poziomu przeciwciał skierowanych przeciwko mannanowi pozwoliła na zwiększenie swoistości diagnostycznej w rozpoznawaniu inwazyjnej kandydozy do poziomu 83% [9]; dodatkowe oznaczenie poziomu 1,3-β-D-glukanu zwiększa ten wskaźnik do 88% [1]; równoczesne badanie przeciwciał CAGTA – do 96% [12]. Wprowadzenie kompleksowej diagnostyki serologicznej umożliwia także zwiększenie dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej inwazyjnej kandydozy u pacjentów z zaburzeniami odpowiedzi humoralnej, w tym pacjentów neutropenicznych.

### 3. Diagnostyka serologiczna aspergillozy

Podobnie jak przy zakażeniach *Candida* spp., w diagnostyce serologicznej chorób powodowanych przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, stosuje się oznaczenia antygenów rozpuszczalnych oraz swoistych przeciwciał. Podstawowym badaniem w diagnostyce inwazyjnej aspergillozy jest wykrywanie krążącego w surowicy krwi antygeny galaktomannanowego [16]. Jest to oligosacharyd ściany komórkowej o masie 25–50 kDa. Jego obecność wykazano u *Aspergillus fumigatus*, a także innych gatunków (*A. flavus*, *A. niger*) patogennych dla

człowieka. Galaktomannan jest wysoce immunogennym antygenem, dlatego też został uznany za dobry marker aspergillozy [8, 20]. W formie rozpuszczalnej może on krążyć w płynach ustrojowych w stężeniach 1–500 ng/ml. Uzupełnienie klasycznych metod hodowlanych o oznaczenie obecności galaktomannanu stało się możliwe dzięki wprowadzeniu na rynek dwóch testów: immunoenzymatycznego Platelia® *Aspergillus* Ag (Bio-Rad) oraz aglutynacji lateksowej Pastorex® *Aspergillus* (Bio-Rad). Wykazano, że w rozpoznawaniu inwazyjnej formy aspergillozy zdecydowanie bardziej przydatny jest pierwszy z nich, który umożliwia wykrycie ponad 10-krotnie mniejszej ilości antygenów w 1 ml surowicy w porównaniu z testem aglutynacji lateksowej, o czułości zaledwie 15 ng/ml [23].

Czułość wykrywania antygeny galaktomannanowego zależy także od miejsca toczącego się zakażenia. W przypadkach aspergillusowego zapalenia płuc, poziom detekcji krążącego antygeny w surowicy krwi jest wyraźnie niższy w porównaniu do postaci uogólnionej [7]. Ponadto we wczesnych fazach zakażenia antygen *Aspergillus* może występować w bardzo niskim stężeniu. W badaniach wykazano, że antygenemia w surowicy koreluje z klinicznie potwierdzoną aspergillozą oraz z odpowiedzią na terapię przeciwgrzybiczą [11]. Inne obserwacje wskazują, że potwierdzony dodatni wynik na obecność krążącego antygeny w klinicznie udokumentowanych przypadkach inwazyjnej aspergillozy może być podstawą do wdrożenia lub zmiany terapii przeciwgrzybiczej, nawet przy braku pozostałych kryteriów diagnostycznych [7]. Monitorowanie próbek surowic po wdrożeniu leczenia przeciwgrzybiczego daje możliwość oceny prawdopodobieństwa odpowiedzi na terapię i/lub konieczności włączenia leczenia alternatywnego [7, 14]. Obniżanie się poziomu wykrywanego galaktomannanu wydaje się mieć związek z pomyślnym rokowaniem; z drugiej jednak strony brak antygenemii nie wyklucza samej aspergillozy oraz zakażenia spowodowanego przez inne grzyby pleśniowe (*Fusarium* spp., *Mucor* spp.) [16]. Możliwe są też wyniki fałszywie dodatnie u chorych przyjmujących antybiotyki z grupy β-laktamów (amoksycylina, piperacylina) lub też z uszkodzoną śluzówką jelit [29].

Dyskusyjna jest także zmiana przyjętego przez producenta indeksu wartości „cut-off” testu. Dotychczas za próbki ujemne uznawano materiał o wartości indeksu poniżej 1, za dodatnie próbki o indeksie  $>1,5$ , natomiast wartości indeksu w zakresie 1–1,5 interpretowano jako wynik wątpliwy („grey zone”). Obecnie, zgodnie z informacjami załączanymi przez firmę, za dodatnie uznawane są surowice o wartości indeksu  $>0,5$ , zaś próbki o wartości  $<0,5$  uważane są za ujemne. Zalecane jest także, by wszystkie próbki o indeksie  $\geq 0,5$  były oznaczane ponownie z użyciem tej samej surowicy. Taka ocena oraz badanie wartości indeksu w kolejnych próbkach surowic pobranych od tego samego pacjenta ma na celu wyeliminowanie wyników fałszywie dodatnich spowodowanych zanieczyszczeniem materiału. Dwa kolejne badania z dodatnim wynikiem miałyby świadczyć o inwazyjnej aspergilozie. Dodatni wynik należy jednak zawsze interpretować w świetle danych klinicznych oraz w połączeniu z wynikami badań radiologicznych i innych testów laboratoryjnych [28].

Do badań przeciwciał anty-*Aspergillus* stosuje się obecnie podobnie jak w przypadku grzybów z rodzaju *Candida* testy immunoenzymatyczne, które umożliwiają ilościowe określenie miana przeciwciał. U osób zdrowych w zasadzie nie stwierdza się w surowicy przeciwciał anty-*Aspergillus*; występują one tylko u pacjentów z grup podwyższonego ryzyka. Wartość diagnostyczna testów ELISA wykrywających swoiste przeciwciała jest wysoka zwłaszcza w przypadkach grzybniaka płuc (*aspergilloma*) oraz aspergillozy płucnej, zwłaszcza u pacjentów immunokompetentnych. Ostrożna interpretacja wyników jest niezbędna natomiast wśród pacjentów z obniżoną odpornością ze względu na zbyt niskie tempo syntezy immunoglobulin.

#### 4. Diagnostyka serologiczna kryptokokozy

Zakażenia wywoływane przez *Cryptococcus neoformans*, pomimo swego stosunkowo rzadkiego rozpowszechnienia, niosą dla chorych poważne ryzyko infekcji układowej. Przez wiele lat diagnostyka inwazyjnej kryptokokozy opierała się na hodowli grzyba oraz barwieniu negatywnym preparatów mikroskopowych tuszem chińskim w celu wykrywania form otoczkowych. Ze względu na trudności w badaniu tego patogenu w materiale klinicznym metodami tradycyjnymi, konieczne stało się wprowadzenia testów serologicznych, stwierdzających obecność antygenów *Cryptococcus* w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym [15].

Najbardziej rozpowszechnione testy, takie jak Pastrox® *Cryptococcus* (BioRad), opierają się na zasadzie aglutynacji lateksowej i wykrywają krążące antygeny polisacharydowe zawarte w ścianie komórkowej grzyba. Czulość analityczna tej metody nie należy do wysokich,

bowiem została określona na poziomie 30 ng/ml, zaś swoistość wynosi 93%. Ponadto niektóre partie testów dawały wysoki odsetek wyników fałszywie dodatnich i wątpliwych, ze względu na zanieczyszczenia pronazy stosowanej do wstępnej obróbki materiału klinicznego oraz reakcje krzyżowe z czynnikiem reumatoidalnym występującym w surowicy [5]. Do zalet metody należy natomiast niski koszt badania oraz prosta procedura wykonania oznaczenia. W obecnej chwili na rynku dostępny jest również jakościowy test immunoenzymatyczny Premier® *Cryptococcus* Ag, którego czulość wynosi 0,6 ng/ml. Jest on produkowany przez amerykańską firmę Meridian i przy użyciu seryjnych rozcieńczeń kontroli dodatniej umożliwia także analizę półilościową, która może pełnić rolę prognostyczną w przebiegu zakażenia [5, 15].

Ze względu na szerokie rozpowszechnienie *Cryptococcus neoformans* w środowisku nie prowadzi się obecnie badania swoistych przeciwciał w klasach IgM i IgG testami serologicznymi. Pojawiają się one wprawdzie w płynach ustrojowych w początkowym okresie zakażenia, lecz ich występowanie może być również skutkiem kontaktu z antygenami *Cryptococcus* obecnymi we wdychanym powietrzu.

#### 5. Metody molekularne stosowane w diagnostyce grzybic inwazyjnych

Ze względu na różnorakie ograniczenia w badaniach serologicznych czy hodowli laboratoryjnej grzybów, konieczne stało się opracowanie nowych technik diagnostycznych, które umożliwiają wykrywanie tych patogenów w organizmie pacjenta już na początkowych etapach zakażenia oraz pozwalają uzyskać jednoznaczny wynik. Przełomem okazało się być wprowadzenie do rutynowej diagnostyki techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), odkrytej w 1983 roku przez Kary'ego Mullisa. Dodatkowy wzrost czułości i specyficzności osiągnięto dzięki zastosowaniu reakcji PCR połączonej z jednoczesną analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR, qPCR). Wyznacznikiem ilości matrycowego DNA jest w tej metodzie numer kolejnego cyklu, po którym kinetyka reakcji wchodzi w fazę logarytmicznego wzrostu ilości produktu. Technikę tą można także z powodzeniem stosować w przypadku dłuższej przechowywanego materiału biologicznego (próbek surowicy krwi), co stanowi poważne utrudnienie w przypadku badań serologicznych. Dodatkowo na korzyść real-time PCR przemawia możliwość zautomatyzowania badania i znacznego obniżenia kosztów analizy próbek.

Mimo tych innowacji obecnie brak jest rozpowszechnionych komercyjnych testów mikologicznych, które wykorzystywałyby metody biologii molekularnej

[4, 17]. Wynika to przede wszystkim z komplikacji w izolacji DNA grzybów, spowodowanymi trudnościami w rozbiciu ich ściany komórkowej oraz kłopotów ze znalezieniem specyficznych i konserwatywnych sekwencji docelowych w genomie grzybów patogennych [4]. Dodatkowe problemy związane są z walidacją metod, standaryzacją międzylaboratoryjną oraz określeniem parametrów kliniczno-diagnostycznych. Z tego też powodu oznaczenia z użyciem testów PCR i qPCR mają głównie charakter naukowo-badawczy [1, 30] lub dotyczą badania pokrewieństwa genetycznego izolatów na potrzeby dochodzenia epidemiologicznego [6, 26]. Wyjątek stanowią wprowadzone niedawno zestawy komercyjne oparte na technice real-time PCR: test MycAssay<sup>®</sup>, wykrywający w surowicy krwi DNA grzybów z rodzaju *Aspergillus*; test SeptiFast<sup>®</sup> dedykowany do próbek krwi pełnej i wykrywający *Aspergillus fumigatus* oraz grzyby z rodzaju *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* i *C. tropicalis*; a także test FilmArray<sup>®</sup> BC, wykrywający i różnicujący *C. albicans* z czterema innymi klinicznie istotnymi drożdżakami z rodzaju *Candida* [2, 3, 17, 24, 26, 27]. Niewielka liczba opublikowanych wyników prezentujących przydatność kliniczną testów molekularnych, wysoka cena oznaczeń oraz konieczność posiadania specjalistycznego wyposażenia pracowni biologii molekularnej nie sprzyjają na obecnym etapie ich rozpowszechnieniu w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej, co – jak mamy nadzieję – zmieni się w przyszłości na korzyść.

## 6. Podsumowanie

W związku z rozwojem współczesnej transplantologii zakażenia o etiologii grzybiczej należą obecnie do najpoważniejszych powikłań u osób poddawanych zabiegom przeszczepienia, zarówno narządów unaczynionych, jak i komórek hematopoetycznych. Choć wprowadzenie standaryzowanych strategii postępowania terapeutycznego oraz zalecanego toku badań laboratoryjnych wpłynęło na poprawę skuteczności leczenia zakażeń potransplantacyjnych, to jednak trudności w szybkiej i prawidłowej diagnostyce mykologicznej sprawiają że zakażenia grzybicze wciąż pozostają istotnym wyzwaniem u osób z zaburzeniami odporności i/lub poddanych długotrwałej antybiotykoterapii.

## Piśmiennictwo

1. Alam F.F., Mustafa A.S., Khan Z.U.: Comparative evaluation of (1,3)-beta-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. *BMC Infect. Dis.* 7, 103 (2007)
2. Altun O., Almuhayawi M., Ullberg M., Ozenci V.: Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 51, 4130–4136 (2013)
3. Blaschke A.J., Heyrend C., Byington C.L., Fisher M.A., Barker E., Garrone N.F., Thatcher S.A., Pavia A.T., Barney T., Alger G.D., Daly J.A., Ririe K.M., Ota I., Poritz M.A.: Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the FilmArray system. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 74, 349–355 (2012)
4. Challier S., Boyer S., Abachin E., Berche P.: Development of a serum-based Taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 844–846 (2004)
5. Gade W., Hinnefeld S.W., Babcock L.S., Gilligan P., Kelly W., Wait K., Greer D., Pinilla M., Kaplan R.L.: Comparison of the PREMIER cryptococcal antigen enzyme immunoassay and the latex agglutination assay for detection of cryptococcal antigens. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1616–1619 (1991)
6. Hansen D., Healy M., Reece K., Smith C., Woods G.L.: Repetitive-sequence-based PCR using the DiversiLab system for identification of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1835–1839 (2008)
7. Kawazu M., Kanda Y., Nannya Y., Aoki K., Kurokawa M., Chiba S., Motokura T., Hirai H., Ogawa S.: Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1-3)-beta-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2733–2741 (2004)
8. Mennink-Kersten M.A., Donnelly J.P., Verweij P.E.: Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect. Dis.* 4, 349–357 (2004)
9. Mikulska M., Calandra T., Sanguinetti M., Poulain D., Viscoli C.: The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit. Care*, 14, R222 (2010)
10. De Pauw B., Benoit J.E. i wsp.: Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin. Infect. Dis.* 46, 1813–1821 (2008)
11. Pazos C., Pontón J., Del Palacio A.: Contribution of (1-3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J. Clin. Microbiol.* 43, 299–305 (2005)
12. Pemán J., Zaragoza R.: Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care settings. *Mycoses*, 53, 424–433 (2010)
13. Pemán J., Zaragoza R., Quindós G., Alkorta M., Cuétara M.S., Camarena J.J., Ramírez P., Giménez M.J., Martín-Mazuelos E., Linares-Sicilia M.J., Pontón J.: Clinical factors associated with a *Candida albicans* germ tube antibody positive test in Intensive Care Unit patients. *BMC Infect. Dis.* 11, 60–66 (2011)
14. Pinel C., Fricker-Hidalgo H., Lebeau B., Garban F., Hamidfar R., Ambroise-Thomas P., Grillot R.: Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2184–2186 (2003)
15. Saha D.C., Xess I., Biswas A., Bhowmik D.M., Padma M.V.: Detection of *Cryptococcus* by conventional, serological and molecular methods. *J. Med. Microbiol.* 58, 1098–1105 (2009)
16. Salonen J., Lehtonen O.P., Teräsjarvi M.R., Nikoskelainen J.: *Aspergillus* antigen in serum, urine and bronchoalveolar lavage

- specimens of neutropenic patients in relation to clinical outcome. *Scand. J. Infect. Dis.* **32**, 485–490 (2000)
17. Schabereiter-Gurtner C., Selitsch B., Rotter M.L., Hirschl A.M., Willinger B.: Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 906–914 (2007)
  18. Sendid B., Poirot J.L., Tabouret M., Bonnin A., Caillot D., Camus D., Poulain D.: Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic *Candida* species. *J. Med. Microbiol.* **51**, 433–442 (2002)
  19. Sendid B., Caillot B., Baccouch-Humbert B., Klingspor L., Grandjean M., Bonnin A., Poulain D.: Contribution of the Platelia *Candida*-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4551–4558 (2003)
  20. Siemann M., Koch-Dörfler M.: The Platelia *Aspergillus* ELISA in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis (IPA). *Mycoses*, **44**, 266–272 (2001)
  21. Steinmann J., Buer J., Rath P.M., Paul A., Saner F.: Invasive aspergillosis in two liver transplant recipients: diagnosis by SeptiFast. *Transpl. Infect. Dis.* **11**, 175–178 (2009)
  22. Verduyn Lunel F.M., Mennink-Kersten A.S.H.M., Ruegebrinka D.: Value of *Candida* serum markers in patients with invasive candidiasis after myeloablative chemotherapy. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* **64**, 408–415 (2009)
  23. Verweij P.E., Erjavec Z., Sluiter W., Goessens W., Rozenberg-Arska M., Debets-Ossenkopp Y.J., Guiot H.F., Meis J.F.: Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra- and interlaboratory reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 1612–1616 (1998)
  24. von Lilienfeld-Toal M., Lehmann L.E., Raadts A.D., Hahn-Ast C., Orlopp K.S., Marklein G., Purr I., Cook G., Hoefft A., Glasmacher A., Stüber F.: Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 2405–2410 (2009)
  25. White P.L., Perry M.D., Moody A., Follett S.A., Morgan G., Barnes R.A.: Evaluation of analytical and preliminary clinical performance of Myconostica MycAssay *Aspergillus* when testing serum specimens for diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2169–2174 (2011)
  26. Wise M.G., Healy M., Reece K., Smith R., Walton D., Dutch W., Renwick A., Huong J., Young S., Tarrand J., Kontoyiannis D.P.: Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *J. Med. Microbiol.* **56**, 778–787 (2007)
  27. Yeo S.F., Wong B.: Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 465–484 (2002)
  28. Yera H., Sendid B., Francois N., Camus D., Poulain D.: Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**, 864–870 (2001)
  29. Zandijk E., Mewis A., Magerman K., Cartuyvels R.: False-positive results by the platelia *Aspergillus* galactomannan antigen test for patients treated with amoxicillin-clavulanate. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1132–1133 (2008)
  30. Zarrinfar H., Mirhendi H., Makimura K., Satoh K., Khodadadi H., Paknejad O.: Use of mycological, nested PCR, and real-time PCR methods on BAL fluids for detection of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* in solid organ transplant recipients. *Mycopathologia*, **176**, 377–385 (2013)



## SPIS TREŚCI

|   |     |
|---|-----|
| M. Binek – Znaczenie jelitowych mikrobiontów w utrzymaniu ogólnej homeostazy gospodarza .....   | 207 |
| B. Tokarz-Deptuła, J. Śliwa-Dominiak, M. Adamiak, M. Kubiś, A. Ogórkiewicz, W. Deptuła – Wirofagi – nowe elementy biologiczne .....   | 217 |
| M. Sikora, M. Gołaś, K. Piskorska, E. Swoboda-Kopeć – Czynniki wirulencji grzybów z rodzaju <i>Candida</i> istotne w patogenezie zakażeń występujących u pacjentów żywionych pozajelitowo ..... | 224 |
| K. Skowron, J. Bauza-Kaszewska, A. Kaczmarek, A. Budzyńska, E. Gospodarek – Mikrobiologiczne aspekty gospodarki gnojowicą .....   | 235 |
| J. Karakulska, P. Nawrotek, K. Fijałkowski – Leukocydyna Panton-Valentine – aspekty znane i nieznane .....  | 250 |
| E. Abramczuk, K. Pancer, W. Gut, B. Litwińska – Bokawirus człowieka – charakterystyka, chorobotwórczość, występowanie .....   | 258 |
| N.B. Kubisa, M. Radkowski – Współzakażenie HGV/GBV-C i HIV: epidemiologia, patogeneza i konsekwencje kliniczne zakażenia .....  | 267 |
| ZJAZDY I KONFERENCJE  |     |
| – V Pomorskie Spotkania z Mikrobiologią, 16–18 września 2015 r. w Pogorzelic  |     |
| P. Nawrotek, A. Augustyniak – Nanotechnologia w mikrobiologii – wybrane aspekty   | 275 |
| I. Wojciechowska-Koszek, M. Mnichowska-Polanowska – Serologiczna diagnostyka boreliozy z Lyme w praktyce laboratoryjnej .....   | 283 |
| PUBLIKACJE METODYCZNE I STANDARDY   |     |
| T. Dzieciatkowski, A. Sulowska, M. Przybylski – Diagnostyka serologiczna i molekularna grzybic inwazyjnych .....  | 291 |

## CONTENTS

|   |     |
|---|-----|
| M. Binek – The role of gut microbiome in the maintenance of host homeostasis .....  | 207 |
| B. Tokarz-Deptuła, J. Śliwa-Dominiak, M. Adamiak, M. Kubiś, A. Ogórkiewicz, W. Deptuła – Virophages – new biological elements .....   | 217 |
| M. Sikora, M. Gołaś, K. Piskorska, E. Swoboda-Kopeć – Virulence factors of <i>Candida</i> species important in the pathogenesis of infections in patients with total parenteral nutrition ..... | 224 |
| K. Skowron, J. Bauza-Kaszewska, A. Kaczmarek, A. Budzyńska, E. Gospodarek – Microbiological aspects of slurry management .....  | 235 |
| J. Karakulska, P. Nawrotek, K. Fijałkowski – Pantan-Valentine leukocidin – known and unknown aspects .....  | 250 |
| E. Abramczuk, K. Pancer, W. Gut, B. Litwińska – Human bocavirus – characteristics, pathogenicity, occurrence .....  | 258 |
| N.B. Kubisa, M. Radkowski – HGV/GBV-C and HIV coinfection: epidemiology, pathogenesis and clinical consequences of infection .....  | 267 |
| MEETINGS AND CONFERENCES  |     |
| – 5 <sup>th</sup> Pomeranian Meeting with Microbiology, 16–18 September 2015, Pogorzelica   |     |
| P. Nawrotek, A. Augustyniak – Nanotechnology in microbiology – selected aspects ...   | 275 |
| I. Wojciechowska-Koszek, M. Mnichowska-Polanowska – Serological testing for Lyme disease in laboratory practice .....   | 283 |
| METHODS AND STANDARDS   |     |
| T. Dzieciatkowski, A. Sulowska, M. Przybylski – Serological and molecular diagnostic methods for invasive fungal infections .....   | 291 |

